

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТАКСОНОМИЯ ЭНТЕРОКОККОВ

Энтерококки входят в группу молочнокислых бактерий. Широкое распространение и разнообразие их свойств постоянно привлекает внимание исследователей. Род *Enterococcus* является гетерогенной по фенотипическим свойствам группой бактерий. В обзоре литературы представлено современное состояние вопроса таксономии энтерококков, которая претерпела значительные изменения за последние десятилетия. Рассмотрены и проанализированы микробиологические методы идентификации. Особое внимание уделено проблемам, которые могут возникнуть при идентификации энтерококков на уровне рода, а также при дифференциации близкородственных видов. Использование молекулярно-генетических методов идентификации энтерококков позволило преодолеть недостатки фенотипической идентификации представителей рода *Enterococcus*. Показана необходимость использования молекулярно-генетических методов идентификации, перечислены основные подходы, обсуждены их преимущества и недостатки.

*Ключевые слова:* энтерококки, таксономия, идентификация.

Энтерококки входят в группу молочнокислых бактерий и с давних времен используются людьми, благодаря своим полезным свойствам, присущим данной группе микроорганизмов. В то же время в последние десятилетия некоторые представители рода *Enterococcus* приобрели значение как одни из основных возбудителей внутрибольничных инфекций. Таксономия этих микроорганизмов постоянно совершенствуется. Определение видовой принадлежности является необходимым условием для использования штаммов энтерококков в пищевой промышленности и в составе пробиотиков. Кроме того, точная идентификация возбудителя – это первый этап диагностики инфекционного заболевания и последующего назначения этиотропной антибиотикотерапии.

Систематическое положение энтерококков вызывало много споров со времен первого упоминания о них, и таксономия этих микроорганизмов претерпела значительных изменений. Впервые название «энтерококки» было применено Thiercelin в 1899 г. для грампозитивных диплококков кишечного происхождения [75]. Новый род *Enterococcus* был предложен в 1903 г. Thiercelin и Jouhaud [76], но позже Andrewes и Horder в 1906 г. заменили название «энтерококк» на *Streptococcus faecalis* [6]. Обзор по вопросам систематики энтерококков до 1975 года представлен в монографии Квасникова и Нестеренко [2]. Наиболее распространенной была классификация, предложенная Sherman [65], по которой род *Streptococcus* делился на четыре группы – «энтерококки», «молочные» стрептококки, «вириданс» стрептококки и «пиогенные» стрептококки. В группу «энтерококки» входили стрептококки фекального происхождения с группоспецифическим антигеном D, которые растут при температурах 10° С и 45° С, в среде с 6,5 % NaCl, при pH 9,6, в молоке с 0,1 % метиленовой сини, образуют аммиак из аргинина, растут в присутствии 40 % желчи и выдерживают прогревание при 60° С в течение 30 мин. Группа включала виды *S. faecalis*, *S. liquefaciens*, *S. zymogenes* и *S. durans*. Термины «фекальные стрептококки», «энтерококки» и «стрептококки группы D» использовались как синонимы.

Выделить *S. faecalis* и *S. faecium* в отдельный род *Enterococcus* предлагал Kalina в 1970 году [1, 44], но его предложение не получило поддержки. Позднее, в 1984 году Schleifer и Kilrperg-Bälz, исходя из данных ДНК-ДНК гибридизации, установили, что энтерококки и стрептококки группы D (*S. bovis* и *S. equinus*) принадлежат к отдельным родам. Вследствие чего, *S. faecalis* и *S. faecium* были выделены в род *Enterococcus* (ex Thiercelin and Jouhaud) nom. rev. как *E. faecalis* comb. nov. и *E. faecium* comb. nov. [64].

К роду *Enterococcus* относятся микроорганизмы с клетками овальной формы, в мазках, окрашенных по Граму, располагаются по одной, в парах или в коротких цепочках и часто вытянуты в направлении цепи. Они грампозитивные, эндоспор не образуют, могут быть подвижными. Факультативные анаэробы, растут в диапазоне температур 10° С – 45° С, оптимальная температура роста около 35° С. Растут также в средах с 6,5 % NaCl и с pH 9,6. Большинство штаммов выдерживают прогревание при 60° С в течение 30 мин. Гидролизуют пирролидонил-β-нафтиламид. Хемоорганотрофы метаболизм ферментативный. Основным конечным продуктом ферментации глюкозы является L-молочная кислота. Не содержат гем-содержащих соединений. Бензидин-негативные, каталазонегативные, но некоторые штаммы продуцируют псевдокаталазу. Минимальные питательные потребности обычно комплексные. Длинноцепочечные жирные кислоты в основном насыщенного неразветвленного или мононасыщенного типа. Некоторые штаммы продуцируют кислоты с циклопропановым кольцом. Тип пептидогликана – Lys-D-Asp или Lys-Ala<sub>2,3</sub>. Содержание в ДНК G+C колеблется от 37 до 45 %. Типовой вид *Enterococcus faecalis* [64].

Основываясь на биохимических, химических и генетических данных некоторые другие виды стрептококков были перенесены в род *Enterococcus* как виды *E. avium* nom. rev., comb. nov., *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov., *E. durans* nom. rev., comb. nov., *E. malodoratus* sp. nov., *E. gallinarum* comb. nov. [14], *E. cecorum* [87] и *E. saccharolyticus* [62].

Атипичные по фенотипическим свойствам штаммы *E. faecium*, которые занимали промежуточное положение между *E. faecium* и *E. durans*, были выделены в отдельный вид *E. hirae* sp. nov. исходя из данных ДНК-ДНК гибридизации и результатов анализа состава жирных кислот [84].

В последние годы род *Enterococcus* пополнился новыми видами. Однако следует отметить, что некоторые виды энтерококков были определены как синонимы видов, описанных ранее. Так, вид *E. porcicus* [74] был признан синонимом *E. villorum* [20], вид *E. flavescens* [59] – синонимом *E. casseliflavus*, а вид *E. saccharominimus* [83] – синонимом *E. italicus* [55]. Два вида, отнесенные к энтерококкам, были перенесены в другие роды – *E. seriolicida* [48] – в род *Lactococcus* как *L. garviae* [29], а *E. solitarius* [16] – в род *Tetragenococcus* как *T. solitarius* comb. nov. [30].

Анализ последовательности гена 16S рРНК выявил гетерогенность внутри рода и показал наличие видовых групп [88]. Внутригрупповая гомология последовательности гена 16S рРНК составляет более 97 %, к примеру, у группы «faecium» – 98,7-99,5 %, а у группы «avium» – 99,3–99,7 % [88]. Таким образом, на сегодняшний день род *Enterococcus* насчитывает 35 видов, которые разделены на видовые группы (табл.) .

Таблица

Видовой состав рода *Enterococcus*

Видовая группа	Виды энтерококков
«Faecium»	<i>E. faecium</i> [64], <i>E. durans</i> [14], <i>E. hirae</i> [33], <i>E. mundtii</i> [15], <i>E. villorum</i> [82], <i>E. canis</i> [20], <i>E. ratti</i> [74], <i>E. asini</i> [21], <i>E. phoeniculicola</i> [49], <i>E. canintestini</i> [52], <i>E. thailandicus</i> [73]
«Faecalis»	<i>E. faecalis</i> [64], <i>E. haemoperoxidus</i> [68], <i>E. moraviensis</i> [68], <i>E. termitis</i> [72], <i>E. caccae</i> [12]
«Gallinarum»	<i>E. gallinarum</i> [14], <i>E. casseliflavus</i> [14]
«Cecorum»	<i>E. cecorum</i> [87], <i>E. columbae</i> [23]
«Avium»	<i>E. avium</i> [14], <i>E. malodoratus</i> [14], <i>E. raffinosus</i> [16], <i>E. pseudoavium</i> [16], <i>E. pallens</i> [81], <i>E. gilvus</i> [81], <i>E. hermanniensis</i> [47], <i>E. devriesei</i> [71]
Отдельные виды	<i>E. saccharolyticus</i> [62], <i>E. dispar</i> [17], <i>E. sulfureus</i> [51], <i>E. italicus</i> [35], <i>E. aquimarinus</i> [70], <i>E. silesiacus</i> [72], <i>E. cammeliae</i> [67]

Род *Enterococcus* является гетерогенной по фенотипическим свойствам группой бактерий. Некоторые виды не проявляют типичные фенотипические свойства, характерные для энтерококков, и отнесение их к роду *Enterococcus* было основано на филогенетических доказательствах, полученных в результате молекулярно-генетических исследований.

Для выделения энтерококков используют различные среды с селективными или индикаторными свойствами.

торными веществами, в зависимости от источника выделения. Наиболее широко используются селективным агентом является азид натрия. Также используют ацетат талия, теллурид калия, тиоционат калия, эскулин, желчь, индикаторные красители, 2,3,5-трифенил-тетразолий-хлорид (ТТХ), антибиотики (канамицин, гентамицин, налидиксовая кислота). Во многих средах используют несколько селективных добавок, например желчь-эскулиновый агар, канамицин-эскулин-азидный агар [27].

**Идентификация энтерококков на уровне рода.** Родовая идентификация энтерококков в первую очередь заключается в их дифференциации от других грампозитивных каталазонегативных кокков, а именно родов *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*. Для энтерококков характерными являются способность к росту в диапазоне температур 10° – 45°С, устойчивость к высоким концентрациям NaCl (6,5 %) и рост в среде с pH 9,6 [64]. Но следует учитывать, что не все виды энтерококков проявляют указанные свойства. Некоторые из этих свойств могут быть присущими и другим грампозитивным каталазонегативным коккам [31, 32]. Виды *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. camelliae* не растут при 10° С, а виды *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. hermanniensis*, *E. devriesei*, *E. canintestini*, *E. silesiacus* не растут при 45° С. *E. cecorum*, *E. pseudoavium*, *E. columbae*, *E. asini*, *E. phoeniculicola*, *E. italicus*, *E. camelliae* не растут в среде с 6,5 % NaCl, в то же время, представители родов *Pediococcus* и *Lactococcus* могут расти при 45° С. Некоторые виды *Streptococcus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc* растут при 10° С. Рост в среде с 6,5 % NaCl также присущ представителям родов *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* и *Leuconostoc* [24, 31].

Некоторыми авторами для дифференциации энтерококков на родовом уровне были предложены дополнительные биохимические признаки, а именно тест на гидролиз пирролидонил-β-нафтиламида, лейцинариламидазную активность, реакция Фогес-Проскауэра (продукция ацетона), сбраживание рибозы, гликогена [24, 31, 32, 34]. Однако, *E. cecorum*, *E. saccharolyticus*, *E. columbae*, *E. pallens*, *E. termitis* не гидролизуют пирролидонил-β-нафтиламид. В то же время этот тест может быть позитивным у некоторых видов *Streptococcus* группы А, *Lactococcus*, *Gemella* и *Aerococcus* [31]. Виды *E. saccharolyticus*, *E. canis*, *E. phoeniculicola*, *E. aquimarinus*, *E. termitis* не продуцируют ацетон (реакция Фогес-Проскауэра негативная), виды *E. sulfureus*, *E. asini*, *E. italicus*, *E. aquimarinus*, *E. camelliae* не образуют кислоту из рибозы. В то же время, представители родов *Lactococcus*, *Leuconostoc* и *Pediococcus* могут быть как позитивными в реакции Фогес-Проскауэра, так и рибозо-позитивными [31]. Окисление гликогена обычно негативное у представителей родов *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Gemella* и позитивное у многих видов рода *Streptococcus* [24]. Но некоторые штаммы видов *E. mundtii*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. gallinarum* и *E. cecorum* сбраживают гликоген.

Таким образом, физиолого-биохимические признаки не позволяют четко дифференцировать представителей рода *Enterococcus*. Как отмечено ранее, это связано с тем, что многие виды были отнесены к данному роду, исходя из результатов молекулярно-генетических исследований, а именно, анализа последовательности гена 16S рРНК. В связи с этим, были разработаны молекулярно-генетические методы для идентификации энтерококков на уровне рода. Праймеры к последовательности гена 16S рРНК позволяют дифференцировать представителей рода *Enterococcus* от лактококков, а также от других грампозитивных каталазонегативных родов [19].

Наиболее распространенным является ПЦР-анализ с использованием праймеров, специфических к последовательности гена фактора элонгации EF-Tu (ген *tuf*). Однако следует отметить, что данный подход должен быть использован только в комплексе с анализом фенотипических признаков, так как было установлено, что данные праймеры также дают продукт амплификации с ДНК представителей родов *Abiotrophia* и *Listeria*. Причиной этого авторы считают то, что гомология последовательностей гена *tuf* энтерококков и *Abiotrophia* sp. составляет 85–89 %, тогда как последовательности гена *tuf* энтерококков сходны на 89-91 %. При увеличении количества циклов ПЦР с 30 до 40 наблюдалась амплификация с ДНК листерий, она была в 100 раз слабее, чем с ДНК энтерококков. Гомология последовательностей гена *tuf* листерий и энтерококков составляла 82–83 % [45].

Также была продемонстрирована эффективность использования анализа спектра жирных кислот для дифференциации родов *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* [9].

Таким образом, при идентификации энтерококков на уровне рода определенную сложность может представлять их дифференциация от других родов грампозитивных каталазо-негативных кокков. Результаты родовой идентификации необходимо подтверждать методом ПЦР с использованием родоспецифических праймеров.

**Видовая идентификация энтерококков.** Сообщалось, что филогенетически отдельные виды и видовые группы отличаются между собой по химическому составу, физиологии, ростовым характеристикам и биохимической активности. Например, виды группы «*cescorum*» требуют для роста повышенного содержания CO<sub>2</sub>. Колонии представителей группы «*avium*» более мелкие, чем колонии у группы «*faecium*» или «*gallinarum*». Основными длинноцепочечными жирными кислотами, которые содержат виды группы «*faecium*», являются гексадекановая, октадеценная и циклопропановая, тогда как основными длинноцепочечными жирными кислотами энтерококков группы «*avium*» являются тетрадекановая и гексадекановая, а виды группы «*gallinarum*» не содержат циклопропановой кислоты [24]. Однако, по мере возрастания количества видов в группах, их дифференциация по фенотипическим признакам становится все более сложной.

Видовая идентификация энтерококков основана на таких фенотипических признаках как подвижность, образование желтого пигмента, восстановление ТТХ, сбраживание углеводов, а также другая ферментативная активность.

Подвижность является характерным признаком видов *E. casseliflavus* и *E. gallinarum*. Однако, по данным некоторых авторов, это свойство присуще не всем штаммам данных видов, что делает практически невозможным их дифференциацию по биохимическим свойствам от штаммов вида *E. faecium* [11]. Поэтому авторами были предложены дополнительные тесты для дифференциации неподвижных штаммов *E. gallinarum* от *E. faecium*, в частности тест на сбраживание D-ксилозы и α-метил-D-глюкопиранозиды [13, 26, 79]. Однако более надежными являются молекулярно-генетические методы, а именно определение последовательности гена 16S рРНК [58] и ПЦР с праймерами, специфическими к последовательностям генов *VanC1* (для дифференциации *E. gallinarum*) и *VanC2* (для дифференциации *E. casseliflavus*) [11, 28].

Продукция желтого пигмента может служить дифференциальным признаком видов *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. sulfureus*, *E. pallens*, *E. gilvus*. Некоторые штаммы вида *E. haemoperoxidus* также могут образовывать желтый пигмент. Однако сообщалось о выделении штаммов *E. casseliflavus*, которые не только являются неподвижными, но и не продуцируют пигмент [11]. Кроме того, описаны штаммы *E. casseliflavus* атипичные по другим биохимическим признакам, что крайне затрудняет их фенотипическую идентификацию и вызывает необходимость использования молекулярно-генетических методов [69].

Восстановление ТТХ является классическим тестом для дифференциации вида *E. faecalis*, который интенсивно восстанавливает ТТХ, образуя колонии темно-бордового цвета с металлическим блеском [85], тогда как другие виды образуют светло-розовые колонии. Однако, данный признак свойственен позднее описанным видам *E. gilvus* и *E. canintestini*. Кроме того, важным является правильная интерпретация теста на восстановление ТТХ. Так, колонии видов *E. hirsae*, *E. durans*, *E. gallinarum* часто имеют темно-розовый центр, но их цвет менее интенсивный, чем у колоний *E. faecalis*, и они не имеют характерного металлического блеска [25]. Некоторые штаммы, которые восстанавливают ТТХ, могут образовывать колонии темно-фиолетового цвета [36].

Идентификация энтерококков с использованием тестов на сбраживание углеводов и ферментативную активность может быть осложнена вследствие их значительной фенотипической гетерогенности. Кроме того, стандарты на проведение традиционных тестов отсутствуют, поэтому могут возникать расхождения результатов, полученных разными исследователями, по причине сложности точного воспроизведения тестов в разных лабораториях [46] или использования разных методик [32, 34].

Определенные проблемы традиционной микробиологической идентификации могут быть решены использованием стандартизированных тест-систем. Однако, несмотря на быстроту получения результатов, возникло много споров относительно чувствительности и специфичности этих систем при идентификации энтерококков [10, 38, 43, 66, 84, 86]. Во многих работах было показано, что наиболее точно идентифицируются виды *E. faecalis* и *E. faecium*,

которые чаще всего являются возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний человека. У других видов точность дифференциации может быть меньшей, вследствие чего возникает необходимость проведения дополнительных тестов [18, 41, 50, 63]. Результативность видовой идентификации энтерококков, в частности *E. faecium* и *E. faecalis*, проведенная с использованием простых схем (тесты на пигментацию, восстановление ТТХ, образование кислоты из маннита и раффинозы), была выше (90 %), чем эффективность использования тест-системы API 20 Strep (77 %) [25]. Кроме того, при сравнении результатов, полученных с использованием классических методов, с результатами API-тестирования, достаточно часто наблюдались расхождения по разным свойствам [37, 46, 84].

Наряду с микробиологическими методами идентификации микроорганизмов используются хемотаксономические признаки, в частности жирнокислотный состав клеточных липидов, но данных в литературе относительно использования данного подхода при идентификации энтерококков мало. Эти работы в основном 1970-1980-годов, в которых изучен состав жирных кислот *S. (E.) faecalis* var *zymogenes*, *S. (E.) faecalis* var *liquefaciens*, *S. (E.) faecium* и подвижных видов [3, 5]. Однако, изменения в таксономии энтерококков привели к повышенной заинтересованности исследователей к жирнокислотному составу клеточных липидов энтерококков как дифференциальному видовому признаку при описании типовых штаммов. Для видов *E. gilvus*, *E. pallens*, *E. italicus*, *E. camelliae*, *E. thailandicus* обнаружены жирные кислоты, наличие которых и процентное содержание имеет дифференциальное значение [35, 67, 73, 81].

Широкое привлечение молекулярно-генетических методов позволило преодолеть недостатки фенотипической идентификации, особенно при проведении дифференциации близкородственных видов.

Сиквенирование гена 16S рРНК дает возможность идентифицировать энтерококки на уровне видовых групп и малоэффективно для внутривидовой видовой дифференциации. В связи с этим были предложены альтернативные гены, последовательности которых позволяют более четко дифференцировать отдельные виды. Показано, что сиквенирование гена 23S рРНК может быть более информативным, чем сиквенирование 16S рРНК для определения филогенетического положения. Сравнение последовательностей гена домена V 23S рРНК выявило некоторые различия между штаммами разных видов. Но этот подход также не позволил четко отличить близкородственные виды, такие как *E. hirae* и *E. durans*, а также *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* [78].

Показано, что для видовой идентификации могут быть использованы последовательности транскрибируемых внутренних межгенных спейсерных районов генов 16S-23S и 23S-5S рРНК (ITS1 и ITS2, соответственно) [8, 80]. Для получения максимального различия ITS-ПЦР ампликонов необходимо использовать 6 % неденатурирующий акриламид-бисакриламидный гель. Агарозные гели различной концентрации неспособны адекватно различить ITS-ампликоны [80]. Штаммы отдельных видов энтерококков имеют различные ITS-профили, в основном это два или три основных продукта размером 300-600 п.н. и минорные полосы большего размера. У штаммов *E. gallinarum* и *E. hirae* наблюдалась вариабельность в размере и количестве основных продуктов. *E. gallinarum* выявил наивысшую степень внутривидовой вариабельности [80].

Последовательность гена марганец-зависимой супероксиддисмутазы – *sodA* также является хорошей альтернативой, поскольку обладает большей дифференцирующей способностью, по сравнению с последовательностью гена 16S рРНК. Если гомология последовательности гена 16S рРНК внутри видовых групп может составлять более чем 99 %, то наибольший процент гомологии между последовательностями гена *sodA* не превышает 87,9 % [60]. Были разработаны видоспецифические праймеры, применение которых позволяет идентифицировать 23 вида энтерококков по последовательности гена *sodA* [42].

Ген *atpA*, который кодирует  $\alpha$ -субъединицу фермента АТФ-синтазы, был использован для видовой идентификации энтерококков и также выявил большую дифференцирующую способность, чем ген 16S рРНК. Так, гомологии последовательности гена 16S рРНК 97 % и 99 % между видами энтерококков соответствуют гомологиям последовательности гена *atpA* 74 % и 84 %, соответственно. Максимальная гомология последовательностей гена *atpA*, наблю-



даемая между видовыми группами энтерококков, составляет 92 %. Представители группы «faecium» имеют >98,8 % гомологии последовательности гена 16S рРНК, тогда как по последовательности гена *atpA* – максимум 89,9 % [53]. Также используются последовательности таких генов как ген D-аланин:D-аланин лигазы – *ddl* [56], гены  $\alpha$ -субъединицы бактериальной РНК-полимеразы – *rpoA* и  $\alpha$ -субъединицы фенилаланин тРНК-синтазы – *pheS* [54].

Следует отметить, что поначалу разработка методов молекулярно-генетической идентификации была ориентирована прежде всего на идентификацию видов *E. faecalis* и *E. faecium*, которые доминируют среди возбудителей энтерококковых инфекций [61, 77]. В последние годы внимание исследователей сосредоточено также на изучении видового разнообразия энтерококков, выделенных из различных природных экониш – кишечного тракта человека и животных, пищевых продуктов, растений, грунта, воды. Однако, во многих работах продемонстрирована неточность видовой идентификации микробиологическими методами. Штаммы, которые были идентифицированы по биохимическим признакам с использованием коммерческой тест-системы как представители видов *E. hirae*, *E. durans* или *E. mundtii*, впоследствии были определены как *E. faecium* с использованием молекулярно-генетических методов [57]. Похожие результаты неверной идентификации на основе биохимических тестов близкородственных видов энтерококков были получены с использованием тест-систем API 20 Strep, API Rapid ID 32 Strep и BBL Crystal [7, 40, 42]. В связи с этим возникла потребность в разработке чувствительных и быстрых методов видовой идентификации штаммов энтерококков, выделенных из природных экониш, так как видовое разнообразие в них значительно шире, чем позволяют определить тест-системы и существующие схемы традиционной идентификации [4]. Кроме того, была показана необходимость одновременного использования нескольких молекулярно-генетических методов. Так штаммы, идентифицированные методом ПЦР по последовательности гена *ddl* как *E. faecium*, в то же время по ITS-профиллю и REP-ПЦР были отнесены к виду *E. hirae* [57].

Таким образом, данные литературы показывают, что при проведении видовой идентификации энтерококков необходимо использовать принципы полифазной таксономии, включающие микробиологические, хемотаксономические и различные молекулярно-генетические методы [4, 36, 39, 57].

**І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України*

## **ІДЕНТИФІКАЦІЯ І ТАКСОНОМІЯ ЕНТЕРОКОКІВ**

Резюме

Ентерококи входять в групу молочнокислих бактерій. Широке розповсюдження і різноманіття їх властивостей постійно привертають увагу дослідників. Рід *Enterococcus* є гетерогенною за фенотиповими властивостями групою бактерій. В огляді літератури представлений сучасний стан питання таксономії ентерококів, яка зазнала значних змін за останні десятиріччя. Розглянуті й проаналізовані мікробіологічні методи ідентифікації. Особливу увагу приділено проблемам, які можуть виникнути при ідентифікації ентерококів на рівні роду, а також при диференціації близькоспоріднених видів. Використання молекулярно-генетичних методів ідентифікації ентерококів дозволило подолати недоліки фенотипової ідентифікації представників роду *Enterococcus*. Показана необхідність використання молекулярно-генетичних методів ідентифікації, перераховані основні підходи, обговорено їх переваги й недоліки.

Ключові слова: ентерококи, таксономія, ідентифікація.

**I. L. Garmasheva, N. K. Kovalenko**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **IDENTIFICATION AND TAXONOMY OF ENTEROCOCCI**

S u m m a r y

Enterococci belong to lactic acid bacteria group. Wide distribution and a variety of their properties are of interest for researchers for a long time. Genus *Enterococcus* is a group of bacteria heterogeneous by their phe-

notypic characteristics. The review presented the current status of question concerning enterococci taxonomy that has undergone significant changes during the last decades. Microbiologic methods of identification are considered and analyzed. Special attention was given to the problems that may occur during genus identification of enterococci and during differentiation of closely related species. The use of molecular-genetic methods of identification let to overcome disadvantages of phenotypic identification of bacteria genus *Enterococcus*. The need of the use of molecular methods of identification was shown, basic approaches were listed, their advantages and disadvantages were discussed.

The paper is presented in Russian.

**К е у о р д с:** enterococci, taxonomy, identification.

**The authors address:** I. L. Garmasheva, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Калина А.П. О положении энтерококков в системе микроорганизмов// Журн. микробиол. иммунол. эпидемиол. – 1970. – **47**, № 6. – С. 20–21.
2. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – Москва:– Наука, 1975. – 392 с.
3. Седов В.И., Пинчук Л.М. Состав высших жирных кислот энтерококков // Журн. микробиол. иммунол. эпидемиол.– 1982.– № 9.– С. 49–53.
4. Alves P.I., Martins M.P., Semedo T. et al. Comparison of phenotypic and genotypic taxonomic methods for the identification of dairy enterococci// Antonie van Leeuwenhoek. – 2004. – **85**, N 3. – P. 237 – 252.
5. Amstein C.F., Hartman C.F. Differentiation of some enterococci by gas chromatography// J. Bacteriol. – 1973. – **113**, N 1. – P. 38 – 41.
6. Andrewes F.W., Horder T.J. A study of the streptococci pathogenic for man// Lancet. – 1906. – N 2. – P. 852 – 855.
7. Angeletti S., Lorino G., Gherardi G. et al. Routine molecular identification of enterococci by gene-specific PCR and 16S ribosomal DNA sequencing// J. Clin. Microbiol. – 2001. – **39**, N2. – P. 794 – 797.
8. Baele M., Baele P., Vaneechoutte M. et al. Application of tRNA intergeneric spacer PCR for identification of *Enterococcus* species// J. Clin. Microbiol. – 2000. – **38**, N 11. – P. 4201 – 4207.
9. Bosley G.S., Wallace P.L., Moss C.W. et al. Phenotypic characterization, cellular fatty acid composition and DNA relatedness of *Aerococci* and comparison to related species// J. Clin. Microbiol. – 1990. – **28**, N 3. – P. 416 – 423.
10. Bosshard P.P., Abels S., Zbinden R., Bottger E.C., Zbinden R. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in clinical laboratory// J. Clin. Microbiol. – 2004. – **42**, N 5. – P. 2065 – 2073.
11. Cartwright C.P., Stock F., Fahle C.A., Gill V.J. Comparison of pigment production and motility tests with PCR for reliable identification of intrinsically vancomycin-resistant enterococci// J. Clin. Microbiol. – 1995. – **33**, N 7. – P. 1931–1933
12. Carvalho M.G.S., Shewmaker P.L., Steigerwalt A.G. et al.. *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – **56**, N 7. – P. 1505 – 1508.
13. Chen D.K., Pearce L., McGeer A., Low D.E., Willey B.M. Evaluation of D-xylose and 1% methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside fermentation tests for distinguishing *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecium*// J. Clin. Microbiol. – 2000. – **38**, N 10. – P. 3652 – 3655.
14. Collins M.D., Jones D., Farrow J.A.E. et al. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov.// Int. J. Syst. Bacteriol. – 1984. – **34**, N 2. – P. 220 – 223.
15. Collins M.D. Farrow J.A.E., Jones D. *Enterococcus mundtii* sp. nov.// Int. J. Syst. Bacteriol. – 1986. – **36**, N 1. – P. 8 – 12.
16. Collins M.D., Facklam R.R., Farrow J.A.E., Williamson R. *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov.// FEMS Microbiol. Lett. – 1989. – **48**, N 3 – P. 283 – 288.
17. Collins M.D., Rodrigues U.M., Pigott N.E., Facklam R.R. *Enterococcus dispar* sp. nov., a new enterococcus species from human sources// Lett. Appl. Microbiol. – 1991. – **12**, N 3. – P. 95 – 98.
18. d’Azevedo P.A., Dias C.A., Goncalves A.L. et al. Evaluation of an automated system for the identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci// Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2001. – **40**, N 4. – P. 157 – 161.
19. Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald G.F. et al. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*// Syst. Appl. Microbiol. – 2000. – **23**, N 4. – P. 510 – 522.

20. De Graef E.M., Devriese L.A., Vancanneyt M. et al. Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2003. – **53**, N 4. – P. 1069 – 1074.
21. De Vaux A., Laguerre G., Diviès C., Prévost H. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*)// Int. J. Syst. Bacteriol. – 1998. – **48**, N 2. – P. 383 – 387.
22. Devriese L.A., Van De Kerckhove A., Kilpper-Bälz R., Schleifer K.H. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals// Int. J. Syst. Bacteriol. – 1987. – **37**, N 2. – P. 259 – 275.
23. Devriese L.A., Ceysens K., Rodrigues U.M., Collins M.D. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines// FEMS Microbiol. Lett. – 1990. – **59**, N 3. – P. 247 – 252.
24. Devriese L.A., Pot B., Collins M.D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups// J. Appl. Bacteriol. – 1993. – **75**, N 5. – P. 399 – 408.
25. Devriese L.A., Pot B., Van Damme L. et al. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin// Int. J. Food Microbiol. – 1995. – **26**, N 2. – P. 187 – 197.
26. Devriese L.A., Pot B., Kersters K., Lauwers S., Haesebrouck F. Acidification of methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside: a useful test to differentiate *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecium* species group and from *Enterococcus faecalis*// J. Clin. Microbiol. – 1996. – **34**, N 10. – P. 2607 – 2608.
27. Domig K.J., Mayer H.K., Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration// Int. J. Food Microbiol. – 2003. – **88**, N 2–3. – P. 147 – 164.
28. Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P. Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR// J. Clin. Microbiol. – 1995. – **33**, N 5. – P. 24–27.
29. Eldar A., Ghittino C., Asanta L. et al. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish// Curr. Microbiol. – 1996. – **32**, N 2. – P. 85 – 88.
30. Ennahar, S., Cai Y. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Enterococcus solitarius* Collins et al. 1989 to the genus *Tetragenococcus* as *Tetragenococcus solitarius* comb. nov.// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2005. – **55**, N 2. – P. 589 – 592.
31. Facklam R.R., Hollis D., Collins M.D. Identification of gram-positive cocci and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria// J. Clin. Microbiol. – 1989. – **27**, N 4. – P. 724 – 730.
32. Facklam R., Elliott J.A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci// Clin. Microbiol. Rev. – 1995. – **8**, N 4. – P. 479 – 495.
33. Farrow J.A.E., Collins M.D. *Enterococcus hiraе*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression on young chickens// Int. J. Syst. Bacteriol. – 1985. – **35**, N 1. – P. 73 – 75.
34. Fertally S.S., Facklam R.R. Comparison of physiologic tests used to identify non-beta-hemolytic aerococci, enterococci and streptococci// J. Clin. Microbiol. – 1987. – **25**, N 10. – P. 1845 – 1850.
35. Fortina M.G., Ricci G., Mora D., Manachini P.L. Molecular analysis of artisanal cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov.// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – **54**, N 5. – P. 1717 – 1721.
36. Franzetti L., Pompei M., Scarpellini M., Galli A. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. of different origins// Curr. Microbiol. – 2004. – **49**, N 4. – P. 255 – 260.
37. Garcia Fontan M.C., Franco I., Tornadizo M.E., Carballo J. Identification of enterococci isolated from cow's milk cheese: comparison of the classical methods and the API 20 STREP system (technical note)// Acta Microbiol Immunol Hung. – 2002. – **49**, N 1. – P. 119 – 128.
38. Garcia-Garrote F., Cercenado E., Bouza E. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci// J. Clin. Microbiol. – 2000. – **38**, N 6. – P. 2108 – 2111.
39. Harwood V.J., Delahoua N.C., Ulrich R.M. et al. Molecular conformation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from clinical, faecal and environmental sources// Lett. Appl. Microbiol. – 2004. – **38**, N 6. – P. 476 – 482.
40. Hudson C.R., Fedorka-Cray P.J., Jackson-Hall M.C., Hiott L.M. Anomalies in species identification of enterococci from veterinary sources using a commercial biochemical identification system// Lett. Appl. Microbiol. – 2003. – **36**, N 4. – P. 245 – 250.
41. Iwen P.C., Rupp M.E., Schreckenberger P.C., Hinrichs S.H. Evaluation of the revised MicroScan dried overnight gram-positive identification panel to identify *Enterococcus* species// J. Clin. Microbiol. – 1999. – **37**, N 11. – P. 3756 – 3758.
42. Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci// J. Clin. Microbiol. – 2004. – **42**, N 8. – P. 3558 – 3565.



43. Jones R.N., Marshall S.A., Pfaller M.A. et al. Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy. SCOPE Hospital Study Group// *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 1997. – **29**, N 2. – P. 95 – 102.
44. Kalina A.P. The taxonomy and nomenclature of enterococci// *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1970. – **20**, N 1. – P. 185 – 189.
45. Ke D., Picard F.J., Martineau F. et al. Development a PCR assay for rapid detection of enterococci// *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – **37**, N 11. – P. 3497 – 3503.
46. Knudston L.M., Hartman P.A. Routine procedures for isolation and identification of enterococci and fecal streptococci// *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – **58**, N 9. – P. 3027 – 3031.
47. Koort J., Coenye T., Vandamme P. et al. *Enterococcus hermanniensis* sp. nov., from modified-atmosphere packaged broiler meat and canine tonsils// *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2004. – **54**, N 5. – P. 1823 – 1827.
48. Kusuda R., Kawai K., Salati F. et al. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen// *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1991. – **41**, N 33. – P. 406 – 409.
49. Law-Brown J., Meyers P.R. *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*// *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – **53**, N 3. – P. 683 – 685.
50. Ligozzi M., Bernini C., Bonora M.G. et al. Evaluation of VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci// *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – **40**, N 5. – P. 1681 – 1686.
51. Martinez-Murcia A.J., Collins M.D. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species// *FEMS Microbiol. Lett.* – 1991. – **64**, N 1. – P. 69 – 74.
52. Naser S.M., Vancanneyt M., De Graef E. et al. *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs// *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – **55**, N 5. – P. 2177 – 2182.
53. Naser S.M., Thompson F.L., Hoste B. et al. Phylogeny and identification of enterococci by *atpA* gene sequence analysis// *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – **43**, N 5. – P. 2224 – 2230.
54. Naser S.M., Thompson F.L., Hoste B. et al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes// *Microbiology.* – 2005. – **151**, N 7. – P. 2141 – 2150.
55. Naser S.M., Vancanneyt M., Hoste B. et al. Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei et al. 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan et al. 1979) Collins et al. 1984 and *Enterococcus saccharominimus* Vancanneyt et al. 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina et al. 2004// *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006. – **56**, N 2. – P. 413 – 416.
56. Ozawa Y., Courvalin P., Gaiimand M. Identification of enterococci at the species level by sequencing of the genes for D-alanine:D-alanine ligases// *Syst. Appl. Microbiol.* – 2000. – **23**, N 2. – P. 230 – 237.
57. Pangallo D., Drahovska H., Harichova J. et al. Evaluation of different PCR-based approaches for the identification and typing of environmental enterococci// *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2008. – **93**, N 1–2. – P. 193 – 203.
58. Patel R., Piper K.E., Rouse M.S. et al. Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates// *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – **36**, N 1. – P. 3399 – 3407
59. Pompei R., Berlutti F., Thaller M.C. et al. *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin// *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1992. – **42**, N 3. – P. 365 – 369.
60. Poyart C., Quesnes G., Trieu-Cuot P. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci// *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – **38**, N 1. – P. 415 – 418.
61. Quednau M., Ahrné S., Petersson A.C., Molin G. Identification of clinically important species of *Enterococcus* within 1 day with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)// *Curr. Microbiol.* – 1998. – **36**, N 6. – P. 332 – 336.
62. Rodrigues U., Collins M.D. Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing// *FEMS Microbiol. Lett.* – 1990. – **59**, N 1–2. – P. 231 – 234.
63. Ruoff K.L., De La Maza L., Murtagh M.J. et al. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens// *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – **28**, N 3. – P. 435 – 437.
64. Schleifer K. H., Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov// *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1984. – **34**, N 1. – P. 31 – 34.
65. Sherman J.M. The streptococci// *Bacteriol. Rev.* – 1937. – **1**, N 1. – P. 3 – 97.
66. Singer D.A., Jochimsen E.M., Gielerak P., Jarvis W.R. Pseudoutbreak of *Enterococcus durans* infections

- and colonization associated with introduction of an automated identification system software update// J. Clin. Microbiol. – 1996. – **34**, N 11. – P. 2685 – 2687.
67. Sukontasing S., Tanasupawat S., Moonmangmee S. et al. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – **57**, N 9.—P. 2151 – 2154.
  68. Švec P., Devriese L.A., Sedláček I. et al. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – **51**, N 4. – P. 1567 – 1574.
  69. Švec P., Devriese L.A., Sedláček I. et al. Characterization of yellow-pigmented and motile enterococci isolated from intestines of the garden snail *Helix aspersa*// J. Appl. Microbiol. – 2002. – **92**, N 5. – P. 951 – 957.
  70. Jbvec P., Vancanneyt M., Devriese L.A. et al. *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2005. – **55**, N 5. – P. 2183 – 2187.
  71. Jbvec P., Vancanneyt M., Koort J. et al. *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2005. – **55**, N 6. – P. 2479 – 2484.
  72. Švec P., Vancanneyt M., Sedláček I. et al. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov.// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – **56**, N 3. – P. 577 – 581.
  73. Tanasupawat S., Sukontasing S., Lee J.-S. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – **58**, N 7. – P. 1630–1634.
  74. Teixeira L.M., Carvalho M.G.S., Espinola M.M.B. et al. *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus rattii* sp. nov., associated with enteric disorders in animals// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – **51**, N 5. – P. 1737 – 1743.
  75. Thiercelin E. Morphologie et modes de reproduction de l'enterocoque// Compt. Rend. Soc. Biol. – 1899. – **51**. – P. 551 – 553.
  76. Thiercelin E., Jouhaud L. Reproduction de l'enterocoque; taches centrales; granulations peripheriques et microblastes// C. R. Seances Soc. Biol. Paris. – 1903. – **55**. – P. 686 – 688.
  77. Tsai J.-C., Hsueh P.-R., Lin H.-M. et al. Identification of clinically relevant *Enterococcus* species by direct sequencing of *groES* and spacer region// J. Clin. Microbiol. – 2005. – **43**, N 1. – P. 235 – 241.
  78. Tsiodras S., Gold H.S., Coakley E.P.G. et al. Diversity of domain V of 23S rRNA gene sequence in different *Enterococcus* species// J. Clin. Microbiol. – 2000. – **38**, N 11. – P. 3991 – 3993.
  79. Turenne C.Y., Hoban D.J., Karlowsky J.A. et al. Screening of stool samples for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates should include the methyl-alpha-D-glucopyranoside for differentiate non-motile *Enterococcus gallinarum* from *E. faecium*// J. Clin. Microbiol. – 1998. – **36**, N 8. – P. 2333 –2335.
  80. Tyrrell G.J., Bethune R.N., Willey B., Low D.E. Species identification of enterococci via intergeneric ribosomal PCR// J. Clin. Microbiol. – 1997. – **35**, N 5. – P. 1054 – 1060.
  81. Tyrrell G.J., Turnbull L., Teixeira L.M. et al. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens// J. Clin. Microbiol. – 2002. – **40**, N 4. – P. 1140 – 1145.
  82. Vancanneyt M., Snauwaert C., Cleenwerck J. et al. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – **51**, N 2. – P. 393 – 400.
  83. Vancanneyt M., Zamfir M., Devriese L.A. et al. *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – **54**, N 6. – P. 2175 – 2179.
  84. Velasco D., Perez S., Peña F. et al. Lack of correlation between phenotypic techniques and PCR-based genotypic methods for identification of *Enterococcus* spp.// Diagn Microb. Infect. Dis. – 2004. – **49**, N 3. – P. 151 –156.
  85. Waitkins S.A. Use of pyruvate fermentation compared with tetrazolium reduction in the differentiation of group D streptococci// J. Clin. Pathol. – 1978. – **31**, N 7. – P. 692 – 695.
  86. Wilke W.W., Marshall S.A., Coffman S.L. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus*: molecular epidemiology, species identification error and frequency of occurrence in a national resistance surveillance program // Diagn. Microbiol. Infect. – 1997. – **29**, N 1. – P. 43 – 49.
  87. Williams A.M., Farrow J.A.E., Collins M.D. Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*// Lett. Appl. Microbiol. – 1989. – **8**. – P. 185 – 189.
  88. Williams A.M., Rodrigues U.M., Collins M.D. Intergeneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA// Reseach Microbiol. – 1991. – **142**, N 1. – P. 67 – 74.

Отримано 16.09.2009