

14. Skorodumov, D.I. Subbotin, V.V. Sidorov, M.A., & Kostenko, T.S. (1980). *Mikrobiologicheskaya diagnostika bakterialnykh infektsiy zhivotnykh [Microbiological diagnostics of bacterial infections of animals]*. Moscow: Izograf [in Ukrainian].

15. Romanenko, V.P. (2004). Genetichni zakonomirnosti evolyutsii mikobakteriy tuberkulozu [Genetic patterns of Mycobacterium tuberculosis evolution]. *Veterynarna medycyna – Veterinary medicine*, 84, 612-615 [in Ukrainian].

УДК 636:612.017.11/.12

DOI: 10.31073/vet_biotech36-02

ГАРКАВЕНКО Т.О., канд. вет. наук, старш. наук. співроб., e-mail: tag77@i.ua,

ГОРБАТЮК О.І., канд. вет. наук, доцент, e-mail: goroliva@ukr.net,

КОЗИЦЬКА Т.Г.*, e-mail: megamicrob@ukr.net,

АНДРІЯЩУК В.О., канд. вет. наук, e-mail: and_valentina@hotmail.com,

ДИБКОВА С.М., канд. біол. наук, старш. наук. співроб., e-mail: sdybkova@gmail.com

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

ВИЯВЛЕННЯ ВАНКОМІЦИН-РЕЗИСТЕНТНИХ ШТАМІВ (VRE) З VanA I VanB-ФЕРМЕНТАМИ СЕРЕД ПОЛЬОВИХ ІЗОЛЯТІВ ENTEROCOCCUS SPP., ОДЕРЖАНИХ ІЗ ЗРАЗКІВ ПИТНОЇ ВОДИ

Ентерококи являються представниками нормальної мікрофлори кишківника у людей та тварин, але в останні роки науковцями багатьох країн світу відмічено зростання ролі цих мікроорганізмів у виникненні гнійно-септичних інфекцій, що ускладнюються природною резистентністю штамів Enterococcus spp. до деяких груп антибіотиків та швидким розповсюдженням набутої резистентності до нових антибактеріальних препаратів.

В статті наведено результати досліджень з вивчення антибіотикочутливості польових ізолятів Enterococcus spp., виділених із зразків питної води. Встановлена їх поліантибіотикорезистентність, виявлені VRE-штами, серед яких була підтверджена продукція VanA- і VanB-ферментів, що підтверджувала набуті механізми резистентності.

Ключові слова: *Enterococcus spp., антибіотикорезистентність, VRE-штами Enterococcus spp., VanA-продукуючі штами Enterococcus spp., VanB-продукуючі Enterococcus spp.*

Вступ. Бактерії роду *Enterococcus* є облигатними представниками шлунково-кишкової мікрофлори ссавців. Проте, в сучасних умовах за антропогенного тиску, ентерококи є потенційними патогенними

* Здобувач

мікроорганізмами та мають провідне значення в етіології і патогенезі інфекцій у тварин, зокрема маститів у корів, інфекцій статевих органів, септичних станів та ендокардитів. Бактерії роду *Enterococcus* досить поширені у довкіллі [1–6].

Таксономія ентерококів зазнала значних змін у процесі їхнього вивчення та удосконалення методів діагностики і ідентифікації. Вперше назва «ентерококи» була застосована в 1899 р. (E. Thiercelin, 1899) для грампозитивних диплококів, виділених з кишечника. В 1903 р. була запропонована назва нового роду – *Enterococcus* (E. Thiercelin і L. Jouhaud, 1903). В 1906 р. назву «ентерокок» замінили на *Streptococcus faecalis* (F.W. Andrewes і T.J. Horder, 1906). В 1937 р. була запропонована класифікація роду *Streptococcus* (J.M. Sherman, 1937), яка за цією класифікацією поділялася на 4 групи: «ентерококи», «молочні» стрептококи, «віриданс» стрептококи і «піогенні» стрептококи. В 1984 р. були виявлені суттєві генетичні відмінності між стрепто- і ентерококами, тому «ентерококи» були виділені в рід *Enterococcus* (Schleifer K.H., Kilpper-Balz R., 1984), а у 2001 р. ентерококи були виділені в самостійну родину *Enterococcaceae* (Скородумов Д.И. и др., 2005). Нині рід *Enterococcus* включає понад 47 видів мікроорганізмів (Brtkova A. et al., 2010) [7–9].

На сучасному етапі розвитку та за розробки і вдосконалення методів діагностики у ентерококів виявлені різні фактори патогенності, які сприяють розвитку інфекційного процесу. Такі фактори патогенності у бактерій роду *Enterococcus* представлені:

- поверхневими білками, які сприяють процесам адгезії і інвазії;
- екскрецією токсинів і білків, які забезпечують пошкодження тканин;
- секрецією білків, які забезпечують стійкість до антимікробних препаратів (АМП);
- секрецією факторів, які індукують запальні процеси.

Патогенність ентерококів пов'язана з їхньою природною резистентністю та чітко вираженою набутою резистентністю до широкого спектру АМП [10–13]. Не зважаючи на те, що мікроорганізми *Enterococcus spp.* є невід'ємною частиною нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту тварин і людини, нині різко зростає їхнє клінічне значення, як збудників зоонозів, поширених і тяжко перебігаючих інфекцій. Одним із основних потенційних джерел ентерококів є вода, як головний компонент біосфери, що підтримує життєдіяльність всіх живих істот, включаючи мікроорганізми, зокрема роду *Enterococcus*. Тому, основними забруднюючими складовими поверхневих і ґрунтових вод, крім органічних і неорганічних речовин, є патогенні мікроорганізми, в т. ч. ентерококи. Роль ентерококів у сучасній інфекційній патології тварин і людини різко зросла. Причиною поширеності патогенних *Enterococcus spp.*, як встановлено, є не лише

набуті гемолітичні властивості, а й набуття ними стійкості до переважної більшості АМП [17–23]. Слід звернути увагу на те, що останнім часом з'являються повідомлення про те, що бактерії *Enterococcus spp.* мають властивість формувати біоплівки. Утворення таких біоплівок підвищує толерантність цих патогенів до імунної системи організму тварини чи людини, до АМП, до стресів зовнішнього середовища та може проявлятися повною резистентністю до факторів, які в планктонному стані знищують ентерококів. Встановлено, що нині біоплівко-позитивні штами *Enterococcus spp.* виділяють за перебігу хронічних інфекцій більше як у 80% випадків [24, 25].

Тому, актуальність вивчення у *Enterococcus spp.* рівня резистентності до АМП є очевидною, оскільки доведено, що резистентні до антибіотиків ентерококи передаються людині від тварин, через контаміновану сировину і продукцію тваринної і птахівничої галузей та об'єкти довкілля [14–16].

Нині найбільш обґрунтованим є комплекс підходів щодо оцінки чутливості до АМП і інтерпретації результатів, запропонованих Європейським комітетом по визначенню чутливості до антимікробних препаратів – EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), до якого приєдналася і Україна. У 2015 р. був створений Національний комітет з тестування чутливості до протимікробних препаратів – UCAST під егідою Міжнародного центру медичних наук, Української спілки епідеміології, Української спілки з інфекційних захворювань із широким представництвом вчених з дисциплін інфекційних захворювань, лабораторної практики, фармакології і фармакодинаміки. Метою UCAST є взаємодія вчених, ветеринарних і медичних товариств та інших організацій у процесах протимікробного тестування EUCAST та визначення і розробка інтерпретуючих критеріїв у галузі ветеринарної медицини відповідно до вимог EUCAST. Тому, наразі в Україні проводиться активний бактеріологічний моніторинг щодо виявлення зоонозних агентів та визначення їхньої чутливості до АМП згідно Оперативного плану реалізації державної політики зі стримування розвитку стійкості до протимікробних препаратів на 2018–2022 рр. шляхом проведення бактеріологічному моніторингу основних зоонозних патогенів, в т. ч. і бактерій роду *Enterococcus*, з визначенням їхньої стійкості та виявлення механізмів резистентності до антибіотиків.

Метою роботи було визначення спектру антибіотикочутливості клінічних ізолятів *Enterococcus spp.*, виявлення ванкоміцин-резистентних ентерококів (vancomycin-resistant enterococcus (VRE) та підтвердження продукування ними VanA- і VanB-ферментів.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження були проведені в науково-дослідному бактеріологічному відділі Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи.

Дослідженням підлягали 14 штамів *Enterococcus spp.*, які були ізольовані, ідентифіковані за проведення пасивного бактеріологічного моніторингу з виявлення збудників зоонозів, визначенням їхньої чутливості та виявлення набутих механізмів резистентності до АМП. В процесі ідентифікації за постановки тесту виявлена нерухливість всіх дослідних штамів ентерококів.

14 дослідних ізолятів *Enterococcus spp.* були виділені із зразків питної води: 3 штами («1/125», «4/128», «5/129») із артезіанської свердловини; 1 штам («2/126») із водопроводу у харчоблоці; 2 штами («3/127», «7/250») із загального водопроводу; 1 штам («6/249») із резервуара питної води; 4 штами («9/271», «10/272», «11/273», «12/274») із водопровідної мережі дошкільних навчальних закладів; 1 штам («8/251») із резервуара (бачка з водою) питної води в торгівельному павільйоні з продажу шаурми; 2 штами («13/302», «14/303») із мережі водопостачання загально-освітніх закладів.

Дослідження з визначення чутливості дослідних клінічних ізолятів *Enterococcus spp.* і одержання антибіотикограми проводили диско-дифузійним (ДДМ) методом з використанням дисків з антибіотиками згідно рекомендацій EUCAST (мкг/диск): амоксиклав (10,0), ампіцилін (2,0), ципрофлоксацин (5,0), імipенем (10,0), левофлоксацин (5,0), лінезолід (10,0), норфлоксацин (10,0), триметоприм (5,0), тейкопланін (30,0), ванкоміцин (5,0) на агарі Мюллера-Хінтона.

Для виявлення ванкоміцинрезистентних штамів *Enterococcus spp.* (VRE) проводили аналіз одержаної антибіотикограми, зокрема за результатами досліджень чутливості до ванкоміцину. Для виявлення VRE-штамів польових ізолятів інтерпретацію результатів проводили за результатами прояву чутливості або резистентності до ванкоміцину (5 мкг/диск) з критеріями оцінки, мм: Ч < 12; Р > 12.

Клінічно значима резистентність опосередковується плазмідокерованими vanA- і vanB-лігазами, які замінюють аланін (D-Ala) на лактат (D-Lac) у пептидоглікані, що призводить до різкого зменшення зв'язування глікопептидів з «мішенню» внаслідок чого бактерії ентерококів стають нечутливими до дії АБП, тобто штами набувають механізмів захисту (механізмів набутої резистентності).

Виявлення механізмів набутої резистентності (VanA- і VanB-лігаз) у VRE-штамів, виявлених серед польових ізолятів *Enterococcus spp.*, проводили згідно методології EUCAST за результатами дії тейкопланіну (30 мкг/диск) на означені штами з критеріями оцінки, мм: Ч < 16; Р > 16. Інтерпретація результатів зводилася до виявлення продукування VanA-ферменту за виявлення резистентності до ванкоміцину та тейкопланіну; продукування VanB-ферменту – за виявлення резистентності до ванкоміцину та чутливості до тейкопланіну у дослідних VRE-штамів серед польових ізолятів ентерококів.

В якості контрольного штаму для перевірки якості проведених досліджень був використаний *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, чутливий до ванкоміцину.

Методи досліджень: мікробіологічні, статистичні.

Результати досліджень та їх обговорення. Аналіз результатів досліджень з визначення чутливості *Enterococcus spp.* до АМП показав, що 10 штамам, із 14 досліджених, була притаманна чутливість до всіх застосованих антибіотиків, що складає 71,5%.

У *Enterococcus spp.* штам «10/272», виділеного із зразків води водопровідної мережі дошкільних навчальних закладів, була виявлена полірезистентність до антибактеріальних препаратів, оскільки він проявляв стійкість до імпіпенему, левофлораксацину, тейкопланіну і ванкоміцину (табл. 1).

Таблиця 1

Діаметри зон інгібування росту дослідних клінічних ізолятів *Enterococcus spp.* та інтерпретація результатів за EUCAST, мм, $M \pm m$, $n=3$

Назва штамів	Диски з антибіотиками та їхні концентрації на диску, мкг/диск:																			
	Амоксіклав (10)		Ампіцилін (2)		Ципрофлоксацин (5)		Іміпенем (10)		Левовфлоксацин (5)		Лінезолід (10)		Норфлоксацин (10)		Триметопрім (5)		Тейкопланін (30)		Ванкоміцин (5)	
	Контрольний шта́м (за EUCAST) (облік та інтерпретація результатів)																			
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Ч<	Р>	Ч<	Р>	Ч<	Р>	Ч<	Р>	Ч<	Р>	Ч<	Р>	Ч<	Р>	Ч<	Р>	Ч<	Р>	Ч<	Р>
	10±0,1	8±0,3	10±0,1	8±0,2	15±0,1	15±0,2	21±0,1	18±0,3	15±0,1	15±0,3	19±0,3	19±0,7	12±0,1	12±0,1	50±1,7	21±0,3	16±0,1	16±0,1	12±0,3	12±0,1
Дослідні штами (облік та інтерпретація результатів)																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. «1/ 125»	22±1,0	Ч	23±0,3	Ч	27±1,3	Ч	22±0,3	Ч	20±1,3	Ч	26±0,3	Ч	19±0,3	Ч	22±0,2	Ч	17±0,3	Ч	14±1,0	Ч

(продовження таблиці 1)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2. «2/126»	22±0,3	Ч	30±0,3	Ч	20±0,7	Ч	20±0,3	Ч П	19±0,7	Ч	28±0	Ч	16±0,7	Ч	21±0,3	Ч	17±0,3	Ч	14±1,7	Ч
3. «3/127»	23±0,3	Ч	30±0,3	Ч	21±0,3	Ч	20±0,7	Ч П	19±0,3	Ч	28±0,7	Ч	17±0,3	Ч	25±0,3	Ч	18±1,7	Ч	12±1,7; край зони розмиті	Р
4. «4/128»	25±0,7	Ч	28±0	Ч	25±0	Ч	24±1,3	Ч	22±0,3	Ч	30±0,7	Ч	19±0,7	Ч	36±0,7	Ч	20±0,2	Ч	18±0,7	Ч
5. «5/129»	25±0,3	Ч	28±0,7	Ч	25±0,3	Ч	24±1,7	Ч	22±0,3	Ч	30±0,3	Ч	20±0,7	Ч	31±0,3	Ч	21±0,3	Ч	18±0,3	Ч
6. «6/249»	24±0,7	Ч	27±0,3	Ч	22±0,3	Ч	23±0,7	Ч	22±0	Ч	28±0,3	Ч	20±0,7	Ч	25±0,7	Ч	16±0,7; край зони розмиті	Р	12±0,7; край зони розмиті	Р
7. «7/250»	24±0,3	Ч	30±0,3	Ч	25±0,3	Ч	23±0,7	Ч	19±0,3	Ч	31±0,3	Ч	16±0,3	Ч	33±1,3	Ч	19±0	Ч	16±0,3; край зони розмиті	Р
8. «8/251»	22±0,3	Ч	26±1,0	Ч	21±0,7	Ч	23±0,3	Ч	20±0,3	Ч	28±0,3	Ч	20±1,3	Ч	25±0,7	Ч	17±0,3	Ч	14±0,3	Ч
9. «9/271»	23±1,3	Ч	29±0,3	Ч	20±0,3	Ч	21±0,3	Ч	19±1,7	Ч	30±0	Ч	16±0,3	Ч	21±0,3	Ч	17±0,3	Ч	14±1,7	Ч

(продовження таблиці 1)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
10. «10/272»	21±0	Ч	26±0,3	Ч	18±0,3	Ч	18±0,3; краї зони розмиті	Р	15±0,3; краї зони розмиті	Р	28±1,3	Ч	16±0,3	Ч	23±0,3	Ч	16±0,7; краї зони розмиті	Р	12±1,0; краї зони розмиті	Р
11. «11/273»	25±0,3	Ч	29±1,3	Ч	26±0,3	Ч	26±0,7	Ч	21±0,3	Ч	33±0,3	Ч	20±0	Ч	33±0,3	Ч	21±0	Ч	19±0,3	Ч
12. «12/274»	26±0,3	Ч	30±0,3	Ч	27±0,3	Ч	26±0,3	Ч	22±0	Ч	32±0,3	Ч	22±0,3	Ч	35±0,2	Ч	21±0,3	Ч	19±0,7	Ч
13. «13/302»	25±0	Ч	31±0,7	Ч	26±0,3	Ч	25±0,3	Ч	22±0,3	Ч	34±0,3	Ч	18±0,3	Ч	35±0	Ч	20±0,3	Ч	17±0,3	Ч
14. «14/303»	25±0,3	Ч	28±0,3	Ч	21±0,3	Ч	22±0	Ч	18±0,3	Ч	28±0,3	Ч	17±0,17	Ч	22±1,7	Ч	18±0,3	Ч	15±0,3	Ч

Примітки: Ч – чутливий; Р – резистентний; ПЧ – помірно-чутливий. * За обліку результатів за EUCAST ретельно оцінюють краї зони інгібування росту – чіткі, розмиті, наявність мікроколоній всередині зони. Чіткі краї зони інгібування росту із відповідними розмірами їхніх діаметрів свідчать про чутливість ізоляту; розмиті краї зон або ріст колоній всередині зони свідчать про резистентність штаму до АМП, незалежно від її діаметра. За великих розмірів діаметрів зон інгібування росту чутливість дослідного штаму до АМП повинна бути перевірена шляхом визначення МІК.

Не зважаючи діаметри зон інгібування росту, які в описаних випадках знаходилися на нижній граничній межі чутливості, самі краї зон не мали чітко виражених меж, була вираженою «розмитість».

Згідно EUCAST ізоляти *Enterococcus spp.* з розмитими краями визначають, як резистентні. Зважаючи на такі умови, *Enterococcus spp.* штами «3/127», «6/249», «7/250» і «10/272» була виявлена резистентність до ванкоміцину, що підтверджувало їхню належність до VRE та вказувало на потенційну небезпеку для тварин і людей, зважаючи на їх швидке поширення, колонізацію об'єктів та обмежені варіанти щодо лікування інфікованих (рис. 1).

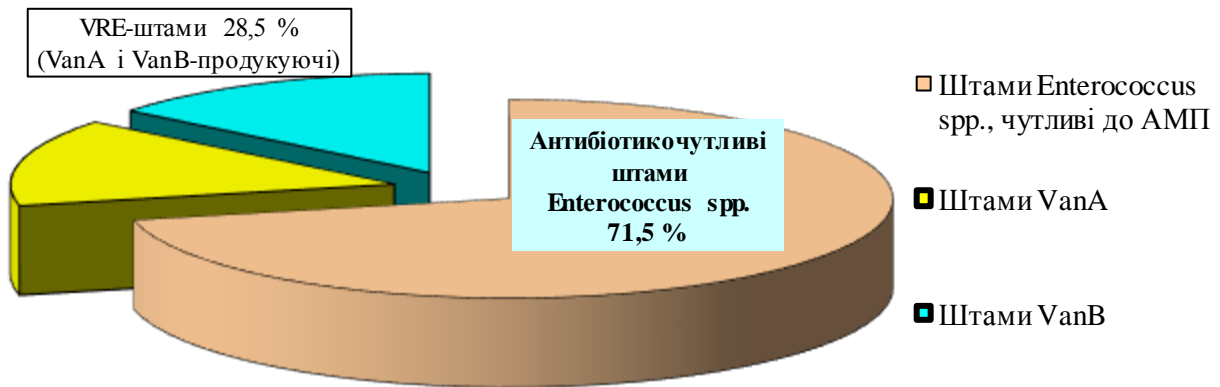


Рис. 1. Рівень резистентності польових ізолятів *Enterococcus* spp. до застосованих АБП та частка виявлених VRE.

Серед визначених 4 VRE-штамів дослідних польових ізолятів ентерококів була виявлена резистеність до тейкопланіну у 2 штамів – «6/249» і «10/272», що підтверджувало продукування ними VanA-ферментів. Інших 2 VRE-штами «3/127» і «7/250» були резистентними до ванкоміцину та чутливими до тейкопланіну, що підтверджувало продукцію ними VanB-ферментів. Одержані результати досліджень стосовно виявлення VanA- і VanB-ферментів у визначених 4 VRE-штамів дослідних польових ізолятів *Enterococcus* spp. вказувало на набуті ними плазмідно-опосередковані механізми резистентності, які передаються шляхом горизонтального перенесення генів.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Виявлено 71,5% чутливих штамів до застосованих АБП серед 14 польових ізолятів *Enterococcus* spp. Виявлено 4 VRE-штами (ванкоміцинрезистентних) – «3/127», «6/249», «7/250» і «10/272», серед 14 польових ізолятів *Enterococcus* spp., які складали 28,5%.

2. Серед дослідних 4 штамів VRE: 1-у штаму («10/272») була притаманна полірезистентність (до іміпенему, левофлоксацину, ванкоміцину та тейкопланіну); 2-ом штамам – VanA-продукуючі властивості («6/249», «10/272»); 2-ом штамам – VanB-продукуючі властивості («3/127», «7/250»).

3. Частота виділення VRE-штамів серед польових ізолятів *Enterococcus* spp., із набутими механізмами захисту, опосередкованими продукуванням VanA- і VanB-ферментів, з об'єктів довкілля підтверджує необхідність обов'язкового проведення бактеріологічного моніторингу щодо збудників зоонозів, визначення рівня їхньої чутливості до АМП та виявлення у

них набутих механізмів резистентності, як таких, що є потенційно небезпечними для здоров'я і життя тварин і людини.

Перспектива подальших досліджень полягає у вивченні рівня стійкості до АМП у плівкоутворюючих штамів *Enterococcus spp.* та вирішення проблеми її подолання.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Yuen G.J. Enterococcus infection biology: Lessons from invertebrate host models / G.J. Yuen, F.M. Ausubel // J. Microbiol. – 2014. – Vol. 52. – No. 3. – P. 200–210.
2. Chung, Y.S., Kwon, K.H., Shin, S., Kim, J.H., Park, Y.H., & Yoon, J.W. Characterization of Veterinary Hospital-Associated Isolates of Enterococcus Species in Korea // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 24. – No 3. – P. 386–393.
3. Значение энтерококков в современной патологии человека и животных / М.И. Петрова, Т.Н. Гуменюк, Н.М. Колычев [и др.] // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: материалы VIII Сиб. ветеринар. конф. – Новосибирск, 2008. – С. 251–254.
4. Бондаренко В.М. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции / В.М. Бондаренко, А.Н. Суворов. – М.: Медицина, 2007. – 30 с.
5. Вальшев А.В. Факторы патогенности энтерококков кишечной микрофлоры человека / А.В. Вальшев, Н.В. Герцен // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2012. – № 4. – С. 41–44.
6. Byappanahalli M.N. Enterococci in the environment / M.N. Byappanahalli, M.B. Nevers, A. Korajkic [et al.] // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2012. – Vol. 76. – P. 685–706.
7. Гармашева И.Л. Идентификация и таксономия энтерококков / И.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко // Мікробіологічний журнал. – 2010. – № 5. – С. 49–54.
8. Dworniczek E. Enterococcus – virulence and susceptibility to photodynamic therapy of clinical isolates from Lower Silesia, Poland / E. Dworniczek, J. Piwowarczyk, A. Seniuk [et al.] // Scand. J. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 46. – No. 12. – P. 846–853.
9. Brtkova A. Characterization of enterococci of animal and environmental origin using phenotypic methods and comparison with PCR based methods // A. Brtkova, M. Filipova, H. Drahovska [et al.] // Veterinarni Medicina. – 2010. – Vol. 55. – No. 3. – P. 97–105.
10. Бондаренко В.М. «Острова» патогенности бактерий / В.М. Бондаренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2001. – № 4. – С. 67–74.
11. Бухарин О.В. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков / О.В. Бухарин, И.В. Вальшева, О.Л. Карташова, М.В. Сычёва // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2013. – № 3. – С. 12–18.
12. Пошвина Д.В. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков, выделенных от животных / Д.В. Пошвина // дис. ... канд. биол. наук. – Оренбург, 2015. – 119 с.
13. Jiménez E. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk / E. Jiménez, V. Ladero, I. Chico [et al.] // BMC Microbiology. – 2013. – Vol. 13. – P. 288–300.
14. Бухарин О.В. Механизмы выживания энтерококков в организме хозяина / О.В. Бухарин, С.И. Билимова, К.Л. Чертков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2002. – № 3. – С. 100–106.

15. Красная Ю.В. Значение бактерий рода *Enterococcus* в жизнедеятельности человека / Ю.В. Красная, А.С. Нестеров, Н.И. Потатуркина-Нестерова // Современные проблемы науки и образования [электронный журнал]. – 2014. – № 6.
16. Колычев Н.М. Энтерококковая инфекция у телят / Н.М. Колычев, М.И. Петрова // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2009. – № 4. – С. 56–58.
17. Габриэлян Н.И. Энтерококки как возбудители послеоперационных инфекционных осложнений / Н.И. Габриэлян, Е.М. Горская, Т.С. Спирина, Т.Б. Преображенская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2007. – № 4. – С. 50–53.
18. Габриэлян Н.И. Факторы риска и нозокоминальные инфекции, вызываемые энтерококками / Н.И. Габриэлян, Е.М. Горская, О.М. Цирульникова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – Т. XVII, № 2. – 2015. – С. 64–69.
19. Сидоренко С.В. Результаты многоцентрового исследования антибиотикочувствительности энтерококков / С.В. Сидоренко, С.П. Резван, С.А. Грудина [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 43(9). – С. 9–17.
20. Колычев Н.М. Сперма быков как фактор передачи энтерококковой инфекции / Н.М. Колычев, М.И. Петрова, Л.И. Лазарева // Ветеринария. – 2006. – № 11. – С. 23–25.
21. Демиховская Е.В. Ванкомицин-резистентные энтерококки как возбудители внутрибольничных инфекций / Е.В. Демиховская // Болезни и антибиотики [электронный журнал]. – 2013. – № 1(8).
22. Champagne J. Development of a DNA Microarray for Enterococcal Species, Virulence, and Antibiotic Resistance Gene Determinations among Isolates from Poultry / J. Champagne, M.S. Diarra, H. Rempel [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77. – No. 8. – P. 2625–2633.
23. Бухарин О.В. Механизмы устойчивости энтерококков к антимикробным белкам и пептидам / О.В. Бухарин, А.В. Валышев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2012. – № 5. – С. 89–94.
24. Афиногенова А.Г. Микробные биоплёнки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3 (61). – С. 119–125.
25. Бухарин О.В. Ассоциативный симбиоз / О.В. Бухарин, Е.С. Лобакова, Н.В. Немцева, С.В. Черкасов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 264 с.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВАНКОМИЦИН-РЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ (VRE) ИЗ VanA И VanB-ФЕРМЕНТАМИ СРЕДИ ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ *Enterococcus spp.*, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ / Гаркавенко Т.А., Горбатюк О.И., Козицкая Т.Г., Андрияшук В.А., Дыбкова С.Н.

*Энтерококки являются представителями нормальной микрофлоры кишечника у людей и животных, но в последние годы учеными многих стран мира отмечен рост роли этих микроорганизмов в возникновении гнойно-септических инфекций, они также усложняются естественной резистентностью штаммов *Enterococcus spp.* к некоторым группам антибиотиков и быстрым распространением приобретенной резистентности к новым антибактериальным препаратам.*

*В статье приведены результаты исследований по изучению антибиотикочувствительности полевых изолятов *Enterococcus spp.*, полученных из образцов питьевой воды. Установлена полиантибиотикорезистентность среди полевых*

изолятов *Enterococcus* spp., виявлені VRE-штамми, серед яких була підтверджена продукція VanA- і VanB-ферментів, що свідечувало про присутність придбаних механізмів резистентності.

Ключевые слова: *Enterococcus* spp., антибіотикорезистентність, VRE-штамми *Enterococcus* spp., VanA-продуцуючі штамми *Enterococcus* spp., VanB-продуцуючі штамми *Enterococcus* spp.

DETERMINATION OF VANCOMICIN- RESISTANT STRAINS (VRE) WITH VanA AND VanB ENZYMES AMONG FIELD ISOLATES OF *Enterococcus* spp., OBTAINED FROM DRINKING WATER SAMPLES / Garkavenko T.A., Gorbatiuk O.I., Kozitska T.G., Andriyashchuk V.O., Dibkova S.M.

Introduction. The role of enterococci in current infectious pathology of animals and humans has increased dramatically. It has been proven that antibiotic resistant enterococci transmitting to humans through close contact with animals, via contaminated raw materials and products from the animal and poultry industries and environmental objects, including drinking water. The relevance of the study of *Enterococcus* spp. level of resistance to antimicrobials (AMP) is apparent because of the potential risks of infecting animals and humans with such pathogens.

The goal of the work was to determine the spectrum of antibiotic sensitivity of clinical isolates of *Enterococcus* spp., to identify among them VRE-strains and to confirm the production of VanA- and VanB-enzymes.

Materials and methods. 14 field isolates of *Enterococcus* spp. isolated from drinking water samples in the Odessa region were investigated. Sensitivity determination of experimental clinical isolates of *Enterococcus* spp. was performed by a disc-diffusion method using antibiotic disks according to EUCAST recommendations.

Results of research and discussion. Analysis of the results of studies to determine the sensitivity of *Enterococcus* spp. to AMP showed that 10 strains, from the studied 14, had sensitivity to all used antibiotics, that was 71,5% of all enterococcal isolates. Polyantibiotic resistance was established in 1 strain because it was insensitive to imipenem, levofloxacin, teicoplanin, and vancomycin. Among 4 strains belonging to the VRE were identified. Among them, 2 strains confirmed the production of VanA-enzymes and in 2 strains the production of VanB-enzymes.

Conclusions and prospects for further research.

1. Among the 14 clinical isolates of *Enterococcus* spp. 4 VRE strains were detected, which accounted for 28.5% of the studied.

2. Among the VRE strains of *Enterococcus* spp. 2 VanA-producing strains and 2 VanB-producing strains, 1 strain was characterized by polyresistance.

3. Frequency of selection of VRE strains of *Enterococcus* spp. from environmental sites confirms the necessity of obligatory bacteriological monitoring of zoonotic pathogens, determination of their sensitivity to AMP and identification of acquired mechanisms of resistance.

The prospect of further research is to study the level of resistance to AMP at film-forming strains of *Enterococcus* spp.

Keywords: *Enterococcus* spp., antibiotic resistance, VRE-strains of *Enterococcus* spp., VanA-producing strains of *Enterococcus* spp., VanB-producing *Enterococcus* spp.

REFERENCES

1. Yuen, G.J., & Ausubel, F.M. (2014). Enterococcus infection biology: Lessons from invertebrate host models. *Journal of Microbiology*, Vol. 52, 3, 200-210.
2. Chung, Y.S., Kwon, K.H., Shin, S., Kim, J.H., Park, Y.H., & Yoon, J.W. (2014). Characterization of Veterinary Hospital-Associated Isolates of Enterococcus Species in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 24, 3, 386-393.
3. Petrova, M.I., Humenuk, T.N., Kolychev, N.M., & Domraheva, M.Y. (2008). Znachenie jenterokokkov v sovremennoj patologii cheloveka i zhyvotnyh [Importance of enterococci in a modern pathology of the people and animals]. *Aktualnye voprosy veterinarnoj medicyny: materialy VIII Sib. veterinarn. Konf. – Proceedings from The actual issues of veterinary medicine: materials of the VIII Siberian Veterinary Conference*. (pp. 251-254). Novosibirsk [in Russian].
4. Bondarenko, V.M., & Suvorov, A.N. (2007). *Simbioticheskie jenterokokki i problemy jenterokokkovoj opportunisticheskoy infekcii [Symbiotic enterococci and problems of enterococcal opportunistic infection]*. M.: Medicina [in Russian].
5. Valyshev, A.V., & Gertsen, N.V. (2012). Faktory patogennosti jenterokokkov kishechnoj mikro-flory cheloveka [Pathogenicity factors of human enterococci of intestinal microflora]. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunologii – Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*, 4, 41-44 [in Russian].
6. Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., & Harwood, V.J. (2012). Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 76, 4, 685-706.
7. Garmasheva, I.L., & Kovalenko N.K. (2010). Identifikacija i taksonomija jenterokokkov [Identification and taxonomy of enterococci]. *Mikrobiologichnyi zhurnal – Microbiological journal*, Vol. 72, 5, 49-58.
8. Dworniczek, E., Piwowarczyk, J., Seniuk, A., & Gościński, G. (2014). Enterococcus – virulence and susceptibility to photodynamic therapy of clinical isolates from Lower Silesia, Poland. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, Vol. 46, 12, 846-853.
9. Brtkova, A., Filipova, M., Drahovska, H., & Bujdakova, H. (2010). Characterization of enterococci of animal and environmental origin using phenotypic methods and comparison with PCR based methods. *Veterinarni Medicina*, 55, 3, 97-105.
10. Bondarenko, V.M. (2001). «Ostrova» patogennosti bakterij ["Acute" pathogenicity of bacteria]. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunologii – Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*, 4, 67-74 [in Russian].
11. Buharin, O.V., Valysheva, I.V., Kartashova, O.L., & Sychjova M.V. (2013). Harakteristika virulentnogo potenciala klinicheskikh izoljatov jenterokokkov [Characterization of the virulent potential of enterococcal clinical isolates]. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunologii – Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*, 3, 12-18 [in Russian].
12. Poshvina, D.V. (2015). Harakteristika virulentnogo potenciala klinicheskikh izoljatov jenterokokkov, vydelennyh ot zhyvotnyh [Characterization of the virulent potential of clinical isolates of enterococci isolated from animals]. *Extended abstract of candidate's thesis*. Orenburg [in Russian].
13. Jiménez, E., Ladero, V., Chico, I., Maldonado-Barragán, A., Lopez, A. Martin, M., et al. (2013). Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiology*, Vol. 13, 288-300.
14. Buharin, O.V., Bilimova, S.I., & Chertkov, K.L. (2002). Mehanizmy vyzhivaniya jenterokokkov v organizme hozjaina [Enterococcal survival mechanisms in the host]. *Zhurnal*

mikrobiologii, jepidemiologii i immunologii – Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology, 3, 100-106 [in Russian].

15. Krasnaja, Ju.V., Nesterov, A.S., & Potaturkina-Nesterova, N.I. (2014). Znachenie bakterij roda *Enterococcus* v zhiznedejatelnosti cheloveka [The value of bacteria of the genus *Enterococcus* in human life]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija – Modern problems of science and education*, 6. Retrieved from <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=16620> [in Russian].

16. Kolychev, N.M., & Petrova, M.I. (2009). Jenterokokkovaja infekcija u teljat [Enterococcal calf infection]. *Veterinarija selskohozjajstvennyh zhivotnyh – Veterinary of farm animal*, 4, 56-58 [in Russian].

17. Gabrielyan, N.I., Gorskaja, E.M., Spirina, T.S., & Preobrazhenskaja, T.B. (2007). Jenterokokki kak vozбудiteli posleoperacionnyh infekcionnyh oslozhnenij [Enterococci as a cause of infectious complications after surgery]. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunologii – Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*, 4, 50-53 [in Russian].

18. Gabrijeljan, N.I., Gorskaja, E.M., & Tsirolnikova, O.M. (2015) Faktory riska i nozokominal'nye infekcii, vyzyvaemye jenterokokkami [Risk factors and nosocomial infections caused by enterococci]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov – Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*, Vol. 17, 2, 64-69 [in Russian].

19. Sidorenko, S.V., Rezvan, S.P., Grudinina, S.A., Krotova, L.A., & Sterhova, G.V. (1998). Rezultaty mnogocentrovogo issledovanija antibiotikochuvstvitelnosti jenterokokkov [Results of a multicenter study of enterococcal antibiotic sensitivity]. *Antibiotiki i himioterapija – Antibiotics and chemotherapy*, 43, 9, 9-17 [in Russian].

20. Kolychev, N.M., Petrova, M.I., & Lazareva, L.I. (2006) Sperma bykov kak faktor peredachi jenterokokkovoj infekcii [Bull sperm as a factor in the transmission of enterococcal infection]. *Veterinarija – Veterinariya*, 11, 23-25 [in Russian].

21. Demihovskaja, E.V. (2013). Vankomicin-rezistentnye jenterokokki kak vozбудiteli vnutribolnichnyh infekcij [Vancomycin-resistant enterococci as causative agents of nosocomial infections]. *Bolezni i antibiotiki – Diseases and antibiotics*, 1, 8. Retrieved from <https://elibrary.ru/item.asp?id=20141300>.

22. Champagne, J., Diarra, M.S., Rempel, H., Topp, E., Greer, C.W. Harel, J., et al. (2011). Development of a DNA Microarray for Enterococcal Species, Virulence, and Antibiotic Resistance Gene Determinations among Isolates from Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 77, 8, 2625-2633.

23. Buharin, O.V., & Valyshev, A.V. (2012). Mehanizmy ustojchivosti jenterokokkov k antimikrobnym belkam i peptidam [Enterococcal resistance mechanisms to antimicrobial proteins and peptides]. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunologii – Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*, 5, 89-94 [Russian].

24. Afinogenova, A.G., & Darovskaya, E.N. (2011). Mikrobnnye biopljonki ran: sostojanie voprosa [Microbial biofilms of wounds: status of the issue]. *Travmatologija i ortopedija Rossii – Traumatology and Orthopedics of Russia*, 3, 61, 119-125 [in Russian].

25. Buharin, O.V., Lobakova, E.S., Nemceva, N.V., & Cherkasov, S.V. (2007). *Associativnyj simbioz [Associative symbiosis]*. Ekaterinburg: UrO RAN [in Russian].