

УДК 619.616:2.619.615.3.636.4

DOI: 10.31073/vet_biotech39-01

АЙШПУР О.Є., д-р вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: olenaayshpur@gmail.com,

МУШТУК І.Ю., канд. вет. наук, e-mail: mushtuk0104@gmail.com,

ШЕРЕМЕТ Н.О., e-mail: seremet-2@ukr.net,

БЕРЕЗОВЧУК С.М., e-mail: sberezovchuk@ukr.net,

ГУМЕНЮК В.В.*, e-mail: am5_6a@iskofita.com.ua,

ЄРМОЛЕНКО О.М.*, e-mail: alex-dndi@ukr.net,

ДЕРЕВ'ЯНКО М.М.*, e-mail: irektor.zrdlvm@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

ВИВЧЕННЯ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ЕНТЕРОКОКІВ

Ентерококи — це грампозитивні бактерії, які відносяться до роду Enterococcus і є основними симбіонтами мікрофлори кишечника людини, тварин та птахів. При цьому патогенні штами ентерококів спричиняють ряд інфекцій. Важливою особливістю ентерококів є високий рівень їх ендемічної антибіотикорезистентності. За останні роки у багатьох країнах зафіксовані особливо вірулентні штами ентерококів, резистентні до ванкоміцину (vancomycin-resistant enterococcus = VRE), які характеризуються високою патогеністю.

В статті представлені результати досліджень антибіотикорезистентності ентерококів, в тому числі ванкоміцинорезистентних штамів, ізольованих із біоматеріалів від тварин та птиці. Із досліджених 1017 зразків було ідентифіковано 30 видів різних мікроорганізмів, серед яких відсоток ентерококів склав від 16,3% до 18,2%. Визначено високу стійкість клінічних штамів ентерококів до різних груп антибіотиків, що становить загрозову тенденцію у складності лікування бактеріозів спричинених такими збудниками.

Ключові слова: бактерії, ентерококи, антибіотикорезистентність, ванкоміцинорезистентні штами.

Вступ. Ентерококи (Enterococcus) – це факультативно-анаеробні аспорогенні хемоорганотрофні грампозитивні бактерії. За попередньою класифікацією (до 1984 року) відносились до стрептококів класу D. За сучасним положенням рід Enterococcus входить у родину Enterococcaceae, порядок Lactobacillales, клас Bacilli та нараховує біля 20 екологічно значущих видів.

Ентерококи – це бактерії поліморфної форми (овальної або ланцетовидної) розміром 0,6–2,0 на 0,6–2,5 мкм, не утворюють спор; зазвичай

* Аспіранти – науковий керівник, д-р вет. наук О.Є. Айшпур

не мають, але інколи синтезують капсулу. В мазках розташовуються попарно, невеликими скупченнями, рідше – короткими ланцюжками (рис. 1). Ентерокок може рости за температури від 10 до 45°C, але оптимальна – від 35°C до 37°C; добре культивується на простих та селективних живильних середовищах та витримує високу концентрацію NaCl – до 6,5%. Обмін речовин бактерій проходить за бродильним типом, ферментуючи вуглеводи з утворенням молочної кислоти, при цьому рН середовища сягає 4,2–4,6. На рідких середовищах ентерококи дають дифузний ріст, на твердих – дрібні круглі блискучі колонії розміром 0,4–1,0 мм, іноді у вигляді ніжного нальоту [1–3].

Літературні джерела та дані науковців підтверджують неоднозначність ролі ентерококів [4, 5]. Ці мікроорганізми є консорбентами кишечника людини, тварин та птиці. Основними симбіонтами мікрофлори кишечника, наприклад, людини, є два види ентерококів: *E. faecalis* (90–95%) та *E. faecium* (5–10%), а їх патогенні штами здатні викликати цілий перелік інфекцій, який з кожним роком збільшується. У людини це: інфекції сечових шляхів, бактеріємія, ендокардит, внутрішньочеревинні інфекції, зараження шкіри, м'яких тканин, рани. Ентерококи – коменсали кишечника кур та індиків. Ентерококоз – одна із найпоширеніших бактеріальних інфекційних хвороб промислової птиці (36% від усіх бактеріозів) [6].

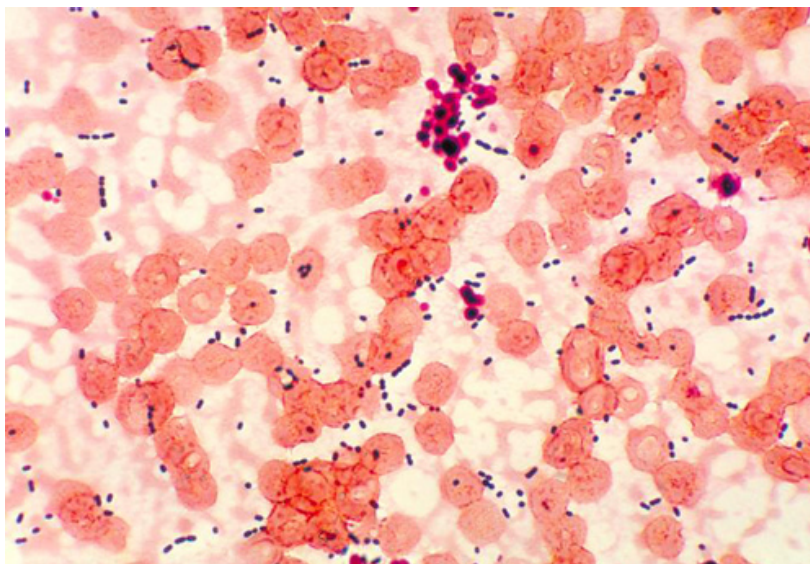


Рис. 1. Ентерококи (<https://www.gastroscan.ru/handbook/118/1794>).

Ентерококи досить стійкі до факторів навколишнього середовища та дезінфектантів, можуть довгий час зберігатись на різних предметах, витримують нагрівання до 60°C впродовж 30 хвилин.

Важливою особливістю ентерококів є високий рівень їх ендемічної антибіотикорезистентності. Механізми антибіотикорезистентності у цих

бактерій різноманітні, що зумовлює в тому числі їх стійкість до беталактамних антибіотиків (пеніцилінів, цефалоспоринів), аміноглікозидів. За останні три десятиріччя у багатьох країнах зафіксовані особливо вірулентні штами ентерококів, резистентні до ванкоміцину (vancomycin-resistant enterococcus = VRE), вперше виявлені у Великобританії та Франції у 1980-х роках. Інфекції, спричинені такими штамми характеризуються високим рівнем захворюваності та смертності [7–9].

Широке використання антибіотиків для лікування, профілактики інфекцій та стимуляції росту тварин призвело до появи стійких до широкого спектру антибактеріальних препаратів бактерій, в першу чергу шлунково-кишкового тракту. Ряд науковців сповіщають про ізолювання ванкоміцинорезистентних ентерококів (VRE) із кишкового великої рогатої худоби, свиней, овець, кур (J. Bates et al., 1993); коней та собак (L.A. Devriese et al., 1996) [3, 7].

Таким чином, вивчення антибіотикорезистентності ентерококів є актуальним, маючи на увазі їх значення як резервуара генів резистентності. Це важливі питання як для ветеринарної медицини, так і для гуманної.

Метою нашої **роботи** було вивчення антибіотикорезистентності ентерококів, в тому числі ванкоміцинорезистентних штамів ентерококів, ізолюваних із біоматеріалів від тварин.

Матеріали та методи досліджень. Робота проводилась на базі лабораторії бактеріальних хвороб тварин Інституту ветеринарної медицини НААН, на тваринницьких фермах України впродовж 2018–2021 років.

Визначення чутливості до антимікробних препаратів проводили на середовищі Мюллер-Хінтона (HiMedia, India) диско-дифузійним способом за методом Bauer-Kirby з використанням стандартних комерційних дисків з антибактеріальними препаратами. В досліді використали наступні антибіотики: амоксицилін, ванкоміцин, гентаміцин, данофлораксин, еритроміцин, канаміцин, левоміцетин, офлоксацин, рифампіцин, тетрациклін, цефтіофур, цефотаксим.

Приготування мікробних суспензій проводили відповідно до оптичного стандарту каламутності 1,0 одиниць за шкалою McFarland.

Результати значення діаметрів затримки росту інтерпретували з урахуванням визначення клінічних категорій чутливості (чутливі, помірно чутливі та резистентні) в залежності таблиць граничних значень EUCAST (www.eucast.org). В якості альтернативи можна використовувати шаблон із відміченими на ньому граничних значень EUCAST.

За культивування мікроорганізмів використовували живильні середовища – м'ясо-пептонний бульйон, м'ясо-пептонний агар, ГМФ-бульйон, бордетелагар, триптон-соевий дріжджовий бульйон, триптон-соевий дріжджовий агар, напіврідкі середовища з вуглеводами й багатоатомними

спиртами, середовище Сімонса, середовище Олькеницького, сальмонелашигела агар (SS – агар), середовище Мак-Конкі, Ендо, кров'яний агар, сольовий агар з манітом. Придатність середовищ для культивування мікроорганізмів визначали перевіркою їх ростових властивостей за допомогою тест-культур мікроорганізмів згідно «Методичних рекомендацій щодо бактеріологічного контролю якості поживних середовищ», розроблених співробітниками ДНКІБШМ та ІВМ НААН (2011 р.).

Результати досліджень та їх обговорення. Впродовж проведених досліджень було досліджено 1017 зразків біоматеріалів (молока, вагінальних змивів, проб фекалій, змивів носового слизу) від корів хворих на мастити, ендометрити; від телят хворих на діареї та респіраторний синдром. Було ідентифіковано 30 видів мікроорганізмів, серед яких відсоток ентерококів склав від 16,3% до 18,2%.

Найбільша кількість дослідних ізолятів *Enterococcus* spp проявила резистентність до ванкоміцину (59,3%) і канаміцину (59,2%). Також стійкими ізоляти виявились до амоксициліну (55,9%), рифампіцину (54,2%), тетрацикліну (53,7%) і еритроміцину (50,0%). Найменша кількість ізолятів була чутливою до цефотаксиму (17,3%).

Найбільша кількість виділених ізолятів *E. fecalis* не були чутливими до тетрацикліну (62,5%), канаміцину (56,0%) і еритроміцину (46,9%). Найменша кількість ізолятів цього виду бактерій проявила стійкість до данофлораксацину (24,5%). До інших використаних антибіотиків кількість ізолятів *E. fecalis*, що проявляли резистентність, коливалась в межах 30,0–37,5%.

Два ізоляти з трьох *E. faecium* проявили резистентність до амоксициліну, еритроміцину, левоміцетину і тетрацикліну, що склало 66,7%.

Частка ванкоміцинорезистентних штамів склала від 34,6% до 59,3% (крім *E. faecium*), що становить загрозову тенденцію відносно складності лікування бактеріозів, спричинені такими збудниками. Глікопептидні антибіотики, в даному випадку, ванкоміцин, порушують синтез клітинної стінки бактерій, мають бактеріостатичну дію відносно ентерококів (табл. 1).

Нами вивчено чутливість до антибіотиків клінічних штамів ентерококів, ізольованих із біоматеріалів від великої рогатої худоби. Результати досліджень наведені на рисунках 2 і 3.

Таблиця 1

Антибіотикорезистентність бактерій роду *Enterococcus* до антибіотиків

Антибіотики	Концентрація антибіотика у диску, мкг	Резистентні					
		<i>Enterococcus spp</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Enterococcus faecium</i>	
		n	%	n	%	n	%
Амоксицилін	10	33	55,9	18	37,5	2	66,7
Ванкоміцин	30	32	59,3	18	34,6	0	0,0
Гентаміцин	10	20	35,1	16	31,4	0	0,0
Данофлораксин	5	18	30,0	13	24,5	0	0,0
Еритроміцин	15	23	50,0	23	46,9	2	66,7
Канаміцин	30	29	59,2	28	56,0	0	0,0
Левоміцетин	30	18	34,6	15	30,0	2	66,7
Офлоксацин	5	24	42,9	19	36,5	0	0,0
Рифампіцин	5	26	54,2	9	34,6	0	0,0
Тетрациклін	30	22	53,7	30	62,5	2	66,7
Цефтіофур	30	14	23,7	18	34,0	0	0,0
Цефотаксим	30	9	17,3	17	32,1	0	0,0

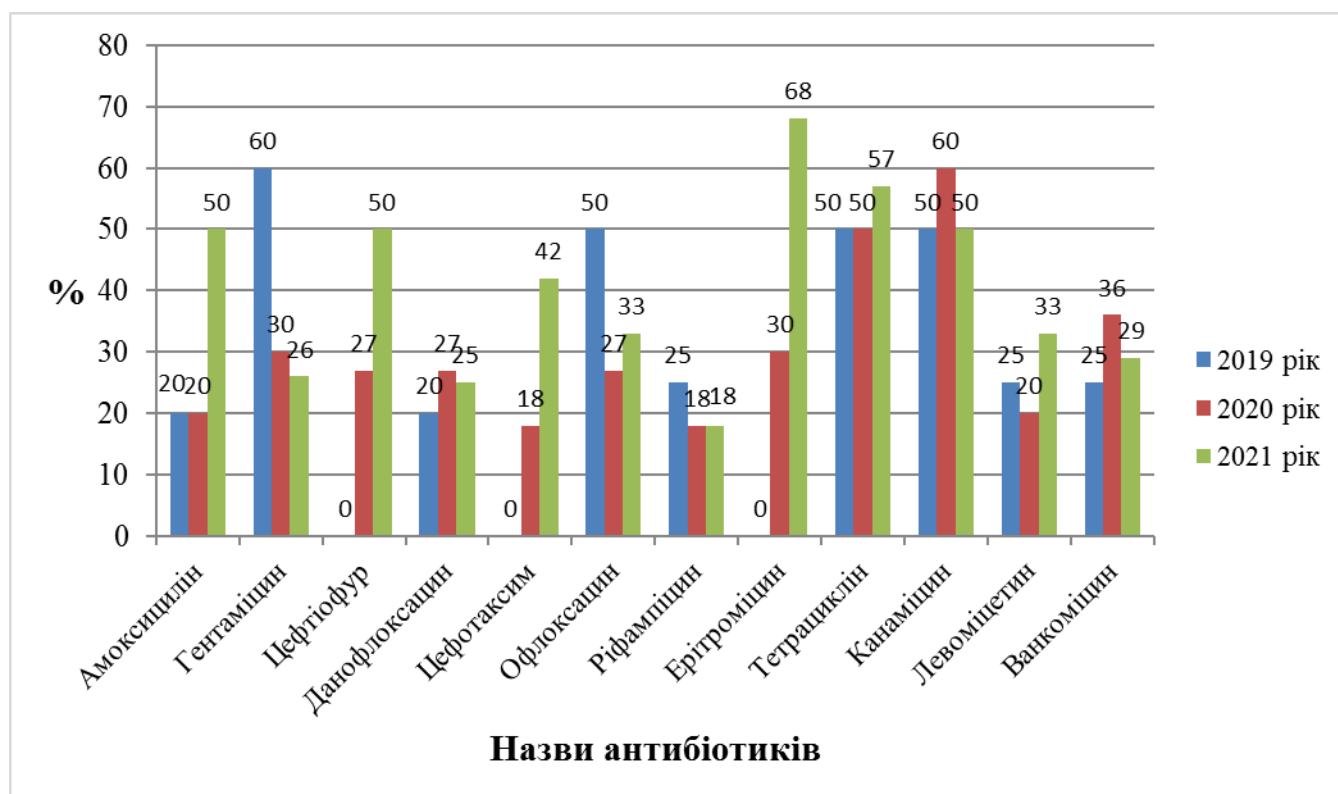


Рис. 2. Відсоток-антибіотикорезистентних ізолятів *Enterococcus faecalis*, виділених із біоматеріалів хворих телят та корів (2019 р. – n=5, 2020 р. – n=10, 2021 р. – n=20).

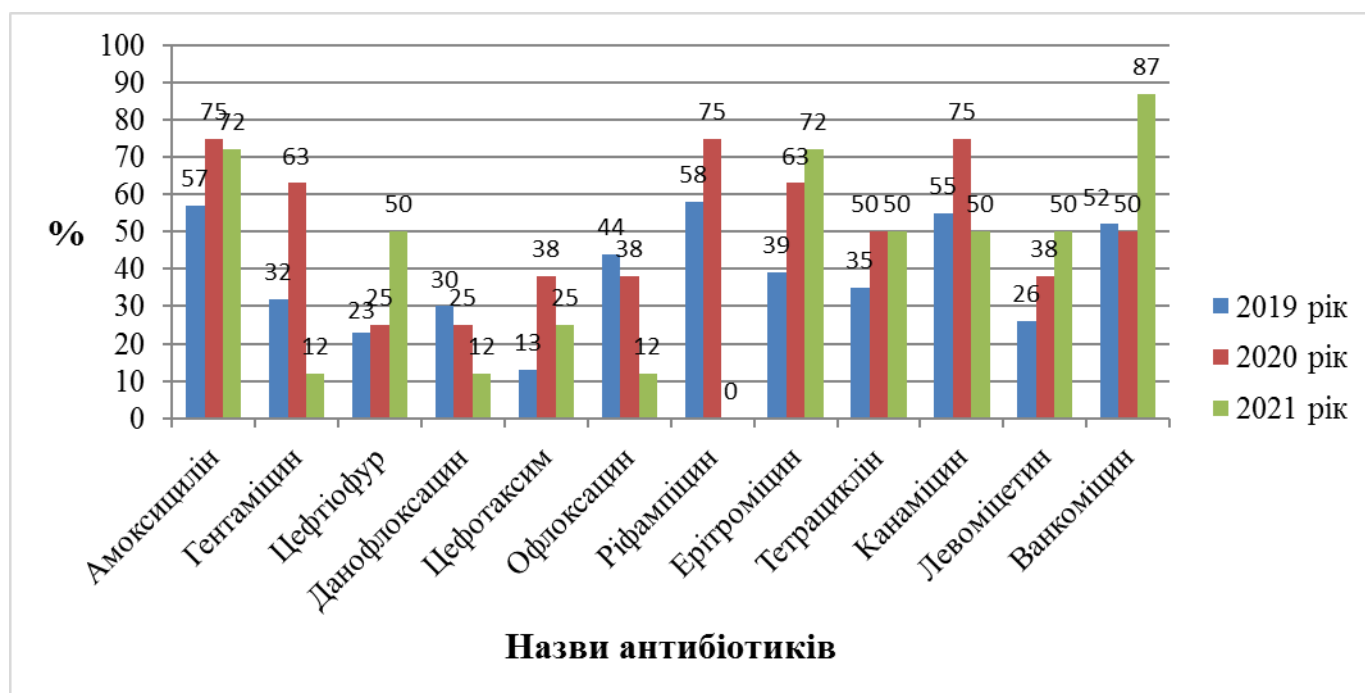


Рис. 3. Відсоток антибіотикорезистентних ізолятів *Enterococcus spp* виділених із біоматеріалів хворих телят та корів (2019 р. – n=30, 2020 р. – n=8, 2021 р. – n=7).

Наведені дані дають змогу відслідкувати зміни резистентності штамів ентерококів до антибіотиків. Так впродовж трьох років досліджень збільшилась кількість стійких штамів до амоксициліну, цефтіофуру, еритроміцину, левоміцетину, тетрацикліну.

Особливо потрібно підкреслити збільшення ізольованих ванкоміцинорезистентних штамів, їх кількість варіює від 29% до 87%. Це свідчить про те, що кількість вірулентних штамів росте і загроза їх поширення серед людей та тварин залишається високою.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Ентерококи є консорбентами кишечника людини, тварин та птиці, але патогенні штами здатні викликати цілий перелік інфекцій, який з кожним роком збільшується.

2. Із досліджених 1017 зразків біоматеріалів від корів хворих на мастити, ендометрити, від телят хворих на діареї та респіраторний синдром було ідентифіковано 30 видів мікроорганізмів, серед яких відсоток ентерококів склав від 16,3% до 18,2%.

3. Найбільша кількість дослідних ізолятів *Enterococcus spp* проявила резистентність до ванкоміцину (59,3%) і канаміцину (59,2%). Найбільша кількість виділених ізолятів *E. faecalis* не були чутливими до тетрацикліну (62,5%), канаміцину (56,0%) і еритроміцину (46,9%), а ізоляти *E. faecium*

проявили резистентність до амоксициліну, еритроміцину, левоміцетину і тетрацикліну (по 66,7%).

В перспективі важливо продовжити моніторинг антибіотикорезистентності клінічних штамів ентерококів та вивчити генетичні особливості набутої стійкості цих бактерій до антибактеріальних препаратів, а також наявність в них плазмід з визначенням їх ролі у поширенні цього явища.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бухарин О.В. Биология и экология энтерококков / О.В. Бухарин, А.В. Валышев. – Екатеринбург: УрО РАН. – 2012. – 227 с.
2. Пошвина Д.В. Видовая характеристика и протеолитическая активность клинических изолятов энтерококков, выделенных от животных / Д.В. Пошвина, М.В. Сычева // Вестник ветеринарии. – 2014. – № 2. – С. 50–54.
3. Devriese L.A. Characterization and identification of Enterococcus species isolated from the intestines of animals / L.A. Devriese, A. Van de Kerckhove, R. Kilpper-Bälz // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1987. – Vol. 37. – No. 3. – P. 257–259. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-3-257>.
4. Гармашева І.Л. Ідентифікація та таксономія ентерооків / І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко // Мікробіол. журн. – 2010. – Т. 72. – № 5. – С. 49–58.
5. Щепитова Н.Е. Биологические свойства фекальных изолятов энтерококков, выделенных от животных: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: спец. 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология / Н.Е. Щепитова. – Оренбург. – 2015. – 152 с.
6. Бондаренко В.М. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции / В.М. Бондаренко, А.Н. Суворов. – М.: Медицина, 2007. – 30 с.
7. Bates J. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci / J. Bates, Z. Jordens, J.B. Selkon // Lancet. – 1993. – No. 342. – P. 490–491.
8. Vancomycin-resistance phenotypes, vancomycin-resistance genes, and resistance to antibiotics of enterococci isolated from food of animal origin / P. Gousia, V. Economou, P. Bozidis [et al.] // Foodborne Pathog. Dis. – 2015. – Vol. 12(3). – P. 214–220. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1832>.
9. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk / L.M. Perin, R.O. Miranda, S.D. Todorov [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2014. – Vol. 18. – No. 185. – P. 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.06.001>.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭНТЕРОКОККОВ / Айшпур

Е.Е., Муштук И.Ю., Н.А. Шеремет, С.М. Березовчук, В.В. Гуменюк, А.Н. Ермоленко, Н.Н. Дервянко.

Энтерококки – это грамположительные бактерии, которые относятся к роду Enterococcus и являются основными симбионтами микрофлоры кишечника человека, животных и птиц. Но патогенные штаммы энтерококков являются причиной ряда инфекций. Важная особенность энтерококков – это высокий уровень их эндемичной антибиотикорезистентности. В течении последних лет во многих странах зафиксированы

особо вирулентные штаммы энтерококков, резистентные к ванкомицину (vancomycin-resistant enterococcus = VRE), которые характеризуются высокой патогенностью.

В статье представлены результаты исследования антибиотикорезистентности энтерококков, в том числе их ванкомицинорезистентных штаммов, изолированных из биоматериалов от животных. Из исследованных 1017 проб было идентифицировано 30 видов микроорганизмов, среди которых процентное количество энтерококков составило от 16,3% до 18,2%. Определено высокую устойчивость клинических штаммов энтерококков к различным группам антибиотиков, что свидетельствует об опасной тенденции относительно сложности лечения бактериальных инфекций, причиной которых являются такие возбудители.

Ключевые слова: бактерии, энтерококки, антибиотикорезистентность, ванкомицинорезистентные штаммы.

STUDY OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF ENTEROCOCCUS / Ayshpur O.Y., Mushtuk I.Yu., Sheremet N.O., Berezovchuk S.M., Gumenyuk V.V., Ermolenko O.M., Derevianko M.M.

Introduction. Enterococci are facultative anaerobic asporogenic chemoorganotrophic gram-positive bacteria. According to the previous classification (until 1984) belonged to class D streptococci. According to the current situation, the genus Enterococcus. These microorganisms are sorbents of the intestines of humans, animals and birds. The main symbionts of the intestinal microflora, for example, humans, are two types of enterococci: *E. faecalis* (90-95%) and *E. faecium* (5-10%), and their pathogenic strains can cause a whole list of infections, which increases every year.

A number of scientists report the isolation of vancomycin-resistant enterococci (BRE) in their intestines of cattle, pigs, sheep, and chickens. Thus, the study of antibiotic resistance of enterococci is relevant, including their importance as a reservoir of resistance genes.

The goal of our work was to study the antibiotic resistance of enterococci, including vancomycin-resistant strains of enterococci isolated from biomaterials from animals.

Materials and methods. The work was carried out on the basis of the laboratory of bacterial diseases of animals of the Institute of Veterinary Medicine of NAAS, on livestock farms and poultry farms during 2018-2021.

Determination of susceptibility to antimicrobial drugs was performed on Mueller-Hinton medium (HiMedia, India) by disco-diffusion method according to the Bauer-Kirby method using standard commercial disks with antibacterial drugs. Preparation of microbial suspensions was performed according to the optical turbidity standard of 1.0 units on the McFarland scale.

Results of research and discussion. In our research 1017 samples of biomaterials (milk, vaginal washings, samples of feces, washings of nasal mucus) from cows of patients with mastitis, endometritis were investigated; from calves with diarrhea and respiratory syndrome, pathological material from forcibly slaughtered and dead pigs and chickens. 30 species of microorganisms were identified, among which the percentage of enterococci ranged from 16.3% to 18.2%.

The most number of *Enterococcus* spp isolates showed resistance to vancomycin (59.3%) and kanamycin (59.2%). The isolates were also resistant to amoxicillin (55.9%), rifampicin (54.2%), tetracycline (53.7%) and erythromycin (50.0%). The lowest number of isolates was sensitive to cefotaxime (17.3%). The largest number of isolated isolates of *E. faecalis* were not sensitive to tetracycline (62.5%), kanamycin (56.0%) and erythromycin (46.9%). The smallest

number of isolates of this species of bacteria showed resistance to danofloxacin (24.5%). For other antibiotics used, the number of *E. fecalis* isolates that showed resistance ranged from 30.0% to 37.5%. Two isolates of *E. faecium* from three showed resistance to amoxicillin, erythromycin, chloramphenicol and tetracycline, which amounted to 66.7%.

Conclusions and prospects for further research. From the studied 1017 samples of were identified up to 30 species of microorganisms, among which the percentage of enterococci ranged from 16.3 to 18.2%. The largest number of *Enterococcus* spp isolates showed resistance to vancomycin (59.3%) and kanamycin (59.2%). The largest number of *E. fecalis* isolates were not sensitive to tetracycline (62.5%), kanamycin (56.0%) and erythromycin (46.9%), and isolates of *E. faecium* showed resistance to amoxicillin, erythromycin, chloramphenicol and tetracycline (66.7% each).

In the future, it is important to continue monitoring the antibiotic resistance of clinical strains of enterococci and to study the genetic features of the acquired resistance of these bacteria to antibacterial drugs, including the presence of plasmids and to determine their role.

Keywords: bacterias, enterococci, antibiotic resistance, vancomycin-resistant strains.

REFERENCES

1. Buharin, O.V., & Valyshev, A.V. (2012). *Biologija i jekologija jenterokokkov [Biology and ecology of enterococci]*. Ekaterinburg: UrORAN [in Russian].
2. Poshvina, D.V., & Sycheva, M.V. (2014). Vidovaja harakteristika i proteoliticheskaia aktivnost' klinicheskikh izolatov jenterokokkov, vydelennykh ot zhivotnykh [Species characteristics and proteolytic activity of clinical isolates of enterococci isolated from animals]. *Vestnik veterinarii – Veterinary bulletin*, 2, 50-54 [in Russian].
3. Devriese, L.A., Van De Kerckhove, A., Kilpper-Bälz, R., & Schleifer, K.H. (1987). Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 3, 257-259. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-3-257>.
4. Garmasheva, I.L., & Kovalenko, N.K. (2010). Identifikacija i taksonomija jenterokokkov [Identification and taxonomy of enterococci]. *Mikrobiolohichnyi zhurnal – Microbiological journal*, 72, 5, 49-58 [in Ukrainian].
5. Shchepitova, N.E. (2015). Biologicheskiye svoystva fekalnykh izolyatov enterokokkov, vydelennykh ot zhivotnykh [Biological properties of fecal isolates enterococci isolated from animals]. *Candidate's thesis*. Ufa [in Russian].
6. Bondarenko, V.M., & Suvorov, A.N. (2007). *Simbioticheskie jenterokokki i problemy jenterokokkovoj opportunisticheskoi infekcii [Symbiotic enterococci and enterococcal opportunistic infection problems]*. Moscow: Medicina [in Russian].
7. Bates, J., Jordens, Z., & Selkon, J.B. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*, 342, 490-491. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91613-q](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91613-q).
8. Gousia, P., Economou, V., Bozidis, P., & Papadopoulou, C. (2015). Vancomycin-resistance phenotypes, vancomycin-resistance genes, and resistance to antibiotics of enterococci isolated from food of animal origin. *Foodborne Pathog. Dis.*, 12(3), 214-220. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1832>.
9. Perin, L.M., Miranda, R.O., Todorov, S.D., Franco B.D., & Nero, L.A. (2014). Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 18, 185, 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.001>.