

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2014 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Д.В. Пошвина, М.В. Сычёва, 2014

УДК 619:579.861

Д.В. Пошвина¹, М.В. Сычёва^{1, 2}

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ РОДА *ENTEROCOCCUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЖИВОТНЫХ

¹ Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург, Россия

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Изучение антибиотикорезистентности клинических изолятов энтерококков, выделенных от животных, на уровне фено- и генотипа.

Материалы и методы. Штаммы *Enterococcus sp.* были выделены из клинического материала от животных при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Определение чувствительности энтерококков к антибиотикам проводилось диско-диффузионным методом. Генетические детерминанты антибиотикорезистентности выявляли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Результаты. От животных при инфекционно-воспалительных заболеваниях выделены энтерококки 7 видов, определена их антибиотикорезистентность. Установлено широкое распространение линезолид-, тетрациклин- и ванкомицинрезистентных штаммов среди культур *E. faecalis*. Клинические изоляты *non-faecalis* видов характеризовались чувствительностью к большинству исследуемых антибактериальных препаратов.

Генетические детерминанты антибиотикорезистентности чаще содержали штаммы *E. faecalis*, чем культуры других видов.

Заключение. Для эффективной терапии энтерококковых инфекций у животных необходимо определять антибиотикочувствительность возбудителей.

Ключевые слова: *Enterococcus sp.*, видовой состав, антибиотикорезистентность, животные, полимеразная цепная реакция

D. V. Poshvina¹, M. V. Sycheva^{1, 2}

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF CLINICAL ISOLATES OF BACTERIA GENUS *ENTEROCOCCUS*, ISOLATED FROM ANIMALS

¹ Orenburg State Agrarian University, Orenburg, Russia

² Institute of cellular and intracellular symbiosis, UrB RAS, Orenburg, Russia

Aim. The study of antibiotic resistance of *Enterococcus* clinical strains isolated from animals at the level of genotype and phenotype.

Materials and methods. The strains of *Enterococcus sp.* were obtained from clinical specimens from animals with infectious and inflammatory diseases. Determination of enterococci sensitivity to antibiotics was performed using a disk diffusion assay. Genetic determinants of antibiotic were detected by using a polymerase chain reaction (PCR).

Results. Seven *Enterococcus* species were isolated from animals with infectious and inflammatory diseases. Antimicrobial resistance of *Enterococci* was determined. A wide spread of linezolid-, tetracycline- and vancomycin resistance strains of *E. faecalis* was established. Clinical isolates of *non-faecalis* species were sensitive to the majority of the investigated antibiotics.

Conclusion. Determination of antibiotic susceptibility of *Enterococcus* clinical isolates is necessary to effective therapy of animals' enterococcal infections.

Key words: *Enterococcus sp.*, species composition, antibiotic resistance, animals, polymerase chain reaction

Введение

Микроорганизмы рода *Enterococcus* являются не только представителями кишечной микрофлоры млекопитающих, но и этиологическим фактором целого ряда инфекционно-воспалительных заболеваний животных: эндокардитов [1], маститов, метритов и сепсиса новорождённых [2]. Проблема патогенности энтерококков неотделима от их антибиотикорезистентности [3]. Это связано как с наличием детерминант патогенности и устойчивости к антибиотикам в одних и тех же носителях генетической информации, так и с резистентностью возбудителя к проводимым терапевтическим мероприятиям [4].

Устойчивость энтерококков, выделенных от животных, к противомикробным препаратам является серьёзным поводом для беспокойства, поскольку нерациональное использование антибиотиков, а также их (например, ампициллин, гентамицин) применение в сельском хозяйстве в качестве пищевых добавок для стимуляции роста создает условия для формирования резервуара резистентных штаммов *Enterococcus sp.* в организме животных [5]. Доказано, что резистентные к антимикробным препаратам энтерококки могут передаваться человеку в результате тесного контакта от домашних животных [6], а также при употреблении контаминированных продуктов животного происхождения [7].

Данные о распространенности антибиотикорезистентности среди *Enterococcus sp.*, выделенных от животных на территории Российской Федерации, ограничены. Между тем исследования, направленные на изучение устойчивости к антимикробным препаратам энтерококков, необходимы для проведения рациональной антибактериальной терапии.

В связи с вышеизложенным целью данной работы явилось изучение антибиотикорезистентности клинических изолятов энтерококков, выделенных от животных, на уровне фено- и генотипа.

Материалы и методы

В работе использованы 34 штамма энтерококков, выделенных от животных при инфекционно-воспалительных заболеваниях: 13 штаммов – из экскрета половых органов самок при эндометритах коров, собак и кошек, 2 – из секрета молочных желез при маститах коров, 19 – из гнойного экссудата при абсцессах мягких тканей и отитах кошек и собак. Выделение микроорганизмов осуществляли путём секторного посева исследуемого материала на

желчно-эскулиновый агар с азидом натрия (Hi Media, Индия). Посевы инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. При обнаружении характерного для энтерококков роста (наличие коричнево-черного преципитата вокруг колоний) проводили пересев колоний на агар Шедлера (HiMedia, Индия).

Идентификацию культур проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием известных праймеров [8]. Синтез праймеров осуществлен компанией «СИНТОЛ» (г. Москва). Для постановки ПЦР бактериальные лизаты получали с помощью реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» (Литех, Россия).

Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) определяли диско-диффузионным методом. Интерпретация осуществлялась на основании сопоставления результатов исследования (диаметра зоны ингибирования роста) с пограничными значениями этих параметров, отделяющих чувствительные штаммы от промежуточных и промежуточные от устойчивых [9].

При помощи ПЦР анализа у клинических изолятов определяли гены, кодирующие резистентность к аминогликозидам [10], тетрациклинам [11] и гликопептидам [12]: высокий уровень резистентность к гентамицину – *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, резистентность к аминогликозидам (кроме гентамицина) – *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*; резистентность к тетрациклину - *tetL*, резистентность к тетрациклину и миноциклину - *tetM*; резистентность к ванкомицину и тейкопланину - *vanA*, резистентность к различным концентрациям ванкомицина - *vanB*, резистентность к низким концентрациям ванкомицина - *vanC-1*, *vanC-2/3*.

Полученные данные обработаны статистически [13].

Результаты и обсуждение

Установлено, что при инфекционно-воспалительных заболеваниях у животных энтерококки встречаются достаточно часто. Так, микроорганизмы, отнесённые к роду *Enterococcus*, были выделены из 29% проб при эндометритах, из 26% проб гнойного экссудата при абсцессах мягких тканей и отитах и из 13% проб при маститах.

Большинство клинических изолятов было выделено от собак (36%), в меньшей степени – от крупного рогатого скота (23%) и кошек (21%).

Видовой спектр энтерококков, выделенных из клинического материала,

отличался разнообразием, однако доминирующее положение занимали культуры вида *E. faecalis* (73%). В 6% случаев (по 2 штамма) клинические изоляты были представлены видами *E. faecium*, *E. casseliflavus* и *E. flavescens*. В единичных случаях высевали *E. avium* (3%), *E. hirae* (3%), *E. durans* (3%) (рис. 1).

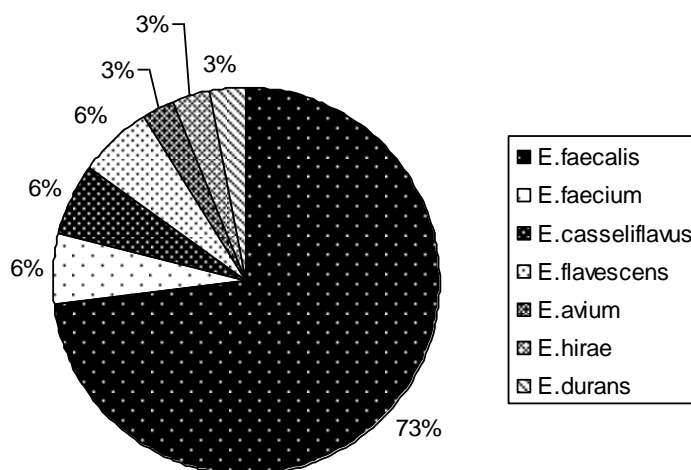


Рис. 1. Видовой спектр клинических изолятов энтерококков.

На следующем этапе диско-диффузионным методом была определена устойчивость энтерококков к антибактериальным препаратам (рис. 2).

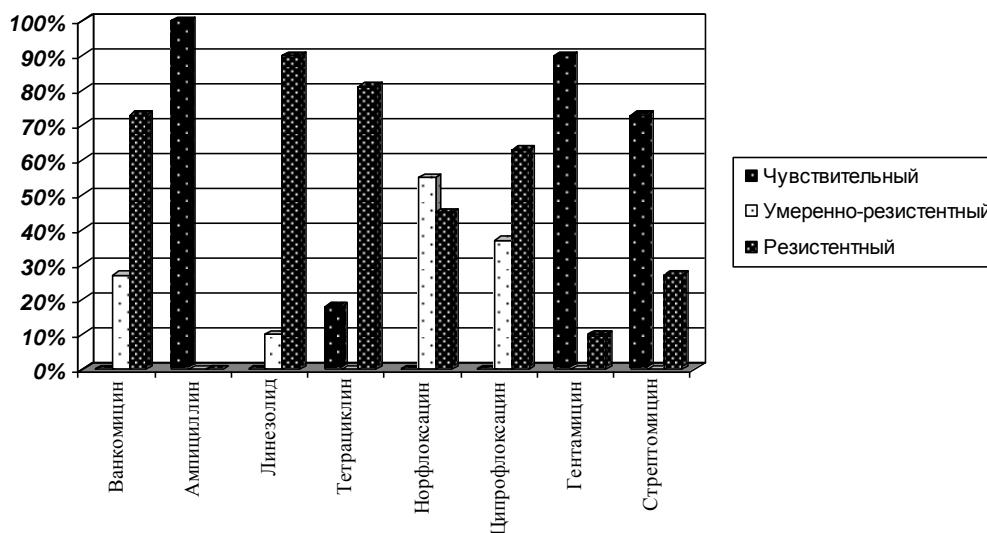


Рис. 2. Устойчивость клинических изолятов *E. faecalis*, выделенных из экскрета половых органов самок

Установлено, что большинство штаммов *E. faecalis*, выделенных из экскрета половых органов самок, характеризовалось выраженной резистентностью к линезолиду ($90,0 \pm 9,1\%$), тетрациклину ($81,0 \pm 11,8\%$), ванкомицину ($73,0 \pm 13,4\%$) и ципрофлоксацину ($63,0 \pm 14,5\%$). К норфлоксацину определена

умеренная резистентность в $54 \pm 15,0\%$ случаев. Уровень чувствительности клинических изолятов *E. faecalis* к аминогликозидам (стрептомицин и гентамицин) варьировал в пределах от $72,0 \pm 13,5\%$ до $90,0 \pm 9,1\%$.

В ходе исследований установлено, что $45,0 \pm 15,0\%$ изолятов *E. faecalis*, выделенных из экскретов половых органов самок, обладали множественной лекарственной резистентностью (были устойчивы к 5 антибактериальным препаратам).

Среди культур *E. faecalis*, выделенных из гнойного экссудата, выявлен высокий процент резистентных к линезолиду и тетрациклину штаммов – $86,0 \pm 9,3\%$ и $93,0 \pm 6,8\%$ соответственно (рис. 3). Доля ванкомицинрезистентных изолятов составила $50,0 \pm 13,4\%$. Умеренно-резистентные и резистентные к ципрофлоксацину штаммы встречались в одинаковом количестве случаев (по $43,0 \pm 13,2\%$). К стрептомицину резистентность определена в $7,0 \pm 6,8\%$ случаев, к гентамицину устойчивости выявлено не было. Доля умеренно-резистентных к норфлоксацину изолятов составила $50,0 \pm 13,4\%$.

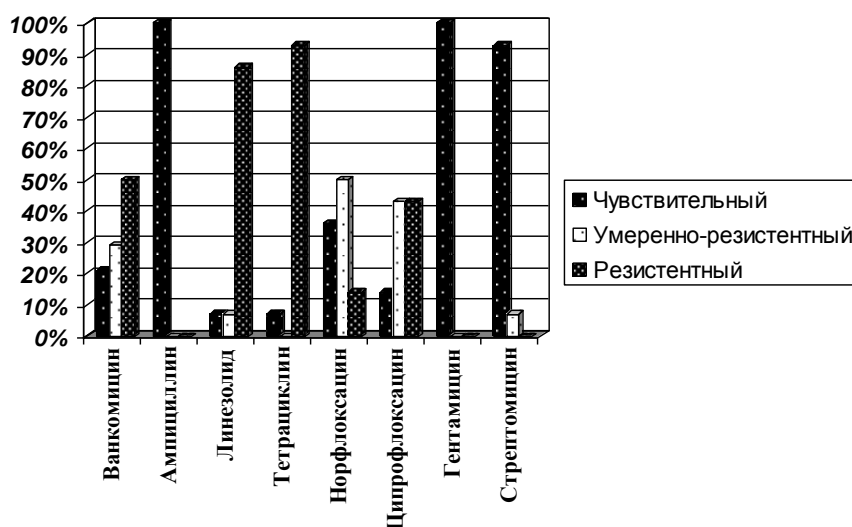


Рис.3. Устойчивость клинических изолятов *E. faecalis*, выделенных из гнойного экссудата.

В результате исследования антибиотикорезистентности штаммов *E. faecalis*, выделенных из гнойного экссудата, у $21,0 \pm 10,8\%$ изолятов обнаружена полирезистентность. Все клинические изоляты *E. faecalis* продемонстрировали чувствительность к ампициллину.

Определение чувствительности к антибиотикам других выделенных представителей рода *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. hirae*, *E. durans*) выявило высокую частоту резистентности к линезолиду

(45,0±16,6%). Умеренная резистентность была определена к ципрофлоксацину в 33,0±15,7% и норфлоксацину – в 22,0±13,8% случаев (рис. 4). Количество резистентных и чувствительных к тетрациклину изолятов было одинаковым и составило 44,0±16,5%. Большая часть (78,0±13,8%) энтерококков редких видов не проявляла резистентность к ванкомицину. Устойчивости к аминогликозидам у энтерококков не обнаружено.

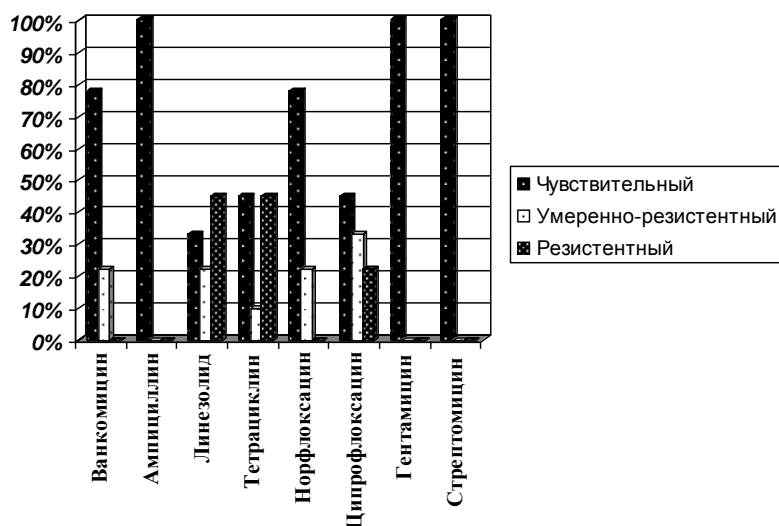


Рис. 4. Антибиотикорезистентность *non-faecalis* видов (*E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. hirae*, *E. durans*).

Анализ генетических детерминант антибиотикорезистентности показал, что гены резистентности к аминогликозидам содержит подавляющее большинство культур *Enterococcus sp.* (рис. 5 и 6).

Ген, кодирующий высокий уровень резистентности к гентамицину, содержали 55,0±15,0% штаммов *E. faecalis*, выделенных из экскрета половых органов самок (рис. 5).

Гены *aph(3')-IIIa* и *ant(4')-Ia*, кодирующие резистентность к аминогликозидам (кроме гентамицина), выявлялись в 37±14,5% и 18±11,6% случаев, соответственно. Гены *tetM* и *tetL* (устойчивость к тетрациклинам) определены у 73±13,4% и 18±11,6% культур, соответственно. Процент гликопептид-резистентных изолятов составил 55±15,0% (*vanA*) и 36±14,5% (*vanC-1*); гены *vanB* и *vanC-2/3* среди штаммов *E. faecalis*, выделенных из экскрета половых органов самок, не обнаружены.

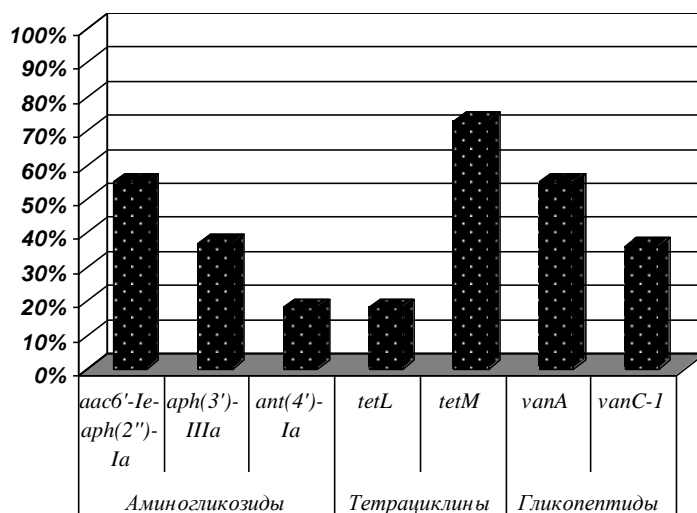


Рис. 5. Наличие генов антибиотикорезистентности у штаммов *E. faecalis*, выделенных из экскрета половых органов самок.

Примечание: Гены кодируют: aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia – высокий уровень резистентности к гентамицину, aph(3')-IIIa и ant(4')-Ia – резистентность к аминогликозидам (кроме гентамицина), tetL - резистентность к тетрациклину, tetM - резистентность к тетрациклину и миноциклину, vanA - резистентность к ванкомицину и тейкопланину, vanC-I - резистентность к низким концентрациям ванкомицина.

Штаммы *E. faecalis*, выделенные из гнойного экссудата, содержали ген, кодирующий высокий уровень резистентности к гентамицину, в $79,0 \pm 10,8\%$ случаев. Генетические детерминанты резистентности к аминогликозидам (кроме гентамицина), обнаружены у $43 \pm 13,2\%$ штаммов *E. faecalis* (рис. 6). Ген tetM (резистентность к тетрациклину и миноциклину) определен у $86,0 \pm 9,3\%$ изолятов.

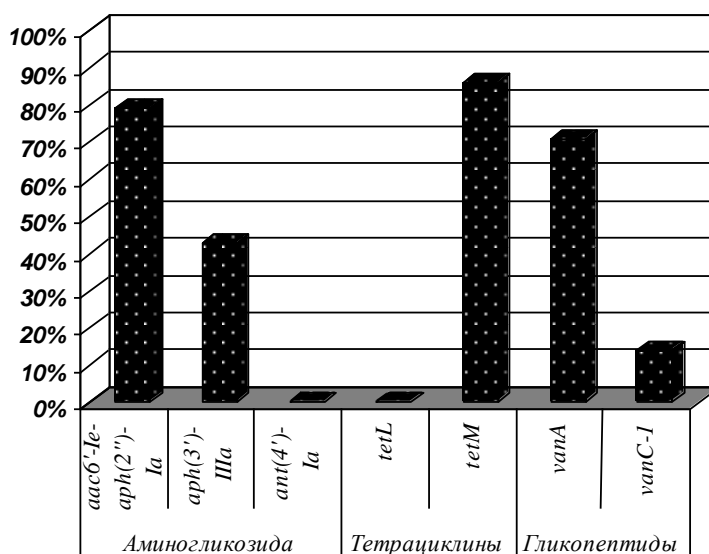


Рис. 6. Наличие генов антибиотикорезистентности у штаммов *E. faecalis*, выделенных из гнойного экссудата.

Примечание: Обозначения как на рисунке 5.

подавляющее большинство штаммов энтерококков ($71,0 \pm 12,1\%$) содержали ген, кодирующий резистентность к ванкомицину и тейкопланину (*vanA*); гены *vanB* и *vanC-2/3* среди штаммов *E. faecalis*, выделенных из гнойного экссудата не выявлены.

Среди клинических изолятов *non-faecalis* видов гены, кодирующие устойчивость к аминогликозидам (кроме гентамицина) обнаружены в одинаковом проценте случаев (по $11,0 \pm 10,4\%$) у *E. casseliflavus* и *E. avium*.

Гены, кодирующие резистентность к тетрациклинам, определены у $33,0 \pm 15,7\%$ изолятов. Генетические детерминанты резистентности к низким концентрациям ванкомицина (*VanC-2/3*) содержали $11,0 \pm 10,4\%$ штаммов *E. durans* и $22,0 \pm 13,8\%$ штаммов *E. flavescens*.

Корреляционный анализ фено- и генотипических характеристик резистентности изолятов энтерококков к тетрациклину показал наличие высокой достоверной положительной связи ($r=0,829$; $p<0,001$) между наличием генов резистентности и фенотипическим проявлением признака. Также у исследуемых культур энтерококков выявлена средняя прямая взаимосвязь между наличием генов резистентности к гликопептидам и их экспрессией ($r=0,592$; $p<0,001$).

Заключение

В результате проведенного исследования идентифицировано семь различных видов клинических изолятов энтерококков. Наиболее часто выделяли бактерии вида *E. faecalis*.

Установлено, что разные виды энтерококков имеют существенные отличия в спектре антибиотикоустойчивости, а полирезистентность возбудителей к антибиоткам зависит от характера патологии. Полирезистентные штаммы *E. faecalis* в два раза чаще выделяли при инфекционно-воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта, чем при абсцессах и отитах.

У клинических изолятов *E. faecalis* спектр резистентности к антибактериальным препаратам был более широким по сравнению с изолятами энтерококков *non-faecalis* видов. На генотипическом уровне для большинства штаммов *E. faecalis* характерна резистентность к аминогликозидам, гликопептидам и тетрациклинам. Устойчивость энтерококков к тетрациклину, ча-

ще всего, обусловлена наличием гена *tetM*, что соответствует данным, полученным другими исследователями [14]. Ванкомицинрезистентные штаммы энтерококков, выделенные из клинического материала, принадлежали к генотипам *vanA*, *vanC-1*, *vanC-2/3*, причём генотип *vanC-2/3* был выявлен только у редких видов *E. durans* и *E. flavescens*. Некоторые авторы полагают, что причиной развития ванкомицин-устойчивости энтерококков у животных является использование гликопептидов (например, авопарцина) в качестве стимуляторов роста в животноводстве [15].

Из всех изученных антибиотиков наибольшую активность в отношении *Enterococcus sp.* показал ампициллин, являющийся препаратом выбора. Из других антибиотиков, потенциально эффективных при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний энтерококковой этиологии, можно рассматривать гентамицин и стрептомицин, несмотря на то, что по литературным данным, среди энтерококков широко распространена резистентность к гентамицину [16]. Для терапии инфекций, вызванных энтерококками *non-faecalis* видов, можно использовать ванкомицин и норфлоксацин. Применение других антибиотиков не рекомендуется в связи с высокой резистентностью к ним указанных микроорганизмов.

Обнаруженная в результате исследования выраженная множественная лекарственная устойчивость изолятов *E. faecalis* может создавать трудности для терапии энтерококковых инфекций, в связи с чем при выделении энтерококков из исследуемого материала целесообразным является определение у них антибиотикорезистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schlievert P.M., Chuang-Smith O.N., Peterson M.L. *Enterococcus faecalis* Endocarditis Severity in Rabbits Is Reduced by IgG Fabs Interfering with Aggregation Substance. PLOS ONE. 2010.
2. Кольчев Н.М., Петрова М.И., Лазарева Л.И. Сперма быков как фактор передачи энтерококковой инфекции. Ветеринария. 2006. 11: 23-25.
3. Mundy L.M., Sahm D.F., Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev. 2000. 13 (4): 513-522.
4. Бухарин О.В., Вальшев А.В. Биология и экология энтерококков. Екатеринбург: УрО РАН, 2012. 227 с.
5. Heuer O.E., Hammerum A.M., Collignon P., Wegener H.C. Human Health Hazard from Antimicrobial-Resistant Enterococci in Animals and Food. Clin. Infect. Dis. 2006. 43 (7): 911-916.
6. Jackson C.R., Lombard J.E., Dargatz D.A. et al. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from US dairy cattle. Lett. Appl. Microbiol. 2010. 52: 41-48.

7. Trivedi K., Cupakova S., Karpiskova R. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Veterinari Medicina*. 2011. 56 (7): 352–357.
8. 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 (8): 3558-3565.
9. Методические указания МУК 4.2.1890-04 "Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 4 марта 2004 г.).
10. Vakulenko S., Donabedian S.M., Voskresenskiy A.M. et al. Multiplex PCR for Detection of Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003. 47 (4): 1423–1426.
11. De Leener E., Martel A., Decostere A., Haesebrouck F. Distribution of the erm(B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microb. Drug Resist.* 2004. 10: 341-345.
12. Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995. 33 (1): 24–27.
13. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1962. 180 с.
14. Türkyilmaz S., Erdem V., Bozdoğan B. Investigation of antimicrobial susceptibility for enterococci isolated from cats and dogs and the determination of resistance genes by polymerase chain reaction. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2010. 34 (1): 61-68.
15. Prescott J. F., Brad Hanna W.J., Reid-Smith R. et al. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *Can. Vet. J.* 2002. 43 (2): 107–116.
16. Leclercq R. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. Dis.* 1997. 24 (1): 80-84.

Поступила 11.07.2014

(Контактная информация: Пошвина Дарья Владимировна – аспирант кафедры микробиологии и заразных болезней Оренбургского ГАУ; адрес: 460014 г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, тел.: 8 (3532) 689713; e-mail: dvposhvina@mail.ru)