

СТІЙКІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ, ДЕКАРБОКСИЛАЗНА ТА ГЕМОЛІТИЧНА АКТИВНОСТІ ЕНТЕРОКОКІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ ТРАДИЦІЙНИХ КИСЛОМОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ

І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко, Л.Т. Олещенко

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

Мета. Визначити видовий склад, стійкість до антибіотиків, декарбоксилазну та гемолітичну активності ентерококів, ізольованих із традиційних кисломолочних продуктів. **Методи.** Ідентифікацію на рівні виду проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Стійкість до антибіотиків визначали диско-дифузійним методом, декарбоксилазну активність – при рості на середовищах з амінокислотами, гемолітичну активність виявляли при вирощуванні штамів ентерококів на кров'яному агарі. **Результати.** Серед досліджених ізолятів штамів виду *Enterococcus faecalis* складала 67,8%, *E. durans* – 18,8%, *E. faecium* – 6,4%, *E. hirae* – 0,2%, *Enterococcus* spp. – 6,7%. Більше 60% штамів ентерококів були стійкими до еритроміцину, норфлоксацину, ципрофлоксацину і рифампіцину. З досліджених в роботі штамів 56,76% виявили стійкість до 5–11 антибактеріальних препаратів з 17 використаних в роботі. Стійкість до ванкомицину і гентаміцину виявили лише штамів виду *E. faecalis*. Тирамін продукували 95,4% штамів, β -гемолітична активність виявлена у 20% штамів. Найменша кількість антибіотикорезистентних штамів та продуцентів тираміну виявлено серед представників виду *E. durans*, а β -гемолітичних – серед штамів виду *E. faecalis*. **Висновки.** Кисломолочні продукти, виготовлені в домашніх умовах, можуть слугувати резервуаром вірулентних, потенційно небезпечних для здоров'я людини мультирезистентних штамів ентерококів.

Ключові слова: ентерококи, стійкість до антибіотиків, біогенні аміни, кисломолочні продукти.

Кисломолочні продукти, що виготовляються шляхом спонтанного бродіння, без внесення комерційних заквашувальних культур, є досить популярними й займають важливе місце в раціоні харчування. Домінуючою мікробіотою таких продуктів є молочнокислі бактерії (МКБ), але їх видовий склад може значно різнитися залежно від якості молока, процесу приготування та географічного регіону. Ентерококи відіграють важливу роль в процесах ферментації, особливо при виготовленні сирів, надаючи продуктам необхідних органолептичних властивостей [1]. Представники роду *Enterococcus* широко розповсюджені в оточуючому середовищі завдяки стійкості до широкого спектра стресових факторів та біохімічним властивостям. Ріст в молоці та в кисломолочних продуктах пов'язаний, в першу чергу, з їх ферментативною активністю, терморезистентністю та стійкістю до високих концентрацій NaCl [1]. Але, окрім надання потрібних органолептичних характеристик в процесі виготовлення ферментова-

них продуктів, внаслідок декарбоксилазної активності ентерококи можуть призводити до накопичення токсичних концентрацій біогенних амінів [2]. Крім того, представники роду *Enterococcus*, на відміну від інших родів МКБ, не мають статусу GRAS, є індикаторами фекального забруднення і одними з найпоширеніших збудників нозокомінальних інфекцій, зокрема, урогенітального тракту, післяопераційних ускладнень, ендокардитів, особливо у людей з ослабленим імунітетом [3]. Диференціація безпечних та небезпечних для здоров'я людини штамів ентерококів є складною, особливо зважаючи на те, що штами здатні до обміну генами антибіотико-резистентності та вірулентності [4]. Набуття стійкості до антибіотиків, разом з природною стійкістю й стійкістю до факторів зовнішнього середовища, дуже ускладнює лікування хвороб, збудниками яких можуть бути ентерококи. Внаслідок використання антибіотиків у ветеринарії продукти тваринництва стають резервуарами антибіотикостійких штамів ентерококів, які при потраплянні в кишківник людини можуть передавати детермінанти резистентності представникам нормальної мікробіоти і патогенним мікроорганізмам [5]. Крім того, стійкі до антибіотиків штами ентерококів потрапляють і розповсюджуються в оточуючому середовищі внаслідок фекального забруднення [3, 5]. Таким чином дослідження антибіотикостійкості ентерококів харчового походження є вкрай актуальними і інтенсивно проводяться в багатьох країнах [6-9].

В нашій попередній роботі було проаналізовано 31 зразок кисломолочних продуктів домашнього приготування (сквашене молоко, сир, сметана та бринза), відібраних в 7 областях України, і встановлено, що частота виділення ентерококів складала 60% від загальної кількості МКБ [10]. Висока кількість ентерококів в самоквасних кисломолочних продуктах викликає певне занепокоєння, тому постає питання їх безпечності для здоров'я людини.

Метою роботи було дослідження видового складу, стійкості до антибіотиків, гемолітичної активності та здатності до синтезу біогенних амінів ентерококів, ізольованих з традиційних кисломолочних продуктів, виготовлених в домашніх умовах.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були 531 штам *Enterococcus* spp., раніше ізольовані з традиційних кисломолочних продуктів домашнього приготування [10].

Видову ідентифікацію штамів ентерококів проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням видоспецифічних пар праймерів, специфічних до гену супероксиддисмутази (*sodA*), як описано раніше [11].

Стійкість до антибіотиків визначали диско-дифузійним методом з використанням середовища Мюллера-Хінтона (Conda, Іспанія) комерційних дисків виробництва НДІ ЕМ (Санкт-Петербург, Російська Федерація) і HiMedia (Індія). Штами відносили до чутливих, помірно стійких або стійких за встановленими критеріями [12, 13].

Гемолітичну активність визначали з використанням кров'яного агару Колумбія з 5% еритроцитів (VoiMerieux, Франція), зони гемолізу виявляли після інкубації протягом 24 годин при 37°C.

Здатність до синтезу біогенних амінів визначали за описаною методикою [14]. Інокульовані середовища, що містили амінокислоти (1% w/v), культивували при 30° С протягом 72 год. Облік результатів проводили візуально; зміна кольору середовища з жовтого на фіолетовий свідчить про утворення відповідного біогенного аміну. Як контроль використовували незасіяні середовища.

Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням програми Statistika 7.0.

Результати. З використанням методу ПЛР з видоспецифічними праймерами до найбільш розповсюджених видів ентерококів 360 штамів було ідентифіковано як *E. faecalis*, 100 штамів – як *E. durans*, 34 штами – як *E. faecium*, 1 штама – як *E. hirae*, а 36 штамів належать іншим видам ентерококів (*Enterococcus* spp.). Частота виділення штамів певного виду залежала від типу продукту (рис. 1). Так, в сквашеному молоці домінували штами виду *E. faecalis*, в сирі кисломолочному – штами виду *E. durans*. В зразках сметани та бринзи частота виділення видів *E. durans* і *E. faecium* була однаковою, натомість в зразках бринзи кількість штамів виду *E. faecalis* була найменшою, а штамів з невстановленою видовою належністю – найбільшою в порівнянні з іншими кисломолочними продуктами.

Практично всі досліджені штами ентерококів (95,4%) були здатні продукувати біогенні аміни, зокрема тирамін. Крім того, 20% штамів виявились β-гемолітичними. Наявність декарбоксилазної активності не залежала від виду, тоді як β-гемолітична активність була виявлена практично у всіх досліджених штамів виду *E. faecium*. Серед штамів виду *E. faecalis* β-гемолітичну активність проявили тільки 2% штамів (рис. 2).

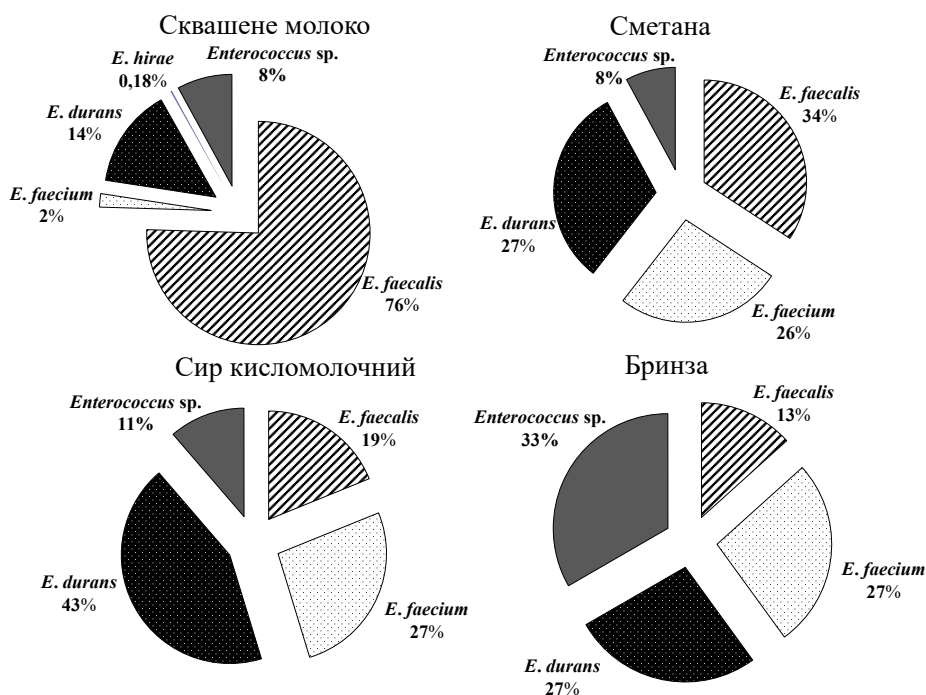


Рис. 1. Видовий склад представників роду *Enterococcus* в досліджених зразках кисломолочних продуктів

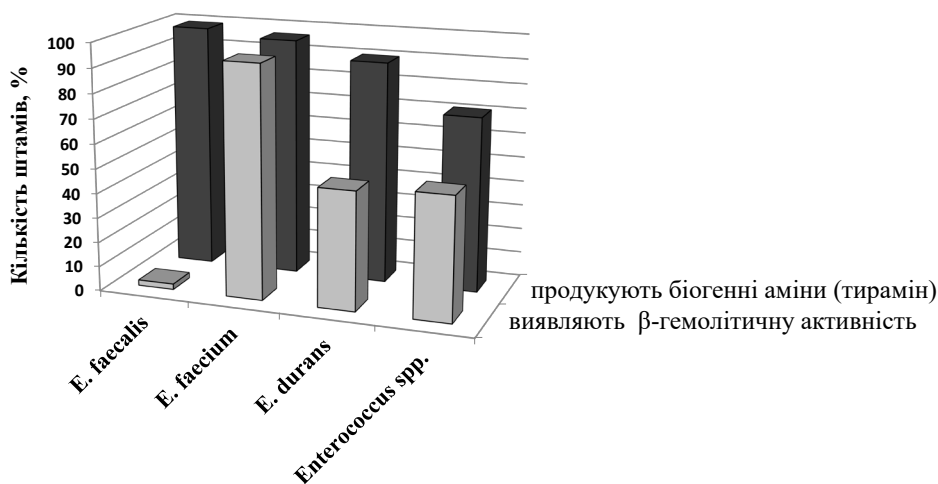


Рис. 2. Частота виявлення продуцентів тираміну та β-гемолітичних штамів серед ентерококів залежно від виду

Одним з критеріїв оцінки патогенності ентерококів є стійкість до антибіотиків. На рис. 3 наведено дані щодо кількості штамів, стійких до використаних в роботі 17 антибіотиків, що належать до різних класів за механізмом дії. Слід відмітити доволі невелику кількість штамів, стійких до більшості антибактеріальних препаратів, за виключенням норфлоксацину і рифампіцину, але переважна більшість культур мали проміжну стійкість до еритроміцину і ципрофлоксацину.

Аналіз частоти виділення стійких штамів ентерококів залежно від джерела виділення показав, що стійкі до бензилпеніциліну, ванкоміцину, норфлоксацину і рифампіцину штами частіше виділялись зі сквашеного молока, тоді як зі сметани – штами, стійкі до тетрацикліну, доксицикліну і гатифлоксацину. Резистентність до ципрофлоксацину і нітрофурантоїну була в більшій мірі притаманна ізолятам з сиру, а стійкі до фосфоміцину і лінезоліду штами були, в основному, ізовані з бринзи (рис. 4А). Оскільки досліджені зразки кисломолочних продуктів різни-

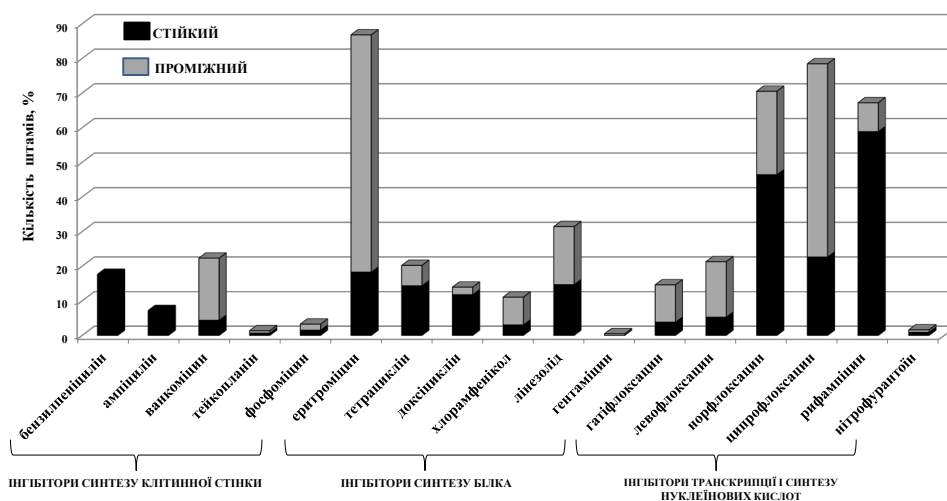


Рис. 3. Стійкість ентерококів до антибактеріальних препаратів різного механізму дії

лися за видовим складом ентерококів, нами було проаналізовано частоту виділення стійких до антибактеріальних препаратів штамів залежно від виду. Стійкі до ванкомицину штами належали виключно виду *E. faecalis*, крім того, резистентні до бензилпеніциліну, хлорамфеніколу та рифампіцину штами також частіше виявлялися серед представників цього виду. В той же час стійкість до еритроміцину, гатіфлоксацину, левофлоксацину, норфлоксацину і ципрофлоксацину була здебільшого притаманна штамам *E. faecium*. Серед штамів *E. durans* відсоток стійких до більшості антибіотиків був найнижчим в порівнянні з двома зазначеними вище видами (рис. 4Б).

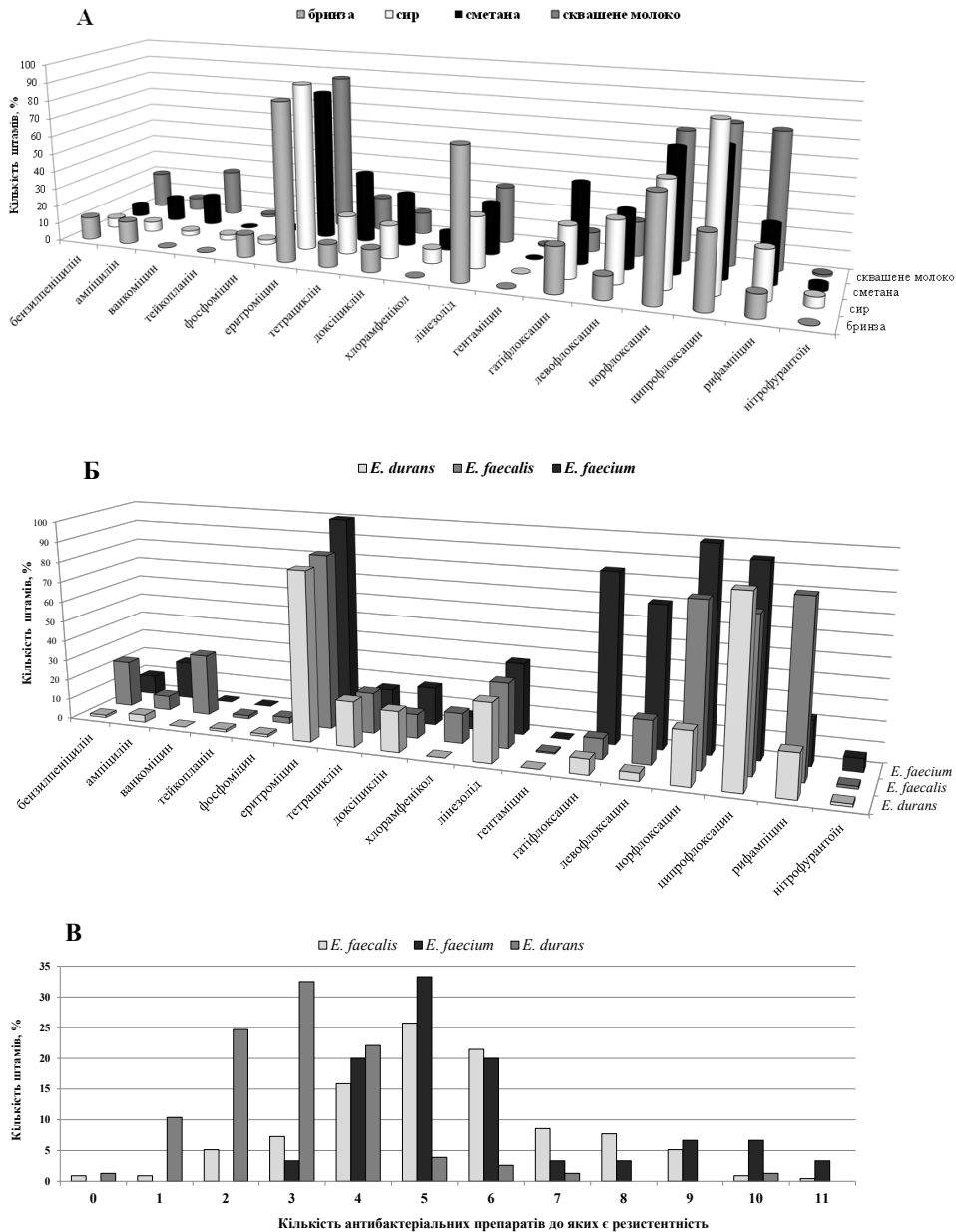


Рис. 4. Частота виділення стійких до антибіотиків штамів ентерококів: А – залежно від джерела виділення; Б – залежно від видової належності; В- мультирезистентних штамів ентерококів серед представників різних видів

З досліджених у роботі штамів 56,76% виявили стійкість до 5–11 антибактеріальних препаратів з 17 використаних. На рис. 4В наведено дані щодо виявлення мультирезистентних штамів серед представників окремих видів. Тільки 3 штами (1 штам *E. durans* і 2 штами *E. faecalis*) були чутливими до всіх використаних антибіотиків. Переважна більшість штамів *E. durans* були стійкими до 1–4 антибактеріальних препаратів, тоді як стійкість до 9–11 препаратів виявили, в основному, штами *E. faecium*.

Всього для штамів *E. faecalis* було визначено 115 профілей резистентності (рис. 5), для *E. faecium* – 18 профілей (рис. 6), для *E. durans* – 33 профілі (рис. 7). Найчастіше мультирезистентні штами були стійкими до інгібіторів синтезу білка та інгібіторів транскрипції і синтезу нуклеїнових кислот. Штами, стійкі до препаратів-інгібіторів синтезу клітинної стінки, завжди виявляли стійкість до антибіотиків з іншим механізмом дії. В той же час деякі штами ентерококів були стійкими тільки до препаратів-інгібіторів синтезу білка чи інгібіторів транскрипції і синтезу нуклеїнових кислот.

Обговорення. Серед ентерококів, ізольованих з кисломолочних продуктів домашнього приготування, нами були ідентифіковані види *E. faecalis*, *E. durans*, *E. faecium* і *E. hirae*. Представники зазначених видів, за даними літератури, є найбільш поширеними серед ізолятів з харчових продуктів [15]. У 95% штамів, досліджених в роботі, виявлена декарбоксілазна активність незалежно від виду чи джерела виділення. Отримані нами дані щодо здатності до продукції тираміну ізолятів з харчових продуктів повністю узгоджуються з даними літератури [16].

Ентерококи є одними з найпоширеніших збудників внутрішньолікарняних інфекцій, які у 75% і 20% випадків викликаються штамми видів *E. faecalis* і *E. faecium* відповідно [17]. Гемолізину відіграють важливу роль у вірулентності ентерококів, оскільки підвищують ризик розвитку інфекції [18]. Зважаючи на те, що β-гемолітична активність кодується генами плазмідної локалізації, β-гемолітичні ізоляти не можуть бути використані у харчовій промисловості як заквасочні культури [4]. Серед досліджених нами штамів β-гемолітичну активність виявили 17% штамів переважно видів *E. durans* і *E. faecium*. За даними інших авторів щодо виявлення β-гемолітичних штамів дані різняться. Так, авторами серед ізолятів з харчових продуктів частіше виділялись β-гемолітичні штами *E. faecalis* (38,7%), ніж *E. faecium* (0,7%) [8].

Стійкість до антибіотиків є важливим критерієм оцінки безпечності ентерококів. Досліджені в роботі ентерококи найчастіше були стійкими до еритроміцину (86,8% штамів), ципрофлоксацину (78,4%), норфлоксацину (70,5%) і рифампіцину (67,2%). Автори повідомляли про високу частоту виявлення стійкості до левофлоксацину, ципрофлоксацину і рифампіцину, тетрацикліну, еритроміцину серед штамів *E. faecium* і *E. faecalis*, ізольованих з продуктів домашнього приготування [20]. Частота антибіотикорезистентності серед досліджених нами штамів ентероко-

| Кількість штамів (%) | ІНГІБІТОРИ СИНТЕЗУ КЛІТИННОЇ СТІНКИ | | | | | ІНГІБІТОРИ СИНТЕЗУ БІЛКА | | | | | ІНГІБІТОРИ ТРАНСКРИПЦІЇ І СИНТЕЗУ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ | | | | | | |
|----------------------|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------------|-----|-----|-----|-----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | БЕН | АМП | ВАН | ТЕЙ | ФОС | ТЕТ | ДОК | ЭРИ | ХЛФ | ЛИН | ГЕН | НОР | ЦИП | ГАТ | ЛЕВ | РИФ | НИТ |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5(2,15%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3(1,29%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 22 (9,48%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9(3,87%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3(1,29%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4(1,72%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 (3,01%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5(2,15%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3(1,29%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3(1,29%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 (8,62%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3(1,29%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 (6,45%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3(1,29%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3(1,29%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| Кількість штамів (%) | ІНГІБИТОРИ СИНТЕЗУ КЛІТИННОЇ СТІНКИ | | | | | ІНГІБИТОРИ СИНТЕЗУ БІЛКА | | | | | ІНГІБИТОРИ ТРАНСКРИПЦІЇ І СИНТЕЗУ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ | | | | | | |
|----------------------|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------------|-----|-----|-----|-----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | БЕН | АМП | ВАН | ТЕЙ | ФОС | ТЕТ | ДОК | ЭРИ | ХЛФ | ЛИН | ГЕН | НОР | ЦИП | ГАТ | ЛЕВ | РИФ | НИТ |
| 7 (3,01%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4(1,72%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(0,86%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3(1,29%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(0,43%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Рис. 5. Профілі антибіотикорезистентності штамів виду *E. faecalis*

ків до ванкоміцину, тетрацикліну, високих концентрацій гентаміцину була нижчою в порівнянні з даними інших авторів. Так, серед ізолятів з сиру в Туреччині 86,1% штамів були стійкими до ванкоміцину [7]. Стійкість до тетрацикліну серед штамів, ізольованих з кишківника курчат-бройлерів, сягала 85% [9]. Хоча ентерококи природньо нечутливі до низьких концентрацій гентаміцину, стійкість до високих концентрацій була виявлена авторами у багатьох ізолятів з кисломолочних продуктів [1, 20]. За

| Кількість штамів (%) | ІНГІБИТОРИ СИНТЕЗУ КЛІТИННОЇ СТІНКИ | | | | | ІНГІБИТОРИ СИНТЕЗУ БІЛКА | | | | | ІНГІБИТОРИ ТРАНСКРИПЦІЇ І СИНТЕЗУ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ | | | | | | |
|----------------------|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------------|-----|-----|-----|-----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | БЕН | АМП | ВАН | ТЕЙ | ФОС | ТЕТ | ДОК | ЭРИ | ХЛФ | ЛИН | ГЕН | НОР | ЦИП | ГАТ | ЛЕВ | РИФ | НИТ |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6(7,8%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(2,6%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(2,6%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(2,6%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8(10,4%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15(19,5%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6(7,8%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(2,6%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3(3,9%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(2,6%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6(7,8%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2(2,6%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 (1,3%) | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Рис. 6. Профілі антибіотикорезистентності штамів виду *E. durans*

| Кількість штамів (%) | ІНГІБИТОРИ СИНТЕЗУ КЛІТИННОЇ СТІНКИ | | | | | ІНГІБИТОРИ СИНТЕЗУ БІЛКА | | | | | ІНГІБИТОРИ ТРАНСКРИПЦІЇ І СИНТЕЗУ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ | | | | | | |
|----------------------|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------------|-----|-----|-----|-----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | БЕН | АМП | ВАН | ТЕЙ | ФОС | ТЕТ | ДОК | ЕРИ | ХЛФ | ЛИН | ГЕН | НОР | ЦИП | ГАТ | ЛЕВ | РИФ | НИТ |
| 1 (3,33%) | | | | | | | ■ | ■ | | | | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | | ■ | ■ | | | | ■ | ■ | ■ | | | |
| 5 (16,70%) | | | | | | | ■ | ■ | | | | ■ | ■ | ■ | | | |
| 7 (23,30%) | | | | | | | ■ | ■ | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | | ■ | ■ | | | | ■ | ■ | ■ | | | ■ |
| 1 (3,33%) | | | | | | | ■ | ■ | | | | ■ | ■ | ■ | | | ■ |
| 1 (3,33%) | | | | | | | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 3 (10,00%) | | | | | | | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | ■ |
| 1 (3,33%) | | | | | | | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | ■ | ■ | | | | | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | ■ | ■ | | | | | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 1 (3,33%) | | | | | | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | | | |

Рис.7. Профілі антибіотикорезистентності штамів виду *E. faecium*

даними літератури стійкість до еритроміцину, тетрацикліну та рифампіцину є притаманною для ентерококів харчового походження і може бути пов'язана з використанням даних препаратів у тваринництві [19, 21]. Але з іншого боку, порівнювати отримані нами дані щодо частоти виділення антибіотикостійких штамів з даними інших авторів складно. Це пов'язано, в першу чергу, з різними джерелами виділення, а також з переліком дозволених до використання антибактеріальних препаратів у різних країнах [22]. Розповсюдженість в продуктах стійких до ванкоміцину штамів ентерококів несе великий ризик, оскільки ванкоміцин застосовується при лікуванні ентерококових інфекцій, що викликані стійкими до інших препаратів штамми. Резистентність ентерококів до еритроміцину також викликає занепокоєння, оскільки макроліди можуть використовуватися для лікування пацієнтів з алергією на пеніциліни [3].

Особливою проблемою при лікуванні ентерококових інфекцій є поява і широке розповсюдження мультирезистентних штамів, стійких до різних за хімічною будовою і механізмами дії антибіотиків. Стійкі до ряду антибактеріальних препаратів, а також мультирезистентні штами частіше зустрічались серед представників виду *E. faecium*.

За даними літератури відомо, що рівень антибіотикорезистентності ентерококів може бути видоспецифічним, і штами виду *E. faecium* є більш стійкими до антибіотиків в порівнянні з видом *E. faecalis* [3].

Отже, наявність стійких до антибіотиків штамів ентерококів в кисломолочних продуктах може бути пов'язана як з надмірним використанням даних препаратів у тваринництві, так і незадовільними санітарними умовами їх виготовлення. Кисломолочні продукти, виготовлені в домашніх умовах, можуть слугувати резервуаром вірулентних, потенційно небезпечних для здоров'я людини мультирезистентних штамів ентерококів.

УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ, ДЕКАРБОКСИЛАЗНАЯ И ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТИ ЭНТЕРОКОККОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ТРАДИЦИОННЫХ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

И.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко, Л.Т. Олещенко

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

Резюме

Цель. Определить видовой состав, устойчивость к антибиотикам, декарбоксилазную и гемолитическую активности энтерококков, изолированных из традиционных кисломолочных продуктов. **Методы.** Идентификацию на уровне вида проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Устойчивость к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом, декарбоксилазную активность – при росте на средах с аминокислотами, гемолитическую активность определяли при выращивании штаммов энтерококков на кровяном агаре. **Результаты.** Среди изученных изолятов штаммы вида *Enterococcus faecalis* составляли 67,8%, *E. durans* – 18,8%, *E. faecium* – 6,4%, *E. hirae* – 0,2%, *Enterococcus* spp. – 6,7%. Более 60% штаммов энтерококков были устойчивыми к эритромицину, норфлоксацину, ципрофлоксацину и рифампицину. Из исследованных штаммов 56,76% выявили устойчивость к 5–11 антибактериальным препаратам из 17, использованных в работе. Устойчивость к ванкомицину и гентамицину выявили только штаммы вида *E. faecalis*. Тирамин продуцировали 95,4% штаммов, β-гемолитическая активность обнаружена у 20% штаммов. Наименьшее количество антибиотикорезистентных штаммов и продуцентов тирамина обнаружено среди представителей вида *E. durans*, а β-гемолитических – среди штаммов вида *E. faecalis*. **Выводы.** Кисломолочные продукты, изготовленные в домашних условиях, могут служить резервуаром вирулентных, потенциально опасных для здоровья человека мультирезистентных штаммов энтерококков.

Ключевые слова: энтерококки, устойчивость к антибиотикам, биогенные амины, кисломолочные продукты.

RESISTANCE TO ANTIBIOTICS, DECARBOXYLASE AND HAEMOLYTIC ACTIVITIES OF ENTEROCOCCI ISOLATED FROM TRADITIONAL DAIRY PRODUCTS

I. L. Garmasheva, N. K. Kovalenko, L. T. Oleschenko

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

Aims. Determination of the species composition, resistance to antibiotics, decarboxylase and haemolytic activities of enterococci, isolated from traditional dairy products. **Methods.** For species-level identification the polymerase chain reaction (PCR) was used, disk diffusion method was used to determine antibiotic resistance, decarboxylase activity was determined on media with amino acids, haemolytic activity was determined during growth of enterococci strains on blood agar. **Results.** Among investigated enterococci strains of species *Enterococcus faecalis* consists 67,8%, *E. durans* – 18,8%, *E. faecium* –

6,4%, *E. hirae* – 0,2%, *Enterococcus* spp. – 6,7%. More than 60% of enterococci were resistant to erythromycin, norfloxacin, ciprofloxacin and rifampicin. Among investigated in the work strains, 56,76% were resistant to 5-11 antibiotics from 17 used in the study. Resistance to vancomycin and gentamycin was found only in *E. faecalis* strains. Tyramine production was detected in 95,4% strains, β -haemolytic activity was found in 20% strains. The less count of antibiotic resistant strains and tyramine producers was found among strains of *E. durans*, and β -haemolytic – among strains of *E. faecalis*. **Conclusion.** Artisanal dairy products may act as a reservoir of virulent, potentially dangerous for human's health multiresistant strains of enterococci.

Keywords: enterococci, resistance to antibiotics, biogenic amines, dairy products.

1. Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol.* 2003 (2-3);88:215–222.
2. Linares DM, Martín MC, Ladero V, Alvarez MA, Fernández M. Biogenic amines in dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51(7):691–703.
3. Oggier JC, Serror P. Safety assessment of dairy microorganisms. The *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol.* 2008;126(3):291–301.
4. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001;67(4):1628–1635.
5. Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2001;4(5):493–499.
6. Belicova A, Krizkova L, Krajcovic J, Jurkovic D, Sojka M, Ebringer L and Dusinsky R. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* species isolated from slovak bryndza cheese. *Folia Microbiol (Praha).* 2007;52(2):115-119
7. Çitak S, Yucel N, Orhan S. Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 2004;57(1): 27–31.
8. Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, Franco BDGM, De Martinis EP. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.* 2008;25(5): 668–675.
9. Harada T, Mito Y, Otsuki K, Murase T. Resistance to gentamicin and vancomycin in enterococcal strains isolated from retail broiler chickens in Japan. *J. Food Prot.* 2004;67(10):2292–2295.
10. Garmasheva I. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Ukrainian traditional dairy products. *AIMS Microbiol.* 2016;2(3): 372-387.
11. Harmasheva IL, Kovalenko NK, Zelena LB. [Identification of enterococcus strains]. *Microbiol Z.* 2009;71(2):3-12. Ukrainian
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty first informational supplement. Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Inst. 2011;31(1):M100- S21.
13. [Methodological instructions «Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial preparations». Order of the Ministry of Health of Ukraine № 167 from 05.04.2007 year]. Ukrainian
14. Bover-Cid S, Holzapfel WH. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 1999; 53(1):33–41.

15. Gelsomino R, Vancanneyt M, Cogan TM, Condon S, Swings J. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(7):3560–3565.
16. Ladero V, Fernández M, Alvarez MA. Isolation and identification of tyramine-producing enterococci from human fecal samples. *Can J Microbiol.* 2009; 55(2):215–218.
17. Peel T, Cheng AC, Spelman T, Huysmans M, Spelman D. Differing risk factors for vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococcal bacteraemia. *Clin Microbiol Infect.* 2011;18(4):388e394.
18. Morandi S, Brasca M, Andrighetto C, Lombardi A and Lodi R. Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *Int Dairy J.* 2006;16(8):867–875.
19. Sanchez Valenzuela A, Ben Omar N, Abriouel H, Lucas Lopez R, Veljovic K, Martinez Canamero M, Ljubisa Topisirovic MK and Galvez A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control.* 2009;20(4):381-385.
20. Hummel AS, Holzapfel WH and Franz CMAP. Characterization and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst Appl Microbiol.* 2007;30(1):1–7.
21. Huys G, D’Haene K, Collard JM, Swings J. Prevalence and molecular characterisation of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(3):1555–1562.
22. Aarestrup FM, Hasman H, Jensen LB, Moreno M, Herrero IA, Domínguez L, Finn M, Franklin A. Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(8):4127–4129.

Отримано 5.06.2017