

УДК 579.86:615.33.015.8

DOI: 10.34215/1609-1175-2024-2-55-59



Анализ устойчивости бактерий рода *Enterococcus* к антибиотикам

А.В. Мартынова^{1,2}, С.С. Ускова²¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Цель. Изучить влияние антибактериальных веществ на бактерии рода *Enterococcus*, выделенных из водной среды с антропогенной нагрузкой. **Материалы и методы.** Исследование 61 штамма рода *Enterococcus*, выделенных в водных пробах реки Вторая речка, полученных на территории г. Владивостока, производилось в период с 17 января 2018 г. по 27 сентября 2020 г. Устойчивость к антибиотикам изучалась при помощи диско-диффузионного метода. Статистическая обработка данных производилась в программе Statistica 10. Графики формировались в программе Excel 10. **Результаты.** Исследование чувствительности 61 штамма рода *Enterococcus* к антибиотикам показало, что большинство штаммов были резистентными к стрептомицину 66% ($n = 40$), к эритромицину 56% ($n = 33$) промежуточно устойчивых штаммов, к рифампицину было обнаружено 72% ($n = 44$) резистентных штаммов, к гентамицину – 87% ($n = 52$) чувствительных штаммов, а к ванкомицину – 25% ($n = 15$) промежуточно устойчивых и 3% ($n = 2$) резистентных изолятов. **Заключение.** Изучение антибиотикорезистентности у штаммов рода *Enterococcus* выделенных из р. Вторая Речка, показало повышенный уровень устойчивых к рифампицину и стрептомицину штаммов. Выделенная в р. Вторая Речка популяция штаммов энтерококков характеризовалась резистентностью к двум антибиотикам 41% ($n = 25$), однако один штамм обладает полирезистентностью к шести антибиотикам. Чаще всего встречалась резистентность к сочетанию таких антибиотиков, как стрептомицин, рифампицин и эритромицин.

Ключевые слова: *Enterococcus*, антибиотики, полирезистентность

Поступила в редакцию: 30.04.23. Получена после доработки: 03.05.23, 11.07.23, 24.11.23. Принята к публикации: 25.11.23

Для цитирования: Мартынова А.В., Ускова С.С. Анализ устойчивости бактерий рода *Enterococcus* к антибиотикам. Тихоокеанский медицинский журнал. 2024;2:55–59. doi: 10.34215/1609-1175-2024-2-55-59

Для корреспонденции: Мартынова Алина Викторовна – д-р мед. наук, профессор кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии Тихоокеанского медицинского университета (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2); профессор кафедры биоразнообразия и морских биоресурсов Дальневосточного федерального университета (690922, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10); ORCID: 0000-0001-6823-5971; тел.: +7 (914) 701-69-08; e-mail: clinmicro@yandex.ru

Analysis of antibiotic resistance in *Enterococcus*

A.V. Martynova^{1,2}, S.S. Uskova²¹ Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia; ² Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Objective. To study the effect of antibacterial substances on bacteria *Enterococcus* isolated from the aquatic environment with anthropogenic load. **Materials and methods.** Study of 61 strains of *Enterococcus* isolated from water samples of the Vtoraya Rechka river, the Vladivostok territory, was conducted in the period from January 17, 2018 to September 27, 2020. The antibiotic resistance was determined using the disc diffusion test. Statistical data processing was carried out by the Statistica 10 program. Graphs were performed in Excel 10. **Results.** The study into susceptibility of 61 strains of *Enterococcus* to antibiotics revealed the majority of resistant strains to streptomycin (66%, $n=40$), 56% ($n=33$) intermediate strains to erythromycin, 72% ($n=44$) resistant strains to rifampicin, 87% ($n=52$) susceptible strains to gentamicin, 25% ($n=15$) intermediate resistant isolates, and 3% ($n=2$) resistant isolates. **Conclusion.** The study of antibiotic resistance in strains of *Enterococcus* isolated from the Vtoraya Rechka river showed high levels of rifampicin and streptomycin resistant strains. The population of *enterococci* strains isolated from the Vtoraya Rechka river appeared 41%-resistant to two antibiotics ($n=25$), however, one strain proved multidrug resistance to six antibiotics. Resistance to a combination of streptomycin, rifampicin, and erythromycin antibiotics was most commonly detected.

Keywords: *Enterococcus*, antibiotics, multidrug resistance

Received 30 April 2023; Revised 5 May, 11 July, 24 November 2023; Accepted 25 November 2023

For citation: Martynova A.V., Uskova S.S. Analysis of antibiotic resistance in *Enterococcus*. Pacific Medical Journal. 2024;2:55–59. doi: 10.34215/1609-1175-2024-2-55-59

Corresponding author: Alina V. Martynova, Dr. Sci. (Med.), Professor of the Epidemiology Department of the Pacific Medical University (2 Ostryakova Ave, Vladivostok, 690002, Russia); Professor of the Department of Biodiversity and Marine Bioresources, Far Eastern Federal University (10 Ajaks, Russky Island, Vladivostok, 690922, Russia); ORCID: 0000-0001-6823-5971; tel.: +7 (914) 701-69-08; e-mail: clinmicro@yandex.ru

Микроорганизмы рода *Enterococcus* – представители типичной кишечной микрофлоры млекопитающих, причина многих заболеваний человека и животных: эндокардиты, маститы, метриты, сепсис новорожденных и др. [1]. Патогенность представителей рода

Enterococcus неотъемлема от их чувствительности к антибиотикам и связана с наличием детерминант патогенности в одних и тех же носителях генетической информации [2]. Самыми распространенными видами рода *Enterococcus* являются *E. faecalis* и *E. faecium*,

среди которых чаще всего встречается такой вид, как *E. faecalis*. Однако в зависимости от различных экологических условий биотопов возможны разные соотношения этих микроорганизмов в микробиоценозе, кроме того, может отмечаться и наличие других видов рода *Enterococcus*. *E. faecalis* считается более патогенным по сравнению с *E. faecium*, однако последний имеет большую устойчивость к антибиотикам [3].

На данный момент антибиотикорезистентность энтерококков, выделенных от животных, является серьезной проблемой, поскольку неправильное использование антибактериальных препаратов, а также применение в сельском хозяйстве ампициллина и гентамицина в качестве пищевых добавок для стимуляции роста создают условия для формирования в организме животных резистентных к антибиотикам штаммов энтерококков [4]. Доказано, что антибиотикорезистентные представители рода *Enterococcus* могут передаваться от зараженных животных к человеку из-за тесного контакта или при употреблении в пищу продуктов животного происхождения [5].

Виды энтерококков, включая наиболее клинически важных представителей этого рода, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, являются нормальной микрофлорой желудочно-кишечного тракта человека и поэтому повсеместно встречаются в бытовых сточных водах. Сточные воды могут загрязнять поверхностные и грунтовые воды многими путями, включая неадекватную очистку сточных вод, разливы из-за неисправности или перегрузки инфраструктуры, а также удаления отходов животноводства на сушу или в водные объекты, обеспечивая попадание в организм людей путем заглатывания воды или при бытовых контактах с загрязненной водой [3]. В соответствии с нормативными документами необходимо уделить особое внимание к определению чувствительности к антибиотикам для групп микроорганизмов с высокой частотой распространения и приобретенной устойчивостью [6]. В связи с этим целью данного исследования являлось изучить устойчивость штаммов рода *Enterococcus* к антибиотикам и дезинфектантам, выделенных на территории водных объектов г. Владивостока.

Материалы и методы

Из образцов воды (из р. Вторая Речка в период 17 января 2018 по 27 сентября 2020 года), выделили 61 штамм микроорганизмов и идентифицировали их как бактерии рода *Enterococcus* с помощью бактериологических методов исследований (выделение чистой культуры микроорганизма на среде «Энтерококкагар» (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия) с добавлением 1,5% дрожжевого экстракта). Далее идентификация проводилась методом полимеразной цепной реакции.

Штаммы идентифицировали с помощью мультиплексной ПЦР с использованием известных праймеров (табл. 1) по видоспецифическим генам, кодирующим синтез супероксиддисмутазы. Синтез праймеров осуществлен компанией «Синтол» (Москва). Для обнаружения генов, кодирующих синтез супероксиддисмутазы, проводили мультиплексную ПЦР с 1 мкл лизата в термоциклере «Терцик» (ДНК Технология, Россия) по следующему протоколу: 1 цикл – 92 °С, 4 мин; 30 циклов: 92 °С, 30 сек; 55 °С, 1 мин; 72 °С, 1 мин; последний цикл включал элонгацию в течение 7 мин при 72 °С. Продукты амплификации анализировали путем электрофоретического разделения в горизонтальном 1% агарозном геле, окрашенным бромистым этидием, ТАЕ буферной системе. В качестве маркеров использовали GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определенной массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс.

Изучение устойчивости к антибиотикам проводилось диско-диффузионным методом, основанным на способности антибиотика диффундировать из пропитанных ими дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, на поверхности питательных сред [6]. Диски с антибиотиками были представлены препаратами групп аминогликозидов, фторхинолонов, макролидов, тетрациклина стрептомицина. Для оценки чувствительности к антимикробным препаратам использовали критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Enterococcus spp.* МУК 4.2.1890-04 (табл. 2).

Таблица 1

Результаты индентификации штаммов методом мультиплексной ПЦР

Вид энтерококка	Праймер	Последовательность 5'-3'	Размер продукта реакции, п. о.
<i>E. faecalis</i>	FL1 FL2	ACTTATGTGACTAACTTAACC TAATGGTGAATATTGGTTTGG	360
<i>E. faecium</i>	FM1 FM2	GAAAAACAATAGAAGAATTAT TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA	215
<i>E. durans</i>	DU1 DU2	CCTACTGATATTAAGACAGCG TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	295
<i>E. casseliflavus</i>	CA1 CA2	TCCTGAATTAGGTTGAAAAAAC GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	288
<i>E. fallinarum</i>	GA1 GA2	TTACTTGCTGATTTTGATTCG TGAATTCTTCTTTGAAATCAG	173

Таблица 2

Оценка чувствительности к антимикробным препаратам *Enterococcus spp*

Антибиотик	Содержание в диске (мкг)	Диаметр зон подавления роста (мм)		
		Резистентные	Промежуточно устойчивые	Чувствительные
Тетрациклин	30	≤ 14	15–18	≥ 19
Стрептомицин	300	≤ 6	7–9	≥ 10
Эритромицин	15 мг	≤ 13	14–22	≥ 23
Ампициллин	10	≤ 16	-	≥ 17
Левифлоксацин	5	≤ 13	14–16	≥ 17
Рифампицин	5	≤ 16	17–19	≥ 20
Гентамицин	120	≤ 6	7–9	≥ 10
Ванкомицин	30	≤ 14	15–16	≥ 17

Статистическая обработка данных производилась в программе Statistica 10. Графики и таблицы формировались в программе Excel.

Результаты исследования

Исследование чувствительности к антибиотикам бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из р. Вторая Речка, показало, что большинство штаммов были чувствительны к тетрациклину и составляли 80% ($n = 49$) от всех штаммов исследуемой группы, промежуточной устойчивостью обладали 5% ($n = 3$), а 15% ($n = 9$) были резистентны к антибиотикам. По отношению к стрептомицину было обнаружено 11% ($n = 7$) чувствительных штаммов, 23% ($n = 14$) промежуточно-устойчивых и 66% ($n = 40$) резистентных; к эритромицину – 16% чувствительных ($n = 10$), промежуточно-устойчивых 56% ($n = 33$) и 30% ($n = 18$) резистентных; к ампициллину было чувствительно 95% ($n = 58$) и 5% ($n = 3$) резистентно. К левифлоксацину 84% ($n = 51$) исследуемой коллекции было чувствительно, 10% ($n = 6$) – промежуточно-устойчиво и 6% ($n = 4$) резистентно; к рифампицину – 18% ($n = 11$) чувствительных, промежуточно-устойчивых 10% ($n = 6$) и 72% ($n = 44$) резистентных; к гентамицину – 87% ($n = 52$) чувствительных штаммов, 3% ($n = 2$) промежуточно-устойчивых и 10% ($n = 6$) были резистентными: при этом к ванкомицину было обнаружено 72% ($n = 44$) чувствительных, промежуточно-устойчивых 25% ($n = 15$) и 3% ($n = 2$) резистентных (рис. 1).

Анализ полирезистентности в р. Второй Речке показал, что большинство штаммов проявляли резистентность к двум антибиотикам, а именно 41% ($n = 25$), при этом 20% ($n = 12$) были резистентными к трем антибиотикам, четырем антибиотикам – 8% ($n = 5$) и только 2% ($n = 1$) – к шести антибиотикам. Также стоит отметить, что было 8% ($n = 5$) штаммов, не проявлявших резистентность, однако среди них встречались и штаммы с промежуточной устойчивостью (рис. 2).

Обсуждение полученных данных

В настоящее время одним из маркеров антропогенного влияния на окружающую среду является устойчивость микроорганизмов к антибактериальным препаратам [7]. Появляется все больше исследований, в которых пытаются оценить масштабы распространения антибиотико-резистентных микроорганизмов, что используется как признак антропогенного влияния человека на окружающую среду [2]. Чаще всего это замечают эпидемиологи, так как существует возможность распространения инфекций [8]. Тем не менее для экологов эта проблема также не остается незамеченной, поскольку в случае сосуществования аллохтонных и автохтонных микроорганизмов может произойти горизонтальный перенос генов, а точнее ген устойчивости к антибиотикам от автохтонных к аллохтонам и наоборот [7].

Поскольку энтерококки сохраняются в воде непродолжительное время, а также относительно устойчивы

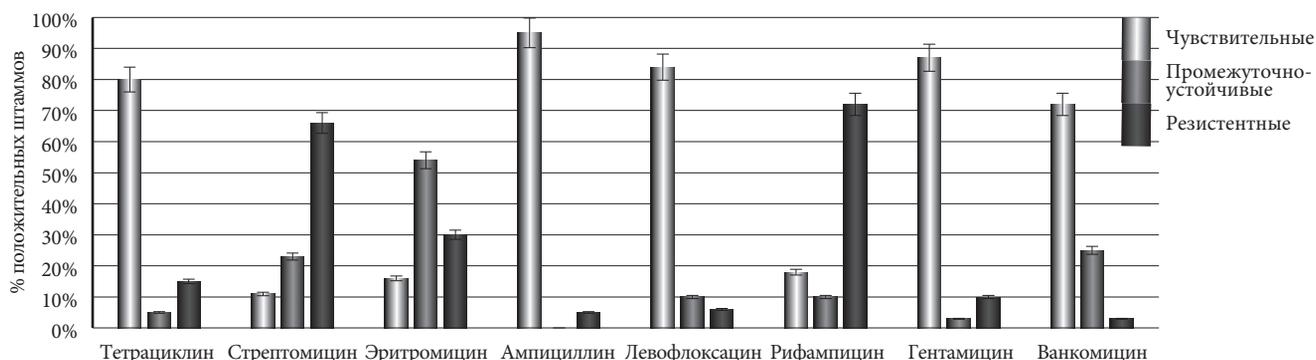


Рис. 1. Устойчивость к антибактериальным химиопрепаратам штаммов рода *Enterococcus*, выделенных в реке Вторая Речка.

к факторам внешней среды, таким как температура, pH, солнечное излучение, соленость воды и некоторые дезинфицирующие вещества [9], то представители рода *Enterococcus* были рекомендованы в качестве санитарно-показательных микроорганизмов для исследования пресной и морской воды, что нашло отражение в Методических указаниях МУК 4.2.1884-04; МУ 4.2.2959-11. Более современные исследования продемонстрировали, что использование стандартных методов, которые основаны на культивировании бактерий, могут привести к неточной оценке их фактического количества в окружающей среде, поскольку они могут переходить в жизнеспособное, но некультивируемое состояние [10].

Отсутствие научного управления и надлежащего планирования приводит к чрезмерному использованию антибактериальных веществ, тем самым увеличивая распространения в микробиоме окружающей среды генов с устойчивостью к антибиотикам [11]. Количество внеклеточных и внутриклеточных генов с устойчивостью к антибиотикам значительно увеличивается при хлорировании на очистных сооружениях и в тепличных почвах с фунгицидами [12]. Более того, разбавленные и оставшиеся в окружающей среде антибактериальные вещества могут повысить устойчивость бактерий за счет фенотипической адаптации, генных мутаций и горизонтального переноса генов [13]. Помимо этого, постоянное воздействие антибактериальных веществ на бактерии способствует развитию их устойчивости. Скорость роста устойчивых к антибактериальным веществам бактерий растет, что значительно снижает их эффективность [14]. Часто обнаруживают бактерии с множественной лекарственной устойчивостью, которые представляют серьезную угрозу для здоровья человека и экосистемы. Отчеты о механизме устойчивости к антибактериальным веществам недостаточно полны, а сводные данные о распространении устойчивости к антибактериальным веществам упоминаются редко [15], поэтому необходимо помимо устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам уделить внимание резистентности представителей рода *Enterococcus* к антибактериальным веществам.

Изучение антибиотикорезистентности у штаммов рода *Enterococcus*, выделенных из р. Вторая Речка, показало, что отмечается повышенный уровень устойчивых к рифампицину и стрептомицину, более того, устойчивость к ванкомицину обнаружена у 3% ($n = 2$) выделенных штаммов. Выделенная в реке Вторая Речка популяция штаммов энтерококков характеризовалась резистентностью к двум антибиотикам 41% ($n = 25$), однако был выделен один штамм, который обладает полирезистентностью к шести антибиотикам. Чаще всего встречалась резистентность к сочетанию таких антибиотиков, как стрептомицин, рифампицин и эритромицин. Общность характера формирования устойчивости к аминогликозидам, а также значительная доля резистентных к стрептомицину



Рис. 2. Полирезистентность бактерий рода *Enterococcus* к антибиотикам, выделенных из р. Вторая Речка.

штаммов позволяет предположить возможность появления ванкомицин-устойчивых штаммов энтерококков в ближайшем будущем, что является чрезвычайно актуальным для санитарно-микробиологической и гигиенической характеристики среды пребывания человека.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования: авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств.

Литература / References

1. Красная Ю.В., Нестеров А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И. Значение бактерий рода *Enterococcus* в жизнедеятельности человека. *Современные проблемы науки и образования*. 2014;(3):1169–78. [Krasnaya YuV, Nesterov AS, Potaturkina-Nesterova NI. Significance of the bacterial species *Enterococcus* in human life. *Modern problems of science and education*. 2014;(3):1169–78 (In Russ.)].
2. Veljovic K, Popovic N, Vidojevic AT, Tolinacki M, Mihajlovic S, Jovic B, Kojic M. Environmental waters as a source of antibiotic-resistant *Enterococcus* species in Belgrade, Serbia. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2015;187(9):1–15. doi: 10.1007/s10661-015-4814-x
3. Burgmann H, Frigon D, Gaze WH, Manaia CM, Pruden A, Singer AC, Smets BF, Zhang T. Water, and sanitation: an essential battlefield in the war on antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol Ecol*. 2018;94:1–14. doi: 10.1093/femsec/fiy101
4. Hammerum A. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(7):619–25. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03829.x
5. Пашвина Д.В. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков, выделенных от животных: дис. ... канд. биол. наук. *Оренбург*. 2015:116. [Pashvina DV. Characteristics of the virulence potential of clinical isolates of enterococci isolated from animals: dis. cand. biol. Sciences. *Orenburg*. 2015: 116 p. (In Russ.)].
6. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>
7. Любова Т.И. Биологические особенности автохтонных и аллохтонных бактерий из оз. Шира и маркеры антропогенного воздействия на водную экосистему: дис. ... канд.

- биол. наук. Пермь. 2003;148. [Lyubova TI. Biological features of autochthonous and allochthonous bacteria from the lake. Shira and markers of anthropogenic impact on the aquatic ecosystem: dis. cand. biol. Sciences. Perm. 2003;148 (In Russ.)].
8. McArthur JV, Tuckfield RC. Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66:3722–6. doi: 10.1128/AEM.66.9.3722-3726.2000
 9. Oliver JD. The viable but nunculturable state in Bacteria. *Journal of Microbiology*. 2005;43:93–100. PMID: 15765062
 10. Gin KYH, Goh SG. Modeling the effect of light and salinity on viable but non-culturable (VBNC) *Enterococcus*. *Water Research*. 2013;47(10):3315–28. doi: 10.1016/j.watres.2013.03.021
 11. Kim M, Weigand S. Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018;84:7–19. doi: 10.1128/AEM.01201-18
 12. Bai X, Ma X, Xu F, Li J, Zhang H, Xiao X. The drinking water treatment process as a potential source of affecting the bacterial antibiotic resistance. *Sci. Total Environ.* 2015;533:24–31. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.082
 13. Cloete TE. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2003;51:277–82. doi: 10.1016/S0964-8305(03)00042-8
 14. Zhu Z, Shan L, Zhang X, Hu F, Zhong D, Yuan Y, Zhang J. Effects of bacterial community composition and structure in drinking water distribution systems on biofilm formation and chlorine resistance. *Chemosphere*. 2020;264:1–12. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128410
 15. Tong C, Hu H, Chen G, Li Z, Li A, Zhang J. Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. *Environmental Research*. 2021;195:1–9. doi: 10.1016/j.envres.2021.110897