

Антибиотикорезистентность штаммов энтерококков, циркулирующих в Оренбургской области

М.В. Сычёва, к.б.н., ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ

Бактерии рода *Enterococcus* представляют особый научный и практический интерес, так как, с одной стороны, рассматриваются в качестве представителей нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта млекопитающих и благодаря наличию целого ряда полезных свойств для макроорганизма активно применяются в медицине в качестве пробиотиков. С другой стороны, *Enterococcus spp.* являются условно-патогенными микроорганизмами и могут выступать в роли этиологического агента экзогенных и эндогенных инфекционных процессов [1].

Энтерококки выработали устойчивость практически ко всем группам антимикробных препаратов, применяемых в клинической практике, используя для этого разнообразные генетические стратегии. Мультирезистентные энтерококки прекрасно адаптированы к выживанию в желудочно-кишечном тракте и могут становиться доминирующей флорой на фоне назначения антибиотиков, представляя серьёзную опасность в качестве возбудителей эндогенных инфекций [2].

Эмпирическое применение антибактериальных препаратов для терапии животных с инфекциями энтерококковой этиологии возможно лишь при определённом известном уровне резистентности *Enterococcus spp.* к этим средствам в данном регионе

или в данной популяции животных, что позволяет достаточно точно прогнозировать эффект терапии. В связи с этим актуальным является определение состояния региональной антибиотикорезистентности энтерококков для выбора адекватной стартовой антибактериальной терапии, что и предопределило **цель** настоящего исследования – изучить антибиотикорезистентность штаммов *Enterococcus spp.*, выделенных от животных в Оренбургской области.

Материал и методы исследования. В работе было изучено 334 штамма бактерий рода *Enterococcus*. Из них 162 изолята, выделенные из фекалий клинически здоровых сельскохозяйственных животных, сформировали I гр. и 172 штамма *Enterococcus spp.*, изолированные от продуктивных животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, составили II гр. сравнения. Штаммы энтерококков идентифицировали до вида при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) по наличию видоспецифических генов, кодирующих синтез супероксиддисмутазы [3].

Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) определяли диско-диффузионным методом [4]. При помощи ПЦР-анализа у изолятов энтерококков определяли гены, кодирующие резистентность к аминогликозидам [5], тетрациклам [6] и гликопептидам [7] (высокий уровень резистентности к гентамицину – *aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia*, резистентность к аминоглико-

зидам (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 в ходе исследований численные материалы были обработаны статистически [8].

Результаты исследования. В результате идентификации, проведённой с помощью мультиплексной ПЦР, из 162 кишечных изолятов энтерококков 45 штаммов (27,8%) были отнесены к виду *E. faecium*, 39 культур (24,1%) идентифицированы как *E. hirae*, 36 изолятов (22,2%) – *E. durans*, 21 культура (12,9%) – *E. faecalis*, 15 штаммов (9,3%) – *E. flavescens* и 6 изолятов (3,7%) – *E. casseliflavus*. Видовой состав клинических изолятов энтерококков был не менее разнообразным, однако доминирующее положение занимали культуры вида *E. faecalis* (79,1%). 9 культур (5,2%) принадлежали к виду *E. faecium*, 8 (4,7%) – *E. casseliflavus*, 7 штаммов (4,1%) – *E. flavescens*. В единичных случаях высевали *E. hirae* (1,7%), *E. avium* (2,3%), *E. durans* (2,9%).

По данным определения чувствительности энтерококков к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом установлено, что 85,1±2,79% фекальных и 28,0±3,42% клинических изолятов были чувствительны к ванкомицину ($P < 0,001$). Умеренной резистентностью к изучаемому гликопептиду характеризовались соответственно 13,0±2,64 и 23,2±3,22% культур ($P < 0,05$). Ванкомицинрезистентные культуры *Enterococcus spp.* встречались среди клинических изолятов в 25 раз чаще, чем среди штаммов, выделенных из кишечника, – 48,8±3,81 и 1,9±1,07% соответственно ($P < 0,001$).

В отношении ампициллина фекальные изоляты энтерококков сохраняли чувствительность в 87,0±2,64% случаев, клинические – в 100%. У 13,0±2,64% культур *Enterococcus spp.*, выделенных из кишечника здоровых продуктивных животных, зарегистрирована резистентность к ампициллину.

Высокий процент резистентных штаммов энтерококков, выделенных из кишечника, отмечен к фторхинолонам: к норфлоксацину нечувствительными оказались 33,3±3,70% изолятов, к ципрофлоксацину – 50,0±3,92% культур, к энрофлоксацину – 64,9±3,75% штаммов. Процент фекальных изолятов чувствительных и умеренно резистентных к норфлоксацину был одинаковым и составил 33,3±3,70%. В отношении ципрофлоксацина культуры *Enterococcus spp.* сохраняли чувствительность в 14,8±2,78% случаев, энрофлоксацина – в 5,5±1,79% случаев. Спектр чувствительности к фторхинолонам клинических изолятов *Enterococcus spp.* характеризовался следующими особенностями: распространённость резистентности к норфлоксацину,

ципрофлоксацину и энрофлоксацину составила 21,0±3,10, 48,8±3,81 и 62,8±1,85%, соответственно.

Среди фторхинолонов максимальную антимикробную активность в отношении 39,5±3,72% культур энтерококков, выделенных от животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, проявлял норфлоксацин. Чувствительность энтерококков к ципрофлоксацину отмечена в 18,6±2,97%, умеренная резистентность – в 32,6±3,58% случаев (рис. 1).

К тетрациклину были чувствительны 77,8±3,26% фекальных культур энтерококков и 20,9±3,10% клинических изолятов ($P < 0,001$), резистентны – 13,0±2,64 и 76,7±3,23% соответственно ($P < 0,001$). Процент культур умеренно резистентных к данному АБП был больше среди энтерококков кишечного биотопа (9,2±2,27 против 2,3±1,15% клинических изолятов ($P < 0,01$)).

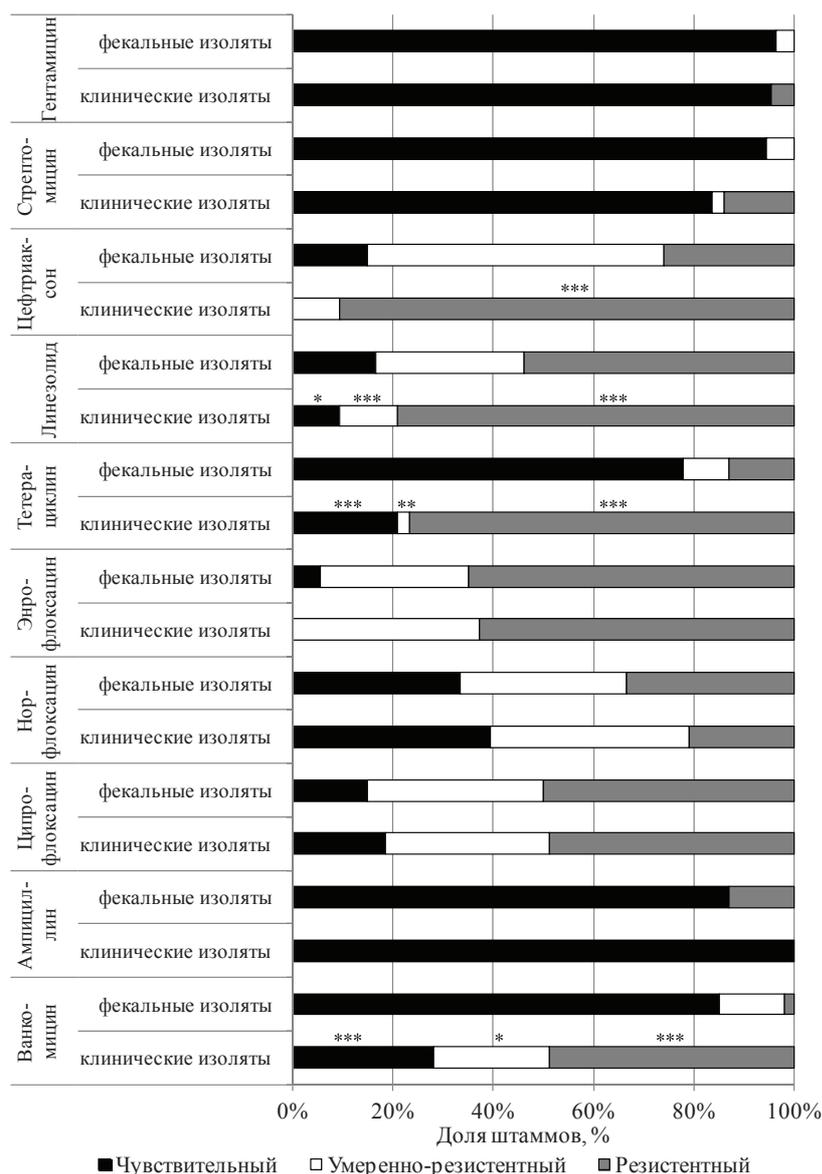
Более половины энтерококков, выделенных из фекалий и клинического материала, обладали резистентностью к линезолиду (53,8±3,91 и 79,1±3,10% соответственно ($P < 0,001$)). Только 16,6±2,92% фекальных и 9,3±2,22% клинических изолятов *Enterococcus spp.* демонстрировали чувствительность к линезолиду ($P < 0,05$), процент умеренно резистентных культур составил 29,6±3,58 и 11,6±2,44% соответственно ($P < 0,001$).

Установлено, что большинство штаммов, выделенных из клинического материала, характеризовалось выраженной резистентностью к цефтриаксону (90,7±2,21%). Умеренная резистентность к данному АБП среди клинических изолятов энтерококков определена в 9,3±2,22% случаев. Фекальные культуры энтерококков, резистентные к цефтриаксону, обнаружены в значительно меньшем проценте случаев (26,0±3,44% ($P < 0,001$)), 59,2±3,86% штаммов проявляли умеренную резистентность к данному цефалоспоринолу и только 14,8±2,78% изолятов демонстрировали чувствительность.

Высокий процент чувствительных штаммов энтерококков фекального происхождения отмечен к аминогликозидам: к стрептомицину чувствительными оказались 94,5±1,79% изолятов, к гентамицину – 96,3±1,48% культур.

Уровень чувствительности клинических изолятов энтерококков к аминогликозидам (стрептомицин и гентамицин) варьировал в пределах от 83,7±2,82 до 95,3±1,62%. Устойчивость среди фекальных культур энтерококков к аминогликозидам не обнаружена, в то время как среди штаммов, выделенных из клинического материала, 14,0±2,65% изолятов были резистентны к стрептомицину, 4,7±1,62% – к гентамицину.

В результате исследования антибиотикорезистентности штаммов энтерококков, выделенных из клинического материала, у 79,1±3,10% культур обнаружена полирезистентность. Процент полирезистентных штаммов среди фекальных изолятов был значительно меньшим – 48,1±3,93% ($P < 0,001$).



Примечание: * – достоверность различий частоты встречаемости резистентности к АБП в популяции клинических и фекальных изолятов энтерококков ($P < 0,05$); ** – ($P < 0,01$); *** – ($P < 0,001$).

Рис. 1 – Чувствительность энтерококков к антибактериальным препаратам

Таким образом, прослеживается следующая общая закономерность: в популяции фекальных изолятов энтерококков, выделенных от животных, обнаружен более низкий процент резистентных штаммов к различным антимикробным препаратам, чем среди клинических изолятов *Enterococcus spp.* Исключение составили фторхинолоны: на фенотипическом уровне процент чувствительных к норфлоксацину и ципрофлоксацину культур был недостоверно больше среди клинических изолятов.

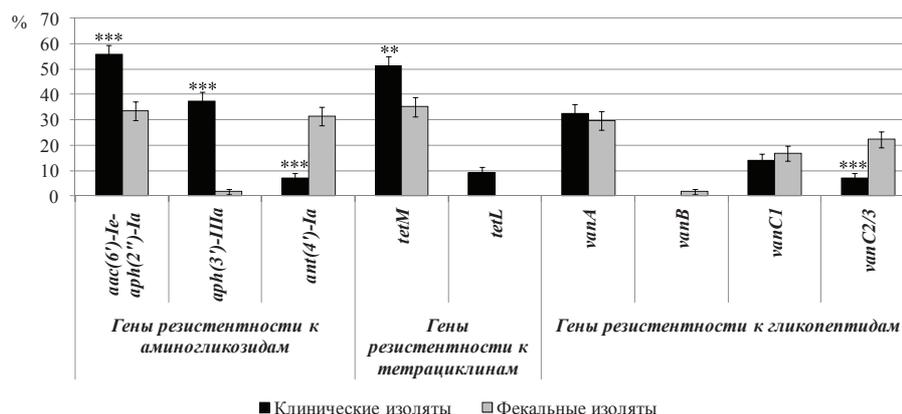
Поскольку известно, что на фенотипическом уровне не всегда проявляется информация, закодированная в геноме, представлялось интересным изучить распространённость среди культур энтерококков генов, кодирующих антибиотико-резистентность, и сравнить полученные данные с фенотипическим профилем изолятов. При исследовании штаммов энтерококков на наличие генов резистентности к аминогликозидам генетическая детерминанта *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, кодирующая

высокий уровень резистентности к гентамицину, была выявлена у $33,4 \pm 3,70\%$ фекальных культур и $55,8 \pm 3,78\%$ штаммов, изолированных из клинического материала ($P < 0,001$).

Данный ген в популяции фекальных энтерококков был обнаружен у культур *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* и *E. faecalis*, в то время как среди клинических изолятов ген *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* содержали только штаммы *E. faecalis*.

Ген *aph(3')-IIIa*, обуславливающий резистентность к аминогликозидам (кроме гентамицина), достоверно чаще регистрировался в геноме клинических изолятов *E. faecalis*, *E. avium*, *E. casseliflavus* чем фекальных *E. flavescens* ($37,2 \pm 3,68$ и $1,8 \pm 1,04\%$ соответственно ($P < 0,001$)).

Напротив, генетическая детерминанта *ant(4')-Ia*, кодирующая резистентность к аминогликозидам (кроме гентамицина), чаще была обнаружена в популяции энтерококков, выделенных из кишечника здоровых животных ($31,5 \pm 3,64\%$), чем среди клинических изолятов ($7,0 \pm 1,95\%$ ($P < 0,001$)) (рис. 2).



Примечание: ** – достоверность различий частоты встречаемости генов антибиотикорезистентности в популяции клинических и фекальных изолятов энтерококков – ($P < 0,01$); *** – ($P < 0,001$)

Рис. 2 – Распространённость генетических детерминант резистентности к антибактериальным препаратам в популяции *Enterococcus spp.*, %

Резистентность к тетрациклину и миноциклину (*tetM*) на генетическом уровне обнаружена у $51,2 \pm 3,81\%$ клинических изолятов энтерококков и у $35,1 \pm 3,74\%$ культур, выделенных из кишечного биотопа здоровых животных ($P < 0,01$). У фекальных культур *Enterococcus spp.* выявлен только ген *tetM*, тогда как у штаммов энтерококков, изолированных от животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, наряду с данным геном зарегистрирован ген *tetL* в $9,3 \pm 2,21\%$ случаев.

При исследовании клинических изолятов энтерококков на наличие генов резистентности к гликопептидам ген *vanA* обнаружен у $32,6 \pm 3,58\%$ культур. Частота встречаемости данного гена у фекальных культур энтерококков составила $29,6 \pm 3,58\%$. Штаммов, содержащих генетическую детерминанту резистентности к различным концентрациям ванкомицина (*vanB*), среди энтерококков, выделенных из клинического материала, выявлено не было. Фекальные изоляты *Enterococcus spp.* содержали ген *vanB* в $1,8 \pm 1,04\%$ случаев. Генами резистентности к низким концентрациям ванкомицина – *vanC-1* и *vanC-2/3* обладали $14,0 \pm 2,65$ и $7,0 \pm 1,95\%$ клинических изолятов и $16,7 \pm 2,93$ и $22,2 \pm 3,26\%$ ($P < 0,001$) фекальных культур *Enterococcus spp.* соответственно.

Корреляционный анализ антибиотикорезистентности клинических и фекальных культур энтерококков к тетрациклину на уровне фенотипа выявил достоверную высокую положительную связь между наличием генов резистентности и фенотипическим проявлением признака ($P < 0,001$). У исследуемых штаммов энтерококков, изолированных из кишечного биотопа, обнаружена обратная взаимосвязь ($r = -0,625$; $P < 0,001$) между наличием в геноме генетических детерминант резистентности к аминогликозидам и гликопептидам и фенотипическим проявлением признака. Последнее обстоятельство может быть связано с тем, что данные препараты в настоящее время редко используются для лечения инфекционных заболеваний животных, в связи с этим не возникает

селективного давления антибиотика, способствующего фенотипическому проявлению признака.

Выводы. В Оренбургской области для лечения животных с энтерококковыми инфекциями обосновано использование ампициллина, являющегося препаратом выбора. Из других антибиотиков, потенциально эффективных при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний, вызванных энтерококками, можно рассматривать гентамицин и стрептомицин. Целесообразность применения фторхинолонов в качестве резервной терапии является сомнительной в связи с относительно высоким уровнем резистентности энтерококков к данной группе антимикробных лекарственных средств.

Учитывая, что распространённость микроорганизмов *Enterococcus spp.* с повышенной резистентностью к тем или иным антибактериальным препаратам в разных регионах может быть различной и изменяться во времени, целесообразно составление и динамическое пополнение баз данных на региональных уровнях.

Литература

1. Пошвина Д.В., Щепитова Н.Е., Сычёва М.В. и др. Видовая характеристика и факторы персистенции энтерококков, выделенных от животных в норме и при патологии // Ветеринария. 2015. № 6. С. 26–30.
2. Miller W.R., Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci // Expert. Rev. Anti Infect. Ther. 2014. Vol. 12. No. 10. P. 1221–1236.
3. Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci // Journal of Clinical Microbiology. 2004. Vol. 42. No. 8. P. 3558–3565.
4. Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»: (утв. гл. гос. санитар. врачом РФ 04.03.2004; введ. 04.03.2004). М.: Минздрав России, 2005. 62 с.
5. Yakulenko S., Donabedian S.M., Voskresenskiy A.M. et al. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci // Antimicrob. Agents and Chemother. 2003. Vol. 47. No. 4. P. 1423–1426.
6. De Leener E., Martel A., Decostere A. et al. 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. No. 10. P. 341–345.
7. 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. Vol. 33. No. 1. P. 24–27.
8. Ашмарин И.П., Воробьёв А.А. Статистические методы в микробиологии. Л.: Гос. изд. мед. лит., 1962. 177 с.