

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**факультет медико-фармацевтичних технологій
кафедра клінічної лабораторної діагностики, мікробіології та
біологічної хімії**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «ЛАБОРАТОРНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПАТОГЕННОГО
ПОТЕНЦІАЛУ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ *ENTEROCOCCUS*»**

Виконала: здобувачка вищої освіти групи ЛДм23(1.6д)-01
спеціальності 224 «Технології медичної діагностики та
лікування» освітньої програми Лабораторна діагностика
Дарина ТЕСЛЕНКО

Керівник: доцент закладу вищої освіти кафедри
клінічної лабораторної діагностики, мікробіології та
біологічної хімії, кандидат біологічних наук,
доцент Ірина ТІЩЕНКО

Рецензент: професор закладу вищої освіти кафедри
фізичної реабілітації і здоров'я, доктор медичних наук,
професор Надія КОНОНЕНКО

Харків – 2025 рік

АНОТАЦІЯ

Проведено патофено- та патогенотипування клінічних штамів ентерококів, вилучених від хворих на гнійно-запальні інфекції. Встановлена наявність у клінічних штамів *E. faecalis* генів *gelE*, *asa1*, *esp* та *cylA*, у *E. faecium* – *gelE*, *esp*, *cylA* і *hyl*. Доведено в експерименті на здорових та імунокомпрометованих тваринах роль *E. faecium* у розвитку гнійно-запальних процесів. Удосконалено алгоритм лабораторної діагностики ентерококових інфекцій.

Кваліфікаційна робота: вступ, 3 розділи, висновки, список використаних джерел, додатки; загальний обсяг – 68 сторінок, 8 таблиць, 13 рисунків, 93 використаних джерела літератури.

Ключові слова: ентерококи, фактори патогенності, клінічні штами, гнійно-запальні процеси, генотипування, фенотипування.

ABSTRACT

Pathopheno- and pathogenotyping of clinical strains of enterococci isolated from patients with purulent-inflammatory infections was carried out. The presence of the genes *gelE*, *asa1*, *esp* and *cylA* in clinical strains of *E. faecalis* was established, and in *E. faecium* – *gelE*, *esp*, *cylA* and *hyl*. The role of *E. faecium* in the development of purulent-inflammatory processes was proven in an experiment on healthy and immunocompromised animals. The algorithm for laboratory diagnostics of enterococcal infections was improved.

Qualification work: introduction, 3 chapters, conclusions, list of used references, appendices; total volume – 68 pages, 8 tables, 13 figures, 93 used references.

Key words: enterococci, pathogenicity factors, clinical strains, purulent-inflammatory processes, genotyping, phenotyping.

ЗМІСТ	с.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Бактерії роду <i>Enterococcus</i> : загальна характеристика та біологічні особливості.....	12
1.2. Фактори патогенності ентерококів.....	12
1.3. Оцінки ролі ентерококів в патогенезі ентерококових інфекцій.....	19
1.4. Патогенний потенціал і генетичні особливості окремих представників роду <i>Enterococcus</i>	20
Висновки до розділу 1.....	25
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	27
2.1. Матеріали та об'єкти дослідження.....	27
2.2. Мікробіологічні методи.....	28
2.3. Молекулярно-генетичні методи.....	31
2.4. Статистична обробка результатів досліджень.....	34
Висновки до розділу 2.....	35
РОЗДІЛ 3 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	37
3.1. Вивчення видової ідентифікації мікроорганізмів роду <i>Enterococcus</i> різного походження.....	37
3.2. Патифенотипування мікроорганізмів роду <i>Enterococcus</i> , виділених з різних екоотопів.....	38
3.2.1. Адгезивна активність ентерококів.....	39
3.2.2. Желатиназна та казеїназна активність ентерококів.....	42
3.2.3. Фібринолітична активність ентерококів.....	44
3.2.4. Антилізоцимна активність ентерококів.....	46
3.2.5. Гемолітична активність ентерококів.....	49
3.2.6. Визначення біопротилей мікроорганізмів роду <i>Enterococcus</i> різного походження.....	50
3.3. Алгоритм лабораторної діагностики ентерококових інфекцій.....	54
3.4. Результати патифенотипування мікроорганізмів роду	59

<i>Enterococcus</i> різного походження.....	
3.4.1. Результати ПЛР-детекції генів патогеності у ентерококів, виділених від хворих на нейрохірургічну патологію.....	59
3.4.2. Результати ПЛР-детекції генів патогеності у ентерококів, виділених від хворих на ГКІ.....	61
Висновки до розділу 3.....	62
ВИСНОВКИ.....	67
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	69
ДОДАТКИ.....	79

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

АДГ – адгезивна активність

АКА – антикомплементарна активність

АЛА – антилізоцимна активність

БФ – багатство фенотипів

ГЕМ – гемолітична активність

ГКІ – гостра кишкова інфекція

ГП – гени патогенності

ГПМК – гостре порушення мозкового кровообігу

ЖЕЛ – желатиназна активність

ІАМ – індекс адгезивності мікроорганізмів

ІСВШ – інфекції сечовивідних шляхів

КА – кров'яний агар

КАЗ – казеїназна активність

КУО – колонієутворюючі одиниці

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

П.н. – пар нуклеотидів

СПА – середній показник адгезії

ФІБ – фібринолітична активність

ФП – фактори патогенності

ARE – ампіцилінрезистентні ентерококи

AS – агрегуюча субстанція

ATCC – American Type Culture Collection

HLAR – штами резистентності до високих рівнів аміноглікозидів

HLG-R – штами резистентності до високих рівнів гентаміцина

MDR - мультиантибіотикорезистентність

VRE – Vancomycin Resistance Enterococci

VSE – Vancomycin Sensitive Enterococci

ВСТУП

Актуальність. В сучасний час в розвинених країнах світу відбуваються зміни в етіологічній структурі внутрішньоклітинних інфекцій і гнійно-септичних інфекцій на користь грампозитивної мікрофлори, що підтверджено багатьма дослідженнями [1–3]. Встановлено, що ентерококи є найбільш частою причиною внутрішньолікарняних інфекцій після стафілококів [3, 4]. Однак слід зазначити, що дані про роль ентерококів в патогенезі інфекційних захворювань досить обмежені і іноді суперечливі. Ентерококи до недавнього часу не привертали серйозної уваги клінічних мікробіологів і клініцистів, оскільки вони є представниками нормофлори. *Enterococcus faecalis*, який найчастіше зустрічається у людей, виявляється в калі більш ніж у 90 % здорових людей. Близько 50 % новонароджених у віці до 1 року. Він був колонізований *E. faecalis*, а колонізація *Enterococcus faecium* зустрічається рідше [4]. Ці мікроорганізми добре пристосовані до освоєння біотопів людини, вони колонізуються в природних нішах (кишечник, піхву), і рівень популяції в товстій кишці людини зазвичай становить 10^6 - 10^8 живих клітин на 1 грам калу.

Ентерококи займають третє місце серед збудників інфекційного ендокардиту (ІЕ) і є причиною 5-17 % всіх його випадків [5–10]. В Європейських країнах частина ентерококів у розвитку ІЕ досягає від 8,4 до 21,7 % [6]. Етіологічна роль ентерококів підтверджується результатами експериментального моделювання інфекційного ендокардиту [7, 8]. Поширенню інфекційного ендокардиту сприяє по-перше, збільшення числа хірургічних втручань на серці, а як відомо, ентерококи вражають природні і штучні клапани серця, на відміну від стрептококів, які пошкоджують тільки здорові клапани, а по-друге, широке застосування інвазивних інструментальних методик, при яких інвазивна техніка вводиться в серце і кровоносні судини [5]. Багато вчених визначають високу смертність від ентерококового ендокардиту, яка досягає від 15 до 34,8 % [11–13].

Серед грампозитивної флори, виділеної при бактеріємії, ентерококи становлять понад третини всіх випадків, а відділення інтенсивної терапії та реанімації - до 51 % [7, 12]. Є повідомлення про незначну роль ентерококів, питома вага яких у розвитку бактеріємії становить лише 3,7 % [14]. Слід зазначити, що смертність від ентерококової бактеріємії висока і досягає 20-46 % [3], а за іншими даними - до 73 % [15].

Роль ентерококів у патогенезі інфекцій сечовивідних шляхів є загальноновизнаною, і їх частка серед усіх бактеріальних інфекцій сечовидільних шляхів становить до 10 % [16–22]. При внутрішньолікарняних інфекціях такої локалізації частота зараження ентерококами зростає до 15-20 % [5]. Інвазивні інструментальні маніпуляції з сечовим міхуром та постійні уретральні катетери сприяють розвитку інфекцій [3, 5].

В етіологічній структурі ран та внутрішньочеревних інфекцій частка ентерококів становить 10-50 % [23-24]. Доведено, що присутність ентерококів серед збудників внутрішньочеревних інфекцій значно підвищує ризик невдачі лікування і супроводжується більшою смертністю, ніж процеси, викликані іншими мікроорганізмами [25]. Етіологічна роль внутрішньочеревних інфекцій, спричинених ентерококами, була продемонстрована за допомогою експериментального моделювання [26].

Гострі гнійно-запальні процеси шкіри і м'яких тканин є частим супутником цукрового діабету, що значно ускладнює перебіг захворювання і створює загрозу генералізації інфекції з розширенням зони гнійно-некротичного процесу. Існують припущення, які свідчать про те, що ентерокок проявляє стимулюючу дію запалення тільки на початковій стадії розвитку ранової інфекції і не впливає на подальший перебіг процесу. Згідно з літературними даними, ентерококи частіше виділяють при хронічних виразках стопи, які тривалий час не гояться. Однак оцінка їх клінічної значущості викликає певні труднощі [27].

Ентерококи значно рідше виділяються при інфекціях дихальних шляхів і ЛОР-органів, захворюваннях очей, тканин пародонту, кісткової

системи, при нейрохірургічних інфекціях і т.ін. [27]. За інформацією Ntziora F. et al., крім того, ентерокок був причиною у 15,4 % випадків у пацієнтів з нейрохірургічною патологією (НХП) [28]. Деякі вчені, які проаналізували випадки НХП, виявили, що в більшості випадків мікроби ентерококу викликають госпітальний менінгіт, це відбувається після нейрохірургічного втручання при гострих порушеннях мозкового кровообігу у 55 % пацієнтів, при пухлинах головного мозку — у 25 %, черепно-мозкових травмах — у 15 % і гідроцефалії — у 5 %; з них майже половина пацієнтів отримували антибіотики в передопераційному та післяопераційному періодах [29].

Згідно з літературними даними, безпосереднім джерелом ентерокової інфекції є особиста мікрофлора, яка, як відомо, переміщується з місця природного проживання в інші біотопи організму (ендогенні захворювання, що передаються статевим шляхом) [30]. В сучасних умовах роль ендогенної інфекції на тлі зниження імунореактивності у значного числа популяцій значно зростає. Однак, результати епідеміологічних досліджень внутрішньолікарняних інфекцій вказують на можливість передачі ентерококів між пацієнтами, а також між персоналом та пацієнтами через медичне обладнання (екзогенна інфекція) [4, 5].

Існує думка, що наявність комплексу патогенних факторів у ентерококів забезпечує можливість їх транслокації з місця природного проживання в інші органи та тканини з подальшим виникненням запальних процесів і їх підтриманням його протягом тривалого часу [25–26]. Відомо, що біологічне різноманіття є однією з основних особливостей популяції умовно-патогенних мікроорганізмів, а їх життєвий цикл пов'язаний з міграційними процесами і періодичною зміною екологічних ніш [27]. Однак питання про те, чи спричиняє розвиток ентерококів у колонізованих екотопах модифікацію фенотипових характеристик та як певні умови навколишнього середовища впливають на їх формування, залишається незрозумілим.

Перед дослідниками постає одне із складних завдань, це оцінка етіологічної значущості ентерококів, виділених з клінічних матеріалів. До

недавнього часу вирішальне значення в діагностиці неспецифічних інфекцій при визначенні етіологічної значущості було пов'язано з кількістю мікроорганізмів, виділених з клінічних матеріалів.

На відміну від даних зарубіжних дослідників, *E. faecalis* і *E. faecium* за винятком повідомлень вітчизняних вчених про клінічне значення різних видів ентерококів виявлено не було. Все вищевикладене пояснює необхідність розширення вимог до лабораторної діагностики мікроорганізмів роду *Enterococcus* і розробки нових методичних рекомендацій щодо їх виділення та ідентифікації.

В даний час серед методів діагностики опортуністичних інфекцій запропоновано використання виявлення генетичних маркерів, пов'язаних з патогенністю. Незважаючи на значну кількість публікацій, присвячених етіологічній ролі ентерококів, потенціал цих мікроорганізмів вивчений недостатньо.

Мета дослідження: вивчення патогенного потенціалу мікроорганізмів роду *Enterococcus* за допомогою сучасних лабораторних методів дослідження.

Завдання дослідження:

1. Дослідити видову ідентифікацію мікроорганізмів роду *Enterococcus* різного походження.
2. Провести патофенотипування мікроорганізмів роду *Enterococcus*, виділених з різних екотопів.
3. Вивчити патогенні властивості мікроорганізмів роду *Enterococcus*.
4. Проаналізувати результати патогенотипування мікроорганізмів роду *Enterococcus* різного походження, отриманих за шляхом ПЛР-детекції генів патогеності.
5. Сформулювати алгоритм лабораторної діагностики ентерококових інфекцій.

Об'єкт дослідження: бактерії роду *Enterococcus*, лабораторна діагностика їх патогенного потенціалу.

Предмет дослідження: патогенний потенціал мікроорганізмів роду *Enterococcus* різного походження.

Методи дослідження: біологічні, мікробіологічні, генетичні, гістологічні, статистичні.

Практичне значення отриманих результатів: удосконалення діагностики ентерококових інфекцій на основі комплексного вивчення на фенотиповому та генетичному рівні факторів патогенності мікроорганізмів роду *Enterococcus*. Отримані результати можливо використати з метою оптимізації діагностики та лікування ентерококових інфекцій.

Апробація результатів дослідження і публікації.

Основні наукові положення магістерської роботи доповідались та обговорювались на II Науково-практичній дистанційній конференції «Сучасна антимікробна терапія: проблеми та шляхи вдосконалення» (22 листопада 2024 року, м. Харків); на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «YOUTH PHARMACY SCIENCE» (10–11 грудня 2024 рік, м. Харків).

Публікації:

1. Pathogenic potential of *Enterococci* / Tishchenko I.Yu., Peretyatko O.H., Filimonova N.I., Dubinina N.V., Teslenko D.O. // Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція: матеріали VII науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю, м. Харків, 14 листопада 2024 р. Х.: НФаУ, 2024. – с. 80-82.
2. Virulence factors and antibiotic resistance of representatives of the genus *Enterococcus* / Teslenko D., Tishchenko I., Filimonova N., Dubinina N., Peretyatko O. // Сучасна антимікробна терапія: проблеми та шляхи вдосконалення: матеріали II Науково-практичній дистанційній конференції, 22 листопада 2024 року, Харків (м. Харків, 22 листопада 2024 р., м. Харків) / – Х.: НФаУ, 2024. – с. 66-68.

3. Teslenko D.O. Study of pathogenicity of microorganisms of the genus *Enterococcus*// Youth Pharmacy Science: матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (10-11 грудня 2024 р., м. Харків). – Харків: НФаУ, 2024. – с. 330-331.

Структура роботи. Робота викладена на 68 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 13 рисунками та 8 таблицями; складається зі вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел, що включає роботи 14 вітчизняних та 79 закордонних авторів.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Бактерії роду *Enterococcus*: загальна характеристика та біологічні

Ентерококи (*Enterococcus*) — рід грампозитивних коків підкласу лактобактерій. Часто представлені парами (диплококів) або короткими ланцюжками, які складно відрізнити від стрептококів за фізіологічними характеристиками. Два види є основними симбіотичними організмами кишечника людини: *E. faecalis* (90-95%) і *Enterococcus faecium* (5-10%). Іноді утворюють кластери з іншими видами, включаючи *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*.

Факультативні анаероби, здатні здійснювати клітинне дихання як у безкисневому, так і насиченому киснем середовищі. Спори не утворюють, проте стійкі в широкому діапазоні умов. Ростуть при температурі 10 — 45°C, рН 4,5 — 10,0, а також при високих концентраціях хлориду натрію. Породжують типовий гамма-гемоліз кров'яного агару.

Аж до 1984 року бактерії роду *Enterococcus* класифікувалися як стрептококи групи Д, поки методом геномного аналізу ДНК не було показано, що більш правильно виділення їх в окремий рід.

1.2. Фактори патогенності ентерококів

Хоча ентерококи є частиною нормальної кишкової мікрофлори людини та тварин, відіграють важливу роль в процесах колонізаційної резистентності слизових оболонок, вони також є представниками групи умовно-патогенних бактерій, що здатні викликати аутоінфекцію, а при накопиченні у навколишньому середовищі – призводити до екзогенного інфікування.

Enterococcus faecalis – вид ентерококів, що раніше відносився до стрептококів групи D та мав назву *Streptococcus faecalis*, тому часто й досі лабораторії іноді пишуть стару назву ентерококу. З ростом резистентності до антибіотиків він визнаний в світі однією з причин нозокоміальних інфекцій, що важко піддаються лікуванню.

Enterococcus faecalis – факультативний анаероб, що вирізняється стійкістю та можливістю рости й розвиватися на різноманітних середовищах. До того ж цей мікроорганізм є найбільш розповсюдженим в культуральному відношенні серед людей та найбільш резистентним до ванкоміцину серед ентерококів [1].

Роль ентерококу як екзогенного джерела інфекції визначається тим, що він здатний тривало зберігати життєздатність на об'єктах зовнішнього середовища навіть в присутності антисептичних розчинів.

Ентерококи мають внутрішню невразливість, та можуть набувати стійкість до антибіотиків, що робить їх важливими нозокоміальними патогенами. Існує внутрішня резистентність до бета лактамних антибіотиків внаслідок існування пеніцилін зв'язуючих протеїнів, а також до цефалоспоринів, налідиксової кислоти, азтреонаму, макролідів. Вони мають низький рівень чутливості до кліндаміцину та аміноглікозидів. Використання вже сформованої фолієвої кислоти дозволяє їм обходити систему її інгібіції та набувати резистентності до сульфаметоксазолу та триметоприму [2]. Таким чином, дія багатьох антибіотиків пригнічує, але не знищує ентерококи.

До кінця 80-х років минулого століття ентерококи ще зберігали чутливість до ванкоміцину, але до теперішнього часу вони все частіше заміщуються ванкоміцин резистентними штамми.

Здатність цих мікроорганізмів набувати резистентності суттєво сказала на ефективності лікування хворих. Описані шість фенотипів ванкоміцин резистентності: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, та VanG. Два перших (VanA, VanB) є найбільш клінічно значущими. В США та Європі розповсюдженими є VanA, VanB та VanC фенотипи ентерокока. VanA фенотип відповідає за розвиток високого рівня резистентності до ванкоміцину та тейкопланіну, тоді як VanB групи ентерококів проявляють перемінну чутливість до ванкоміцину та стійку до тейкопланіну. Здавалося б, нові антимікробні засоби, такі як квінуприсин, лінезолід, даптоміцин, що

з'явилися на ринках Європи, мали б покращити цю ситуацію, але вже описані випадки розвитку резистентності і до них [3].

Протягом багатьох років мікроорганізми цієї групи вважали клінічно несуттєвими. Перегляду оцінки патогенетичної ролі ентерококів сприяло виявлення у них факторів вірулентності. Найбільш вивченим серед них є цитотоксин, що також має властивості бактеріоцину. Під час експериментальних досліджень в 1992 році було встановлено, що при інфекціях, викликаних штамами, які виробляють цитотоксин, виражені запальні зміни в тканинах спостерігаються навіть в тих випадках, коли мікроорганізм ефективно пригнічуються антибіотиками [4]. Цитотоксин також має здатність викликати лізис еритроцитів, нейтрофілів. Штами, що виробляють цитотоксин, демонструють високу протеолітичну активність по відношенню до ряду антибіотиків [5].

До найбільш розповсюджених факторів вірулентності ентерококів відносять желатиназу, здатність до продукції поверхневого протеїну та позаклітинного супероксиду, здатність гідролізувати казеїн, колаген, гемоглобін та інші білки [1, 6]. Якщо поділити всі фактори вірулентності на групи, то отримаємо 4 основні: фактори адгезії, до яких відносяться капсула, адгезин *Esp*, адгезин *Asa*, фактор агрегації, адгезин *EfaA*, та рецептор колагену; фактори penetрації, колонізації та ураження тканин: желатиназа, серинова протеїназа, *Fsr*-регулятор, гіалуронідаза, цитолізін; фактори стійкості до антибіотиків та мікробіцидним факторам організму: фактор стійкості до жовчних кислот; а також фактори гемолізу, токсигенності, бактеріогенності: гемолізینی, цитолізینی та бактеріоцини, феромони. Тоді як ентерококів цитолізін вражає еритроцити та деякі інші еукаріотичні типи клітин, бактеріальний феромон є низькомолекулярним пептидом, що сприяє кон'югативній передачі плазмідної ДНК від штаму до штаму. Існує думка, що феромон може діяти як хемоаттрактант для нейтрофілів, підсилюючи запальну відповідь на інфекцію.

Багато з факторів патогенності ентерококів є необхідними компонентами їх функціонування та не пов'язані безпосередньо з ураженням тканин макроорганізму та пригніченням систему імунітету. Наприклад адгезини життєво необхідні для нормальної колонізації в шлунково-кишковому тракті, а гідролаза жовчних кислот підвищує їх шанси на виживання в дванадцятипалій кишці. До теперішнього часу достатньо добре встановлено, що ділянки геному з генами вірулентності є рухливими елементами та можуть передаватися від одного штаму до іншого, а також виявлене їх компактне розташування на геномі вірулентних штамів бактерій. Ці генетичні елементи отримали назву «острівці» патогенності, та можуть містити різний набір генів вірулентності такі як ген резистентності до антибіотиків [7, 8]. Більшість дослідників вважають, що саме ці гени є найбільш важливими для розвитку ентерококового інфекційного процесу. На «острівцях» патогенності розташовані комплекси генів цитолізинів, адгезину, ген поверхнево експресуємої серинової протеїнази, гідролази жовчних кислот, гени стійкості до ванкоміцину та інші.

Захворювання, зазвичай викликані ентерококами, включають: інфекції сечовивідних шляхів, ендокардит, сепсис, катетер-асоційовані інфекції, ранові, тазові, та інфекції черевної порожнини. Багато випадків зараження відбувається внаслідок бактеріальної транслокації кишкової флори пацієнта. Ентерококи можуть розповсюджуватися та призводити до контамінації сечовивідних шляхів, інтраабдомінального інфікування. Бактеріємія є причиною заселення більш віддалених тканин, таких як ендокард. Також в літературі зустрічаються описи випадків ентерококового менінгіту, плевриту, абсцесів печінки. Кишкове носійство резистентних штамів ентерококів зустрічається частіше ніж клінічні прояви цієї інфекції. Носії ентерококів є потенційно небезпечними як вогнище зараження працівників охорони здоров'я, навколишнього середовища в лікарнях та інших пацієнтів. Ентерококи мають здатність виживати тривалий час на предметах побуту, що сприяє їх передачі та збереженню.

Виявлені фактори ризику інфікування штамами, резистентними до ванкоміцину. Власне використання ванкоміцину має значення для інфікування, а також третє покоління цефалоспоринів, аміноглікозидів, азтреонам, ципрофлоксацин, імipенем, кліндаміцин, метронідазол при їх тривалому використанні, підвищують ризик колонізації. Має велике значення тривалість експозиції мікробного агенту внаслідок безпосередньої близькості носіїв до інших пацієнтів в умовах лікувального закладу.

До осіб підвищеного ризику відносять пацієнтів в критичному стані, реципієнтів для трансплантації, онкологічних хворих, осіб з сечовими катетерами, тих, що знаходяться на парентеральному вигодовуванні, отримують терапію кортикостероїдами, медичних працівників [9-11]. Нещодавно була проведена оцінка значення ентерококів як збудників післяопераційних інфекційних ускладнень при проведенні аортокоронарного шунтування, реконструктивних операцій на серці та трансплантації нирок. Бактерії ізолювали з крові, операційного матеріалу, сечі, ран, плевральної рідини, внутрішньосудинних катетерів. Ентерококи зустрічались при запаленнях у пацієнтів відділень трансплантації нирок в 39,8 % випадків, наступними по значенню кількості висіяного матеріалу були хворі реанімаційного відділення – 34,6 %, серцево-судинної хірургії, - 20,4 %, та матеріал з операційного блоку – 4,2 %. Найбільшу кількість цих мікроорганізмів вміщувала сеча – 47,7 % та матеріал з трахеї – 24,3 %. Відмічений високий ступінь резистентності ентерококів до антибіотиків [12]. Ентерококові інфекції частіше виникають у осіб похилого віку, що пов'язано з особливостями імунної відповіді, частотою проведення хірургічних втручань та наступною терапією антибіотиками. Існують данні, що ентерококовий ендокардит частіше розвивається у літніх людей. У новонароджених, ці бактерії часто стають причиною розвитку менінгіту та сепсису, хоча в цілому, вони менш розповсюджені ніж у дорослих [13]. Інфекції сечової системи, спричинені ентерококами, є найбільш розповсюдженим типом інфекції та часто пов'язані з катетеризацією

сечового міхура. Нерідко виявляється цистит та пієлонефрит, іноді можуть розвиватися простатит та перинефральні абсцеси.

Джерелом ентерококового сепсису частіше за все є сечовивідні шляхи, інтраабдомінальні вогнища, рани, внутрішньосудинні катетери, особливо при катетеризації судин стегна. Ентерококи, ізольовані при бактеріємії, склали 38,5% грампозитивної мікрофлори, та за етіологічною значущістю ще в 2006 році зайняли друге місце після коагулазонегативних стафілококів. Позалікарняна бактеріємія асоціюється з ендокардитом в 36 % випадків. Внутрішньолікарняна бактеріємія може виникнути з різноманітних джерел. Наявність полімікробної флори завжди підозріла на внутрішньочеревне вогнище. Культура крові також може бути позитивною на ентерокок при неправильній обробці місця забору матеріалу, через забруднення шкіри цією бактерією [14].

Ентерококи є причиною ендокардиту від 5 до 15 % випадків. Найчастіше він розвивається у людей літнього віку та перебігає підгостро, в більшості випадків є одnobічним, з ураженням лівого серця та частіше саме аортального клапану [15, 16].

Інфекції черевної порожнини та органів тазу, викликані ентерококом, включають запалення жовчних шляхів, інтраабдомінальні абсцеси, перитоніт, ендометрит, сальпінгіт [17].

Ентерококовий менінгіт зустрічається доволі рідко і пов'язаний з нейрохірургічними втручаннями. Можуть мати місце інфекції дихальних шляхів, казуїстичним є розвиток остеомієліту.

Значна кількість штамів ентерококів виділена з відділяемого трахеї пацієнтів, що знаходяться на штучній вентиляції легень – 24,3 % всього пулу ентерококів, проте вони висіваються лише в 1,7 % випадків інфекцій дихальних шляхів [18].

В 2002 році ентерококи були названі внутрішньолікарняним патогеном дев'яностих років минулого століття [19]. Їх множинна резистентність до антибіотиків підсилює роль цих бактерій як нозокоміального збудника.

Після інформації, наведеної вище, у клініцистів може скластися відповідне негативне відношення до ентерококів. Хоча їх роль у виникненні інфекційних процесів є суттєвою, не слід забувати, що ентерококи різних видів є природною флорою нашого організму, вони одні з перших колонізують кишечник новонароджених, а система вродженого імунітету не реагує на них як на чужорідний агент. За нормальних умов кишечник має містити від 10^7 до 10^8 ентерококів. Завдяки унікальній, навіть для бактерій, життєздатності (стійкість до низьких значень кислотності, до жовчних кислот, до широкого температурного діапазону) ентерококи населяють практично всі відділи кишечника [20]. Ентерококи, як природна мікрофлора, приймають саму активну участь у метаболічних процесах: синтезі вітамінів, гідролізі простих вуглеводів (лактози), декон'югації жовчних кислот, елімінації патогенних бактерій. Кількісний вміст ентерококів знаходиться у суворій відповідності до рівня вмісту інших бактерій, таких як кишкова паличка, лактобактерії, біфідобактерії [21]. Ентерококи є ефективними імуностимуляторами, що здатні підтримувати адекватний для нормальної роботи вродженого імунітету рівень цитокінів.

Основна причина антагоністичної активності ентерококів – їх здатність виробляти короткі пептиди – ентероцини. Ці пептиди, здатні при контакті з бактерією викликати ураження клітинної стінки з наступною загибеллю клітини [21].

Таким чином, є зрозумілим, що роль ентерококу в житті та забезпеченні здоров'я людини не є однозначною. Ці бактерії широко розповсюджені в природі, є представниками нормальної мікрофлори людини та тварин, можуть в нормі зустрічатися в харчових продуктах, воді, рослинах. В той же час, деякі штами мікроорганізмів, набуваючи ряд ознак патогенності, можуть викликати інфекційні захворювання. Важливе значення для диференціювання патогенних та непатогенних ентерококів має лабораторне визначення генів, контролюючих синтез відомих факторів патогенності.

Слід наголосити, що ентерококи не часто є причиною інфікування у здорових осіб. Тільки при значному зниженні резистентності макроорганізму, особливо при травмах кишечника або сечостатевого тракту в результаті інструментальних досліджень, вони можуть проникати в стерильні за нормальних умов порожнини, органи та тканини з наступним запаленням.

1.3. Оцінки ролі ентерококів в патогенезі ентерококових інфекцій

Рід *Enterococcus* відноситься до сімейства *Enterococcaceae* і включає 34 види. Ентерококи – овальні коки розміром 0,6 x 2,5 мкм, деякі штами морфологічно подібні до пневмококів. Спор не утворюють, в основному нерухомі, розщеплюють вуглеводи до кислоти без газу. Виділення ентерококів проводиться з використанням кров'яного агару, простих поживних середовищ, селективного ентерококагару. Виділені культури диференціюють з гемолітичними і зеленявими стрептококами.

В останні роки вивчення ентерококів як біологічних об'єктів і оцінка їх ролі в фізіології і патології людини проводиться з урахуванням їх зростаючої участі у виникненні інфекційних захворювань. Патогенні властивості ентерококів визначаються декількома механізмами і пов'язані, в першу чергу, з факторами стійкості до ефекторів імунітету. Для ентерококів характерна природна здатність набувати, акумулювати і трансформувати екстра хромосомні елементи, які кодують вірулентність, що дають перевагу у виживанні при зміні зовнішніх умов, стресових і несприятливих станах, що обумовлює їх важливість як нозокоміальних патогенів. Ентерококи є одними з найбільш поширених учасників розвитку анаеробно-аеробних мікст-інфекцій. Як факультативні анаероби, вони здатні ефективно стимулювати зростання облігатно-анаеробних патогенів, посилюючи їх вірулентний потенціал. Відомо, що 80-90 % ентерококових інфекцій людини викликає *E. faecalis* і 10-15% *E. faecium*. Ентерококи характеризуються природною стійкістю до багатьох АБП (напівсинтетичні пеніциліни, цефалоспорини, карбапенеми, поліміксини, лінкозаміди, низькі концентрації аміноглікозидів),

а клінічне значення чутливості, яка спостерігалась *in vitro* до тетрацикліну, хлорамфеніколу, макролідів і рифампіцину, остаточно не визначено, тому перелік препаратів, що підлягають включенню до дослідження ентерококів, вельми обмежений. В останні десятиліття однією з актуальних проблем клінічної мікробіології є штами ентерококів, резистентні до глікопептидів.

Натепер відомі 6 фенотипів ентерококів, стійких до ванкоміцину (від VanA до VanG). Фенотипи VanA і VanB найбільш широко поширені переважно серед *E. faecium*, але зустрічаються і серед *E. faecalis*. Штами з фенотипом VanC відносяться до видів *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens* і мають низьку стійкість до ванкоміцину, але повністю зберігають чутливість до тейкопланіну. Фенотипи D, E, G описані у поодиноких штамів. Особливу небезпеку становлять мультирезистентні штами *E. faecium* і *E. faecalis*.

Дані літератури вказують на неоднозначну роль ентерококів. Вони широко поширені в природі, є представниками нормальної мікрофлори людини, мешкають в кишечнику, сечостатевому тракті, можуть колонізувати слизові оболонки порожнини рота і шкіру, особливо в умовах стаціонарів. У той же час вони є представниками групи умовно-патогенних бактерій, здатних викликати аутоінфекції, а при накопиченні в навколишньому середовищі – приводити до екзогенного інфікування. Однак, хоча роль представників роду *Enterococcus* в патогенезі гнійно-запальних захворювань людини не піддається сумніву, вона залишається недостатньо вивченою.

1.4. Патогенний потенціал і генетичні особливості окремих представників роду *Enterococcus*

Патогенність як інтегральна характеристика збудників інфекцій є полідетермінантною властивістю мікроорганізмів, що відображує їх здатність формувати ендogenous джерела інфекцій, колонізувати органи і тканини і ініціювати в них патологічний процес. Ця здатність визначається не одним, а комплексом фенотипових характеристик, інакше їх біопротілем. Для багатьох мікробів, наприклад, для *E. coli*, високою діагностичною інформативністю відрізняються ознаки, що характеризують персистенцію їх

(АЛА, АІФ, АКА) і відповідальні за виживання бактерій у присутності ефекторів імунітету макроорганізму.

Суттєві якісні і кількісні зміни в структурі інфекційної патології в значній мірі пов'язані зі зміною патогенності бактерій на генетичному рівні. В теперішній час найбільше значення надається структурним і регуляторним генам, що детермінують патогенність бактерій і згруповані в мобільні кластери – «острови патогенності», у складі яких знаходяться гени, що детермінують ключові етапи взаємодії з макроорганізмом. Деякі вчені вважають, що зміни патогенності, які відбуваються за даним механізмом, призводять до формування патогенних варіантів умовно-патогенних мікроорганізмів. Встановлено мобільний характер цих генетичних елементів і можливість до горизонтального та вертикального переносу іншим штамам, що здебільше диктує характер і напрямок відбору у процесах адаптивної еволюції бактерій.

Перегляду оцінки ролі ентерококів в патогенезі ентерококових інфекцій сприяло виявлення у них факторів патогенності. Проте це питання є не до кінця вивченим. Основним аргументом на користь їх патогенетичної ролі є висока частота виявлення факторів патогенності у штамів, виділених при інфекційних процесах, і практично повна відсутність у штамів, виділених з кишечника здорових осіб і з об'єктів довкілля. У зв'язку зі зростанням етіопатогенетичної значущості *E. faecium* у загальній структурі ентерококових інфекцій, зростає й інтерес дослідників до детального вивчення патогенного потенціалу цього виду ентерококів [38–41].

У складі геному ентерококів виявлені «острови патогенності», асоційовані з фрагментами ДНК, що включає дискретні гени патогенності, які детермінують ключові етапи взаємодії з макроорганізмом, включаючи адгезію, продукцію протеолітичних ферментів, здатність протистояти чинникам неспецифічної резистентності. На «островах патогенності» у ентерококів виявлено комплекс генів цитолізинів *cyl* (*cyl A, B, M*), ген

адгезина *esp*, ген протеази *spr*, гідролази жовчних кислот і безліч генів з невідомою на сьогодні функцією [34-37].

До факторів патогенності, що відповідають за початок інфекційного процесу (за адгезію та колонізацію збудника), відносяться агрегуюча субстанція, поверхневі білки, поверхневі полісахариди [32, 39, 40]. Агрегуюча субстанція (AS), що забезпечує у ході інвазії адгезію ентерококів до різних біологічних структур бар'єрних тканин, складається з групи поверхневих білків, що задовано на феромон-індукуючій плазміді [40, 41]. Деякі вчені вважають, що не всі штами *E. faecium* здатні продукувати AS [42], за даними інших дослідників ген *asa1* виявляється у ентерококів цього виду нечасто [43].

Поверхневий ентерококовий білок (*Enterococcal surface protein*), що кодується геном *esp*, вперше виявлено у *E. faecalis* в 1999 році, двома роками пізніше – у *E. faecium* [44, 45]. Слід підкреслити, що роль *esp* гену в патогенезі ентерококових інфекцій не до кінця з'ясована. Відомо, що *esp* ген обумовлює адгезію та колонізацію ентерококів та дозволяє уникати впливу ефекторів імунологічної відповіді [46].

Дослідження *Vankerckhoven V. et al.* показали, що кількість штамів з *esp* геном вище серед VRE *E. faecium*, ніж VSE штамів цього виду ентерококів (77 % проти 5 % відповідно) [43]. Деякі вчені на підставі високої поширеності *esp* гена серед клінічних штамів в порівнянні з кишковими, припускають можливу роль його в патогенезі ентерококових інфекцій. Хоча адгезини ентерококів потрібні й при колонізації ними місць природного перебування.

До факторів вірулентності відносять також протеолітичні ферменти (желатиназу, казеїназу, колагеназу, еластазу), які сприяють міжклітинному розповсюдженню бактерій в організмі хазяїна. Найбільш вивченим з протеолітичних ферментів ентерококів є желатиназа та серинова протеаза. Протеаза ентерококів є позаклітинною металопротеазою, яка гідролізує желатин, казеїн, гемоглобін та інші біоактивні пептиди та кодується *agr*-

зчепленим ауторегульованим геном, штами, які несуть цей ген, мають високу вірулентність [47, 48].

Відомо, що протеаза ентерококів частіше виявляється у штамів, вилучених з клінічного матеріалу, ніж від здорових осіб [43, 49-51]. Дослідники вважають, що продукція желатинази і серинової протеази є кворум-залежним процесом, який регулює експресію цих факторів патогенності [52-54]. Дослідження останніх років показали, що желатиназа відіграє значну роль у формуванні біоплівки ентерококів виду *faecalis* [49]. Однак роль гену *gelE* *E. faecalis* до кінця не з'ясована, ще менш вивченим залишається *E. faecium* [50].

Цитолізін є найбільш вивченим фактором патогенності ентерококів, деякі вчені вважають його найважливішим з відомих зовнішньоклітинних факторів патогенності. Цитолізін індукує ушкодження тканин, в експерименті на кролях було показано, що одночасна наявність його з ASA призводить до значного підвищення патогенного потенціалу. Відомо, що цитолізін може руйнувати еритроцити людини, барана та коня, поліморфноядерні лейкоцити, епітеліоцити кишечника і клітини сітківки ока людини. Цитолізін з високою частотою виявляється у штамів *E. faecalis*, вилучених при інфекціях різної локалізації [50, 55–56]. За даними деяких авторів гени, що забезпечують продукцію цитолізіну часто виявляються разом з іншими генами патогенності цих бактерій: поверхневими білками, желатиназою, субстанцією агрегації [51, 57].

Аналіз останніх наукових публікацій щодо *hyl* гену показав, що ген вперше описаний як кодує гліалуронідазу, за сучасним уявленням відповідає за синтез гідролази глікозида. Деякі дослідники встановили, що *hyl* ген знаходиться на плазміді розмірами від 145 до 375 Кб з генами резистентності до глікопептидів [58–60]. За даними інших вчених придбання *hylEfm* плазміди призводить до колонізації кишечника і не залежить від детермінанти антибіотикорезистентності [61]. На моделі експериментального перитоніта показано, що придбання *hylEfm* плазміди непатогенним варіантом

ентерококу призвело до підвищення вірулентності штаму [62]. Але питання про роль цього гену у патогенезі ентерококових інфекцій знаходиться у процесі всебічного вивчення.

Таким чином, аналіз наукових публікацій показав, що найбільш вивченими є фактори патогенності *E. faecalis* і менш – у ентерококів інших видів. У *E. faecalis* більш широкий спектр детермінант вірулентності в порівнянні з *E. faecium*. Раніше вважалося, що у останніх знаходяться тільки гени *esp* і *hyl*. Останніми роками з'явилися публікації, автори яких стверджують, що у *E. faecium* визначені гени *asal*, *cyl* і *gelE*. За даними результатів досліджень деяких вчених ген *asal* відсутній у *E. faecium* [49], згідно інших, детекція субстанції агрегації у *E. faecium* спостерігається рідко [55].

Тому важливим напрямком досліджень у цій сфері є вивчення у ентерококів факторів патогенності (ФП) на фенотиповому й генетичному рівні та оцінка впливу ФП на розвиток патологічного процесу. Зміна природної екологічної ніші, потрапляння в значно відмінні умови існування призводить до того, що ентерококи набувають ряд ознак, які надають їм певні переваги для виживання, і деякі з цих ознак додають їм певний ступінь патогенності. Однак, відомості щодо патогенності ентерококів обмежені. Порівняльний аналіз біологічних властивостей та патогенного потенціалу ентерококів, вилучених при патології з різних екологічних ніш, як стерильних (ліквор, кров), так і нестерильних (кишечник, рани, трофічні виразки та ін.), визначення корелятивних зв'язків між окремими факторами патогенності та місцем і ступенем прояву патологічного процесу дозволить визначити найбільш інформативні з них для доказу етіологічної значущості мікроорганізму. Виявлення генів патогенності та фенотипова характеристика фактора патогенності, що експресується, дозволить об'єктивно судити про етіологічну роль виділеного ентерококу.

Висновки до розділу 1

Зважаючи на необхідність оцінки етіопатогенетичної значущості виявленого збудника, методичні підходи, які є на сьогодні до лабораторної діагностики ентерококових захворювань, досить важливі але недосконалі.

Бактерії роду *Enterococcus* є одним із найважливіших представників мікробіоценозу кишечника людини і часто можуть бути причиною ентерокової інфекції. В інших біотопах ці мікроорганізми зустрічаються рідше і, вважають, причиною захворювання бути не можуть або стають надзвичайно рідко. Ця група мікроорганізмів цікава тим, що її представників у нормі виявляють у всіх відділах травного тракту здорових людей різного віку. Вони відіграють важливу роль у забезпеченні колонізаційної резистентності слизових, у формуванні та підтриманні імунітету, у нормальному травленні, у вітаміноутворенні та багатьох інших життєво важливих процесах.

У той же час вони є представниками групи умовно-патогенних бактерій, здатних викликати аутоінфекцію, а при накопиченні у навколишньому середовищі призводити до екзогенного інфікування. Ентерококи видів *E. faecalis* та *E. faecium* найчастіше виділяються з клінічного матеріалу (80–90 % та 5–10 % відповідно) та при зниженні резистентності організму нерідко можуть викликати серйозні гнійно-запальні захворювання.

Роль ентерококів як екзогенного джерела інфекції зумовлена їх здатністю довго зберігати життєздатність на різних об'єктах зовнішнього середовища, навіть за наявності антисептичних засобів. Ці мікроорганізми характеризуються внутрішньою стійкістю та здатні набувати резистентності до антибіотиків, що робить їх важливими нозокоміальними патогенами.

Ентерококи мають резистентність до бета-лактамних антибіотиків, оскільки вони містять пеніцилін-зв'язуючі білки, що знижують ефективність цих ліків. Також спостерігається стійкість до цефалоспоринів, налідиксової

кислоти, азтреонаму та макролідів. Крім того, їх рівень чутливості до кліндаміцину та аміноглікозидів є низьким.

Використання фолієвої кислоти дозволяє ентерококам обходити механізми її інгібіції, що сприяє розвитку резистентності до сульфаметоксазолу та триметоприму. В результаті, дія багатьох антибіотиків на ентерококи призводить до пригнічення, але не до їх повного знищення. Це підкреслює важливість контролю за цими патогенами в медичних установах.

В даний час ентерококи все частіше стають етіологічними агентами інфекцій кровотоку, сечовивідних шляхів, шкіри, м'яких тканин та ін. Найбільш поширеними видами, що викликають захворювання людини, головним чином серед літніх, мультиморбідних пацієнтів та/або пацієнтів з ослабленим імунітетом, є *Enterococcus faecalis* та *E.faecium*. Ентерококи мають здатність швидко адаптуватися до мінливих умов навколишнього середовища. При цьому висока швидкість рекомбінації ДНК допомагає їм формувати стійкість до багатьох антимікробних препаратів, що використовуються в клінічній практиці, та призводить до селекції високовірулентних штамів. Тому знання основних механізмів формування резистентності у клінічно значимих ентерококів допоможе лікарям обрати правильну тактику ведення пацієнтів з інфекціями, асоційованими з *E.faecalis* та *E.faecium*.

E.faecalis і *E.faecium* мають резистентність до багатьох антибактеріальних препаратів з різним механізмом дії. В умовах зростаючого та повсюдного використання протимікробних препаратів ентерококи здатні швидко адаптуватися, формуючи стійкість до даних сполук через складну взаємодію різних механізмів за безліччю еволюційних траєкторій. Розуміння механізмів, завдяки яким ентерококи стають стійкими до антибіотиків, має першорядне значення для розробки нових стратегій, спрямованих на обмеження виникнення та поширення резистентності, що потребує додаткових та різнобічних досліджень.

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали та об'єкти дослідження

Проводились дослідження у лабораторії міської клініки. Ця лабораторія медичної мікробіології відповідає критеріям атестації й атестована на проведення вимірювань у сфері поширення державного метрологічного нагляду згідно з галуззю атестації, про що засвідчує свідоцтво про атестацію лабораторії.

Забір штамів від хворих на невропатологію (НХП) після оперативного втручання, проводився у бактеріологічній лабораторії міської клініки, що має свідоцтво про атестацію лабораторії вказана лабораторія відповідає критеріям атестації й атестована на проведення вимірювань у сфері поширення державного метрологічного нагляду згідно з галуззю, що зазначена в додатку до свідоцтва і є невід'ємною його складовою частиною.

Об'єктом дослідження стали 80 клінічних штамів, серед яких: 20 штамів, отриманих із кишечника 24 пацієнтів із гострою кишковою інфекцією (ГКІ); 35 штамів, виділених із клінічного матеріалу та поверхні трахеостоми у 30 пацієнтів із НХП після оперативного втручання; 35 культур, відібраних у 30 пацієнтів із НХП після хірургічного втручання. Для досліджень використовували біологічний матеріал пацієнтів, зокрема ліквор, сечу, кров, виділення з ран та інші зразки. Окрім цього, було проаналізовано 25 культур, виділених із сечі та уретри пацієнтів із інфекціями сечовивідних шляхів (ІСВШ), які перебували на амбулаторному лікуванні.

Для групи порівняння було використано 22 штами ентерококів, ізольованих із кишечника практично здорових осіб.

У дослідженні використовували референс-штами бактерій: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* var. *lysodeikticus* ATCC 2665, *Escherichia coli* ATCC 25922, які слугували тест-культурами та були отримані з музею мікроорганізмів ДУ "ІМІ ім. І.І. Мечникова НАМН України". Поживні середовища готували відповідно до встановлених вимог.

Контроль якості поживних середовищ здійснювали відповідно до рекомендацій виробників, зазначених у сертифікатах на продукцію, а також згідно з інформаційним листом.

2.2. Мікробіологічні методи

Ідентифікацію та виділення досліджуваних культур мікроорганізмів здійснювали на основі їхніх морфологічних, культуральних, тинкторіальних та біохімічних властивостей із використанням загальноприйнятих методів [73].

Підготовку суспензії мікроорганізмів із заданою концентрацією мікробних клітин виконували за шкалою McFarland відповідно до інформаційного листа, застосовуючи електронний прилад Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія) [74].

Для виявлення ентерококів застосовували мікротест-систему EN-COCCUStest виробництва Pliva-Lachema Diagnostika (Чехія). Ця система дозволяє ідентифікувати штами ентерококів за допомогою восьми біохімічних тестів: сорбоза, аргінін, арабіноза, манітол, сорбітол, рафіноза, мелецітоза та мелібіоза. Для проведення тесту готували мікробну суміш на основі чистої 24-годинної культури, розведеної у фізіологічному розчині до каламутності, що відповідає 2-й ступені за шкалою Макфарланда. Визначення виду мікроорганізмів здійснювали за допомогою "Ідентифікаційної таблиці" та "Індексу".

Для контролю функціонування мікротест-системи було запропоновано штам *E. durans* 43Д, який задепонований та запатентований як корисна модель у Депозитарії ДУ «ІЕІХ НАМН» [75].

Чутливість виділених культур мікроорганізмів до протимікробних препаратів визначали методом дискової дифузії за Бауером-Кірбі, використовуючи комерційно доступні диски з антибіотиками. Чутливість виділених культур ентерококів до ванкоміцину оцінювали методом серійного розведення в кардіоміоцеребральному (серцево-мозковому) агарі.

Критерії інтерпретації чутливості ентерококів до ванкоміцину були такими: МІК (мінімальна інгібуюча концентрація) ≤ 4 мкг/мл – чутливі; МІК від 8 до 16 мкг/мл – помірно чутливі; МІК ≥ 32 мкг/мл – резистентні [76].

Для визначення стійкості ентерококів до високих доз аміноглікозидів використовували набір №27. Мікробні суспензії ентерококів із щільністю 0,5 одиниць за шкалою McFarland висівали на поверхню серцево-мозкового агару, що містив розчини гентаміцину та стрептоміцину. Чашки із середовищем, що містило гентаміцин, інкубували протягом 24 годин, тоді як чашки зі стрептоміцином – протягом 48 годин. Контрольні чашки з середовищем без антибіотиків інкубували в аналогічних умовах.

Відсутність росту на середовищі з антибіотиками за наявності росту на контрольному середовищі без антибіотиків вказувала на чутливість штаму до гентаміцину та стрептоміцину. Натомість поява множинних колоній на середовищі з антибіотиками свідчила про стійкість штаму до цих препаратів.

Для бактеріологічного дослідження після біологічної смерті у тварин у стерильних умовах відбирали органи: нирки, печінку, селезінку, серце та брижові лімфатичні вузли. Органи та їхні проби зважували за допомогою електронних ваг «Kern EG 220-3NM». Шляхом суспендування органів у фізіологічному розчині з додаванням стерильного піску отримували гомогенати. Бактеріологічні дослідження проводили відповідно до стандартних методик [73].

Готували 10-кратні розведення гомогенатів органів експериментальних тварин і висівали їх на ентерококагар. Після інкубації здійснювали підрахунок колоній, виділяли чисті культури *E. faecium* для повторної ідентифікації та визначення рівня стійкості до ванкоміцину.

Повторну ідентифікацію *E. faecium* проводили за допомогою мікротест-системи для ідентифікації ентерококів – EN-COCCUStest, виробництва Pliva-Lachema Diagnostika (Чехія).

Адгезійну здатність ентерококів визначали за методом Бриліса В.І., вивчаючи гемадгезію на формалізованих еритроцитах людини з резус-

позитивною групою крові 0 (I). Для оцінки адгезивних властивостей мікроорганізмів використовували такі критерії: середній показник адгезії (СПА), коефіцієнт адгезії (КА) та індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ).

Критерії оцінки адгезії були наступними: відсутність адгезії при ІАМ $\leq 1,75$; низька адгезія при ІАМ від 1,76 до 2,5; середня адгезія при ІАМ від 2,51 до 4,0; висока адгезія при ІАМ $> 4,0$ [76].

Визначення антилізоцимної активності (АЛА) ентерококів проводили шляхом посіву досліджуваних штамів мікроорганізмів на живильне середовище з різними концентраціями лізоциму від 1 до 10 мкг/мл. Ефект інактивації лізоциму оцінювали за зростанням *Micrococcus luteus* var. *lysodeikticus* ATCC 2665, який використовували як індикаторне середовище для культивування штамів ентерококів, активних щодо лізоциму.

Кількісну оцінку антилізоцимної активності штаму проводили за максимальною концентрацією лізоциму в середовищі, інактивованому даним штамом [76, 77].

Вимірювання активності розкладання казеїну проводили шляхом внесення густої суспензії досліджуваної культури в лунку діаметром 5-7 мм на середовище з розчином казеїну, що містить 1% об'ємної частки казеїну [76, 77].

Для визначення желатиназної активності використовували прискорений метод, заснований на застосуванні фотоплівки в рідкому живильному середовищі [77].

Гемолітичну активність оцінювали на агарових середовищах з додаванням 5% дефібриляційної крові людини [76, 77].

Фібринолітичну активність ентерококів визначали на плазмо-агаровому голодному середовищі.

Для контролю активності ферментів встановлювали позитивні і негативні контрольні показники з використанням еталонних штамів.

Для синхронізації активності культур перед проведенням дослідів використовували одноразовий вплив низької температури (4°C) протягом 30 хв.

2.3. Молекулярно-генетичні методи

Зразки для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) готували таким чином: після 10 посівів одну колонію чистої культури мікроорганізмів з агару знімали стерильною петлею та переносили в пластикову пробірку об'ємом 1,5 мл, заповнену 50% етиловим спиртом при температурі 50°C. Пробірку закривали кришкою та ретельно струшували для суспендування колонії в спирті. Це дозволяло досягти загибелі мікроорганізмів і забезпечити подальшу роботу з культурою без потреби в спеціальних заходах безпеки. Підготовлений матеріал можна зберігати при кімнатній температурі до 1 тижня або при температурі -12°C до 6 місяців. Після цього отримували хромосомну ДНК за допомогою комерційного набору "DNA-express".

Для виявлення гена стійкості до ванкоміцину (Van A) методом ПЛР була використана авторська система праймерів [77]: зворотний праймер – 5'-AACAATAACGCGGGCACT-3'; прямий праймер – 5'-AATGTGCGAAAAACCTTGT - 3'.

Якщо результат ПЛР позитивний, за допомогою зазначеної системи праймерів формується амплікон довжиною 500 пар нуклеотидів (п.н.). ПЛР проводили на підсилювачі, запрограмованому компанією “Терцік”, у обсязі 25 мкл відповідно до методики Saiki [77]. Реакційна суміш містила такі компоненти: 10 мМ Tris HCl (pH 8,3), 10 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, 1 од Tag-полімерази (“Амплі Сенс”), по 30 пмоль кожного праймеру, 12 мкл неспецифічної ДНК.

ПЛР проводили за наступною програмою: початкова денатурація: 94°C – 4 хв; 35 циклів ампліфікації: денатурація: 94°C – 60 с; відпал: 50°C – 60 с; елонгація: 72°C – 60 с; стадія елонгації в кінцевому циклі ампліфікації: 72°C – 10 хв.

Продукт ампліфікації аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі, який фарбували 1% розчином бромистого етидію, з подальшим використанням молекулярно-масового маркера “Bioline” (США) для оцінки молекулярної ваги ампліфікованого продукту. Аналіз проводили при ультрафіолетовому випромінюванні трансільюмінатора. Дані електрофоретичного аналізу фіксували за допомогою цифрової камери Canon.

Для виявлення патогенних генів мікроорганізмів роду *Enterococcus* (*asa1*, *esp*, *cylA*, *gelE*, *hyl*) проводили ПЛР-ампліфікацію фрагментів генів, що кодують патогенні фактори. Виявлення патогенних генів здійснювали методом множинної ПЛР. Бактеріальну ДНК для ПЛР-аналізу виділяли з добових культур, використовуючи комерційно доступний набір “ДНК-сорб АМ”. Система праймерів, розроблена авторами, застосовувалася для виявлення патогенних генів [43]. Послідовність праймерів та розміри ампліфікованих продуктів наведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Перелік праймерів, використаних у роботі

Ген	<i>asa1</i>		<i>Hyl</i>		<i>cylA</i>		<i>esp</i>		<i>hyl</i>	
Фактор патогенності	<i>Aggregation substance</i>		<i>Gelatinase</i>		<i>Cytolysin</i>		<i>Enterococcal surface protein</i>		<i>Hyaluronidase</i>	
Праймер	ASA 11	ASA 12	GEL 11	GEL 12	CY T I	CYT IIb	ESP 14F	ESP 12R	HYL n1	HYL n2
Послідовність праймера, 5'-3'	GC AC GC TAT TA CG AA CT AT GA	TA AG AA AG AA CA TC AC CA CG A	TA TG AC AA TG CT GA TT TT GG T	AG AT GC AC CC GA AA TA AT AT A	A C T C G G G G G G C T A T A G G C	GC TG CT AA AG CT GC GC TT TT G	AG AT TT CA TC TT TG AT TC TT GG	AA TT GA TT CT TT AG CA CA TG G	AC AG AA GA GC TG CA GG AA AT G	GA CT GA CG TC CA AG TT TC CA A
Розмір продукту (п. н.)	375		213		688		510		276	

ПЛР проводили на програмованому підсилювачі “Терцік” об'ємом 50 мкл. Реакційна суміш містила такі компоненти: 20 mM Tris HCl (pH 8,3), 2,5 mM MgCl₂, 2,5 одиниць полімерази Tag, праймери *asa1*, *gelE* і *hyl* по 0,1 мкм; праймери *culA* та *esp* по 0,2 мкм; 5 мкл бактеріальної суспензії.

ПЛР проводили за такими умовами: початкова денатурація при температурі 95°C протягом 15 хв; 30 циклів ампліфікації, кожен з яких включав: денатурацію при температурі 94°C протягом 1 хв, відпал при температурі 56°C протягом 1 хв, і елонгацію при температурі 72°C протягом 1 хв. У останньому циклі ампліфікації фаза подовження тривала при температурі 72°C протягом 10 хв. Продукти ампліфікації відокремлювали в 1,5% агарозному гелі, пофарбованому розчином бромистого етідію, візуалізували та фотографували в ультрафіолетовому світлі.

2.4. Статистична обробка результатів досліджень

Для аналізу отриманих даних було проведено їх класифікацію за альтернативними та варіаційними ознаками. В результаті побудови матеріалу були отримані абсолютні значення, що відображають якісні та кількісні параметри під час розрахунку одиниці спостереження. Подальша обробка експериментальних даних здійснювалася відповідно до принципів звичайної та альтернативної варіаційної статистики. Статистична обробка включала розрахунок основних статистичних показників: середнього арифметичного (M), помилки середнього арифметичного або стандартної помилки (mM), середньоквадратичного відхилення (σ). Для всіх вибірок оцінювалася відповідність емпіричного розподілу нормальному розподілу за критерієм Колмогорова-Смірнова.

Різниця між вибірками, розподіленими за звичайним законом, оцінювалася відповідно до параметричного критерію Ст'юдента (t).

Взаємозв'язок між змінними був встановлений за допомогою кореляційного аналізу. Визначався коефіцієнт кореляції (r), який може приймати значення від -1 (сильна зворотна лінійна залежність) до $+1$ (сильна пряма пропорційна залежність). Якщо $r = 0$, то лінійної залежності

між двома вибірками немає, при значеннях $r > 0,95$ вважалося, що між параметрами існує майже лінійна залежність (пряма для позитивних значень r і навпаки для негативних значень); значення r в діапазоні від 0,8 до 0,95 вважалися сильним ступенем лінійної залежності між параметрами; від 0,6 до 0,8 – наявність лінійних залежностей між параметрами; при значеннях $r < 0,4$ передбачалося, що лінійна залежність між параметрами не з'ясована [78].

Для визначення різниць значень параметрів між невеликими вибірками було використано непараметричний статистичний метод. U-тест Манна-Уїтні застосовувався для перевірки гіпотези про рівність загальних середніх значень двох незалежних (не пов'язаних між собою) груп. Якщо ймовірність помилки не перевищувала 5% ($p < 0,05$), нульова гіпотеза відкидалася, і різниця між вибірками визнавалася статистично значущою, а середні значення вибірок вважалися суттєво різними.

Обробка результатів дослідження виконувалася на персональному комп'ютері із застосуванням програмного забезпечення Microsoft Excel 2007 та STATISTICA 6.0.

Висновки до розділу 2

Матеріалами та об'єктами дослідження, які проводились в лабораторії медичної мікробіології відповідають критеріям атестації й атестовані на проведення вимірювань у сфері поширення державного метрологічного нагляду згідно з галуззю атестації.

80 клінічних штамів були об'єктами дослідження з них 35 штамів – з клінічного матеріалу та поверхонь трахеостоми – від хворих на НХП після операційного втручання, які були госпіталізовані в нейрохірургічну клініку.

Групою порівняння було обрано ентерококи у кількості 22 штамів, які виділені з кишечника практично здорових людей. Використовувались референс-штами бактерій: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* var. *lysodeikticus* ATCC 2665, *Escherichia coli* ATCC 25922, як тест-культури..

Поживні середовища були виготовленні за відповідними вимогами до приготування.

Контроль якості поживних середовищ проводили за рекомендаціями фірм-виробників, які викладено у сертифікатах до продукції, а також за інформаційним листом.

Ідентифікація та виділення відбірних культур мікроорганізмів визначають за морфологічними, культуральними, тинктуральними та біохімічними властивостями використанням загально прийнятих методів.

Для виявлення ентерококів використовують мікротест-систему. Ця система дозволяє ідентифікувати штами ентерококів за допомогою восьми тестів: сорбоза, аргінін, арабіноза, манітол, сорбітол, рафіноза, мелецітоза, мелібіоза. За допомогою "Ідентифікаційної таблиці" та "Індексу" визначається вид мікроорганізмів.

Методом дискової дифузії Бауера-Кірбі визначають чутливість до протимікробних препаратів.

Також проводять бактеріологічні дослідження за стандартними методиками для вивчення рівня стійкості до ванкоміцину, виділення чистих культур *E. Faecium*.

Адгезивну здатність ентерококів визначають за методом Бріліса.

На агарових середовищах вивчають гемолітичну активність ентерококів.

Для виявлення гена стійкості до ванкоміцину використовують метод ПЛР.

Для аналізу отриманого матеріалу проводиться статистична обробка за альтернативними та варіаційними ознаками.

Все що перераховано вище допомагає як можна краще вивчити резистентність ентерококів до антибіотиків та виявляти стійкість до високих доз аміноглікозидів. А ще дає можливість виявити патогенний ген, який кодує патогенні фактори що підвищують стійкість штамів до антибіотиків.

РОЗДІЛ 3 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Вивчення видової ідентифікації мікроорганізмів роду *Enterococcus* існого походження

З патологічного матеріалу пацієнтів з НХП було виділено 35 штамів, які відповідно до своїх культуральних, морфологічних, тинктурних та біохімічних характеристик належали до роду *Enterococcus*. Встановлено, що основними видами були *E. faecalis* (12 штамів, 34,29%) і *E. faecium* (18 штамів, 51,43%). Також були виділені інші види: *E. durans* (1 штам, 2,86%), *E. raffinosus* (1 штам, 2,86%), *E. spp.* (2 штами, 5,7%) та *E. cecorum* (1 штам, 2,86%) (рис. 3.1).

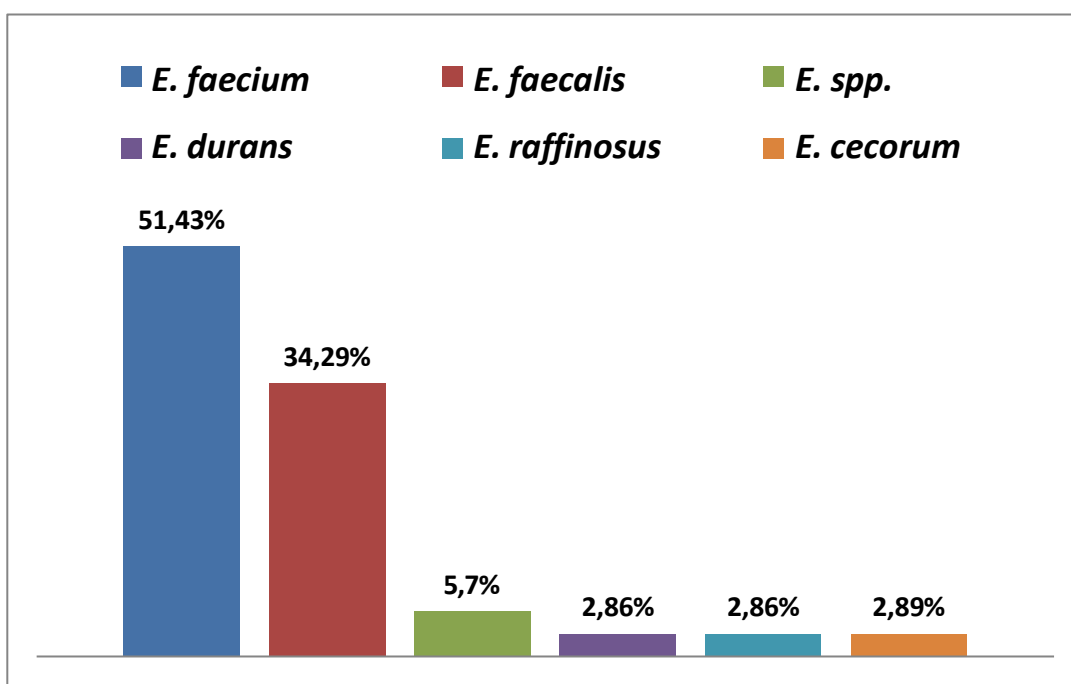


Рис. 3.1 – Розподіл за видовим складом ентерококів, вилучених з патологічного матеріалу хворих на НХП

У контрольній групі розподіл штамів за видами був наступним: *E. faecium* – 8 штамів (36,36%), *E. spp.* – 6 штамів (27,27%), *E. faecalis* – 6 штамів (27,27%), *E. durans* – 1 штам (4,55%), *E. casseliflavus* – 1 штам (4,55%) (рис. 3.2).

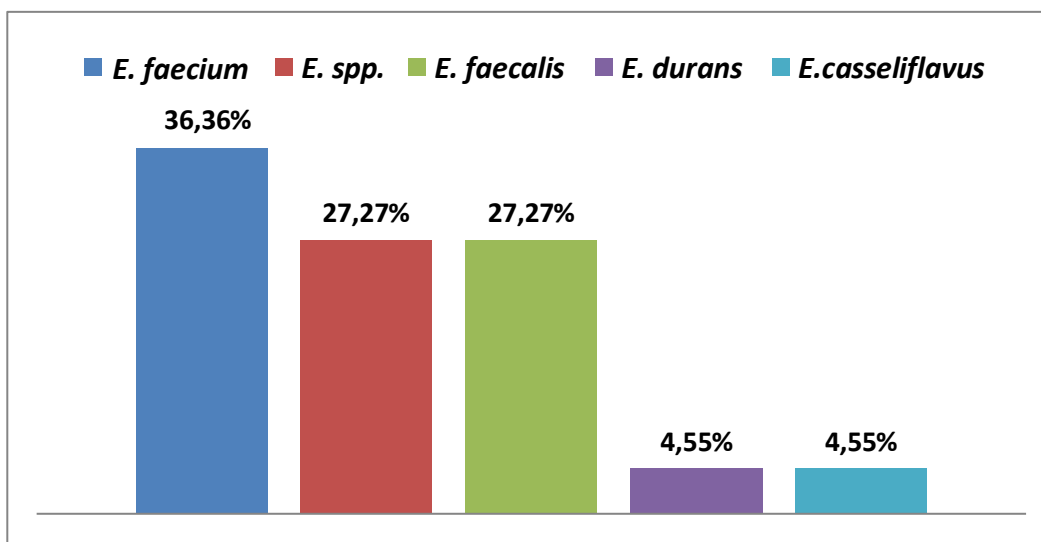


Рис. 3.2 – Розподіл за видовою належністю ентерококів, вилучених з кишечника здорових людей

Таким чином, в процесі проведених досліджень були виявлені відмінності в видовому складі мікробної популяції ентерококів залежно від їхнього походження. Види *E. faecium* та *E. faecalis* найчастіше виділялися з патологічного матеріалу пацієнтів з НХП після хірургічного втручання, з частотою 18 штамів ($51,43 \pm 8,0\%$) і 12 штамів ($34,29 \pm 7,8\%$) відповідно. Серед ентерококів, виділених із сечі пацієнтів, що страждають на ІСВШ, переважав вид *E. faecalis* – 22 штами ($85,76 \pm 6,8\%$). Під час виконання науково-дослідної роботи для контролю функціональності тест-систем для видової ідентифікації ентерококів за біохімічними ознаками використовувався штам *E. durans* 43-Д.

3.2. Патофенотипування мікроорганізмів роду *Enterococcus*, виділених з різних екоотопів

При оцінці етіологічної значущості умовно-патогенних мікроорганізмів (УПМ), видалених з клінічного матеріалу, слід враховувати наявність патогенних факторів (ФП) в мікроорганізмах. Найчастіше відомо, що аномальні біологічні порушення гомеостазу мікробіоценозу призводить до збільшення кількості представників аеробної частини мікрофлори і підвищенню агресивного потенціалу цих бактерій, що допомагає їм додати бар'єр епітеліального шару кишечника і транслокації у внутрішнє

середовище організму [29, 78]. Транслокація вважається одним з механізмів ендогенного інфікування, розвитку інфекційних захворювань і ускладнень кишкової зовнішньої флори [30]. Однак питання про роль біологічних властивостей транслокованих бактерій для виживання у внутрішньому середовищі організму на сьогоднішній день залишається невирішеним.

3.2.1. Адгезивна активність ентерококів

При ФП, який сприяє прикріпленню, колонізації і проникненню макроорганізмів в тропні тканини, вивчається здатність ентерококів до прикріплення і активність його ферментів, дія яких спрямована на поділ компонентів еукаріотичних клітин (казеїнази, желатинази, фібринолізину).

Аналіз результатів дослідження адгезивних властивостей ентерококів, виділених у пацієнтів з НХП, показав, що всі штами характеризувалися високими або середніми адгезивними властивостями (рис. 3.3). Діапазон варіацій індексу адгезивності мікроорганізмів (ІАМ) для ентерококів, виділених у пацієнтів з НХП, становив від 2,9 до 8,2, при цьому 28 штампів (84,6%) мали високу адгезію. У контрольній групі значення ІАМ коливалися від 2,24 до 5,5, з них 4 (15%) штами продемонстрували низьку адгезію, 15 (65%) — середню, а 4 (20%) штами — високу адгезію.

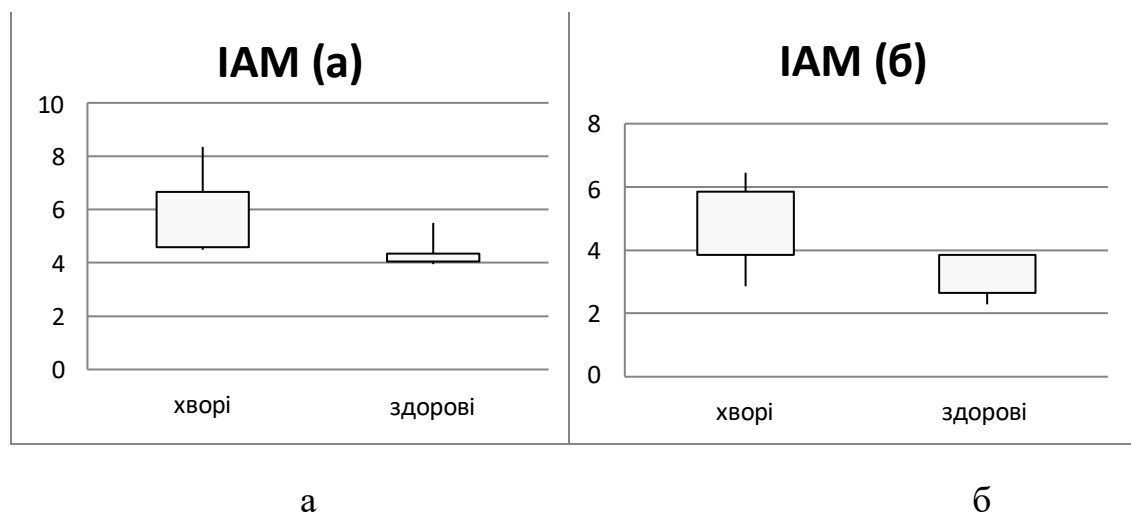


Рис. 3.3 – Показники адгезії (ІАМ) *E. faecalis* (а) та *E. faecium* (б), вилучених від хворих на НХП та здорових

Статистична обробка показала, що вираженість ознак (ІАМ), що характеризують адгезивні властивості ентерококів, виділених від пацієнтів, була достовірно вищою, ніж у групі порівняння ($p < 0,05$).

Слід зазначити, що при виділенні ентерококів з спинномозкової рідини (ліквор) діапазон ІАМ варіював від 3,3 до 5,8, а з кишечника – від 2,2 до 3,9. Статистичний аналіз показав достовірні відмінності між цими групами ($p < 0,05$) (рис. 3.4).

Середня кількість еритроцитів, що беруть участь адгезії ентерококів, в групі пацієнтів на НХП і контрольній групі достовірно не відрізнялася ($p > 0,05$).

Таким чином, всі ентерококи, виділені з кишечника як здорових пацієнтів, так і хворих на НХП, мали наявність спайок. На нашу думку, результати досліджень, що виявили вищу експресію адгезивних властивостей у позаклітинних ентерококах, виділених у пацієнтів з НХП, можуть свідчити про важливість адгезії в процесах транслокації мікроорганізмів з природного середовища та їх здатності виживати в аномальних умовах, що узгоджується з попередніми дослідженнями [78-79].

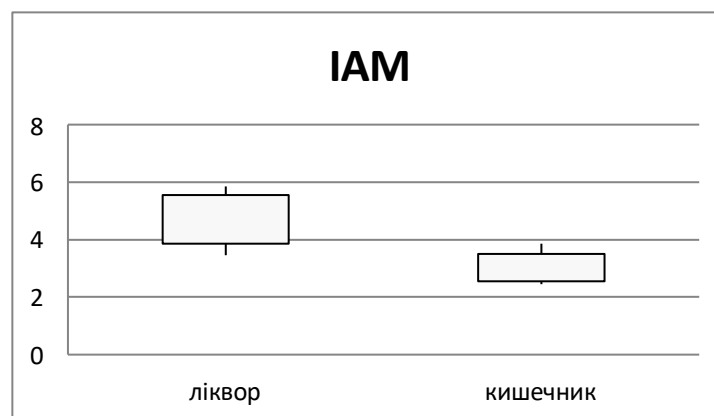


Рис. 3.4 – Показники адгезії (ІАМ) ентерококів, вилучених з ліквору від хворих на НХП та з кишечника здорових

Ми провели порівняльний аналіз адгезивних властивостей ентерококів, виділених у хворих на НХП і практично здорових людей, в залежності від виду штаму (рис. 3.3). Слід зазначити, що у ентерококів виду

faecium експресія ІАМ варіювала від 2,9 до 6,4, а у виду *faecalis* – від 4,5 до 8,2. При порівнянні експресії адгезії в цих групах достовірної різниці між показниками виявлено не було ($p > 0,05$).

Залежно від виду аналіз результатів дослідження адгезійних властивостей ентерококів з контрольної групи показав, що індекс адгезії штаму виду *faecalis* значно перевищував індекс адгезії ентерококів виду *faecium* ($p < 0,05$). Таким чином, значення індексу ІАМ ентерококів для виду *faecalis* варіювали від 3,9 до 5,5, а для виду *faecium* – від 2,2 до 3,5.

Ентерококи виду *faecalis* характеризуються переважно ендогенними шляхами інфікування, в той час як у виду *faecium* вони, як відомо, є екзогенними [14]. Одна з причин, на нашу думку, полягає у сприянні переміщенню мікроорганізмів з кишечника. Незважаючи на більш виражену адгезивність у *E. faecalis*, це припущення потребує подальшого вивчення.

Таким чином, наше дослідження показує, що ентерококи, виділені з патологічного матеріалу у пацієнтів з НХП, мають більш виражені адгезивні властивості порівняно з штамами, виділеними з природного середовища – кишечника людини.

Аналіз проведених досліджень адгезії ентерококів, видалених із сечі та сечівника у пацієнтів з ІСВШ показав, що діапазон варіацій індексу ІАМ ентерококів, видалених у пацієнтів з ІСВШ, варіював від 2,94 до 8,89, але з 21 штамів 17 ($81,0 \pm 5,8$) % були високоадгезивними та 4 ($19 \pm 4,1$) % – середньоадгезивними. Залежно від видового складу, 16 ($76,2 \pm 10,6$) % штамів з високою адгезією припадає на вид *E. faecalis*, 2 ($9,5 \pm 9,9$) % – на *E. faecium*, 3 ($14,3 \pm 4,4$) % віднесені до інших видів. Порівняльний аналіз з контрольною групою не виявив суттєвих відмінностей між адгезивними властивостями штамів обох груп ($p = 0,089$).

Таким чином, ентерококи, виділені у пацієнтів з ІСВШ, характеризуються високими і середніми адгезивними властивостями.

3.2.2. Желатиназна та казеїназна активність ентерококів

Бактеріальна протеаза сприяє інвазії та дифузії мікроорганізмів у міжклітинному просвіті, в результаті чого також утворюється велика кількість медіаторів запалення [78]. Желатиназа є найбільш вивченим протеолітичним ферментом у ентерококів [57, 79]. В даному дослідженні активність желатину в досліджуваному штамі визначали тільки якісним методом з фіксованою наявністю ознаки, а активність казеїнази оцінювали за кількісними характеристиками.

Аналіз представлених даних показав, що ентерококи можуть продукувати желатин, але частота виявлення цієї активності залежала від наявності запальних процесів (таблиця 3.1). Таким чином, кількість желатиназоактивних штамів серед ентерококів, виділених з патологічного матеріалу пацієнтів з НХП, була достовірно вищою, ніж у здорових ($p < 0,05$).

Таблиця 3.1

Пенетрантність желатиназної та казеїназної активності у ентерококів різного походження

Походження ентерококів	Питома вага штамів, які проявляли желатиназну активність		Питома вага штамів, які проявляли казеїназну активність	
	абс.	$M \pm m, \%$	абс.	$M \pm m, \%$
хворі на НХП	19	$54,3 \pm 8,1^{1)}$	25	$71,43 \pm 7,3^{1)}$
хворі на ІСВШ	10	$40,0 \pm 9,5^{1)}$	21	$84,0 \pm 6,0^{1)}$
здорові	5	$22,73 \pm 6,0$	6	$27,3 \pm 10,7$

¹⁾ різниця показників статистично достовірна ($p < 0,05$).

Згідно з видовим складом, желатинактивним штамам ентерококів, виділеним від пацієнтів з НХП, належали: *E. faecalis* – 8 ($42,1 \pm 10,8$) %, *E. faecium* – 10 ($52,6 \pm 10,9$) %, а також ентерококи, неідентифіковані до виду – 1 ($5,3 \pm 4,7$) %. Важливо зазначити, що серед ентерококів, виділених від

здорових людей, був лише *E. faecalis*. Не було виявлено статистично значущої різниці між проникаючою активністю желатинази в штамах *E. faecium* і *E. faecalis* ($p > 0,05$). Таким чином, з 13 штамів *E. faecalis* 8 ($62,0 \pm 12,8$) % мали желатиназну активність, а серед 10 штамів *E. faecium* 5 ($50,0 \pm 11,1$) % також демонстрували желатиназну активність.

Казеїназна активність ентерококів є одним з найменш вивчених факторів патогенезу цих мікроорганізмів. Коли було проведено аналіз казеїназної активності ентерококів, виділених у пацієнтів з НХП, досліджувані ознаки виявлені у 25 штамів. Виділені у пацієнтів штами казеїназоактивних ентерококів представлені наступними видами: *E. faecium* – 15 ($60,0 \pm 9,6$) %, *E. faecalis* – 7 ($28,0 \pm 9,1$) %, неідентифіковані ентерококи – 3 ($12,0 \pm 6,8$)%; у здорових людей: *E. faecium* – 1 ($16,7 \pm 15,2$) %, *E. faecalis* – 4 ($66,6 \pm 19,2$) %, неідентифіковані ентерококи – 1 ($16,7 \pm 15,2$)%. Не було виявлено достовірної різниці між проникаючою активністю казеїнази у ентерококів видів *faecium* та *faecalis* достовірної різниці не виявлено ($p > 0,05$). Так, серед 13 штамів *E. faecalis* були казеїназоактивними 7 ($54,0 \pm 12,8$) % штамів, серед 20 штамів *E. faecium* – 14 ($70,0 \pm 10,2$) %.

У ході дослідження було встановлено, що 14 ($43,2 \pm 8,1$) % штамів мали як желатиназну, так і казеїназну активність, з яких 5 ($36,0 \pm 12,1$) % було пов'язано з видом *E. faecali*, 8 ($57,0 \pm 12,4$) % - з видом *E. faecium* і 1 ($7,0 \pm 6,0$) % - з видом до неідентифікованих ентерококів.

Експресія казеїназної активності була достовірно вищою у ентерококів виду *faecalis*, виділених від пацієнта з НХП, порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$) (рис. 3.5). Між ентерококами інших аналізуємих груп достовірних розбіжностей не виявлено ($p > 0,05$).

Аналіз показав, що серед ентерококів, виділених у пацієнтів з ІСВШ, кількість штамів з желатиназною активністю була майже в 4 рази більшою, ніж у контрольній групі ($p < 0,05$) (табл. 3.1). В основному ці штами належали до *E. faecalis*. Оскільки саме цей вид домінує серед ентерококів у пацієнтів з

ІСВШ, дослідження різниці в кількості желатиназоактивних штамів між різними видами в цій групі не було проведено.

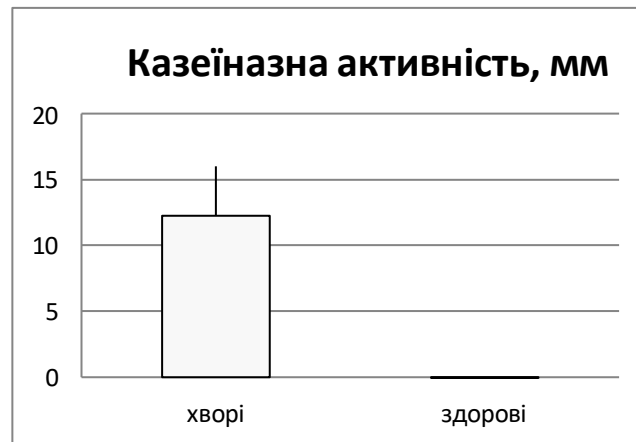


Рис. 3.5 – Експресивність казеїназної активності *E. faecalis*, вилучених від хворих на НХП та здорових

При аналізі експресії казеїназної активності було встановлено, що остання була достовірно вищою у ентерококів виду *faecalis*, виділених від хворих на ІСВШ, ніж у групі порівняння ($p < 0,05$) (рис. 3.6).

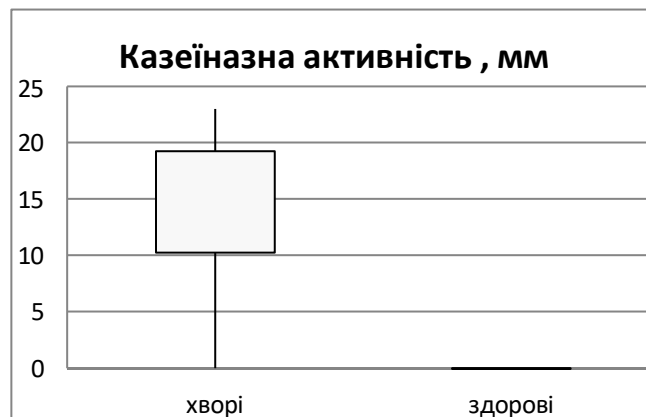


Рис. 3.6 – Експресивність казеїназної активності *E. faecalis*, вилучених від хворих на ІСВШ та здорових

3.2.3. Фібринолітична активність ентерококів

В результаті запалення утворюються фібринові згустки, які, як відомо, перешкоджають поширенню мікроорганізмів. Фібринолізин це протеолітичний фермент, який розчиняє ці фібринові згустки та сприяє проникненню бактерій у тканини мікроорганізмів.

Дослідження фібринолітичної активності ентерококів, виділених у пацієнтів з НХП, показало, що не було виявлено суттєвих розбіжностей у рівнях фібринолітичної активності порівняно з контрольною групою ($p > 0,05$). Дані про проникнення фібринолітичної активності в ентерококи, видалені у пацієнтів з НХП, наведені в таблиці 3.2. Залежно від видового складу, фібринолітичними штамами, виділеними у пацієнтів з НХП, були: *E. faecium* – 4 ($57,1 \pm 17,7\%$); *E. faecalis* – 2 ($28,6 \pm 17,1\%$); *E. spp.* – 1 ($14,3 \pm 11,7\%$).

Для здорових людей фібринолітичну активність виявлено у таких видах: *E. faecalis* – 2 ($66,7 \pm 27,2\%$); неідентифіковані ентерококи – 1 ($33,3 \pm 27,2\%$).

Ці дані вказують на те, що фібринолітична активність була більш виражена серед ентерококів виду *E. faecalis* у здорових людей, тоді як у пацієнтів з НХП активність була меншою.

Таблиця 3.2

Пенетрантність фібринолітичної активності у штамів ентерококів різного походження

Походження ентерококів	Кількість вивчених штамів	Кількість штамів, що продукують Фібринолізин	
		абс.	$M \pm m, \%$
хворі на НХП	35	7	$20,0 \pm 6,7/19,4$
хворі на ІСВШ	25	9	$36,0 \pm 9,2^1/36$
здорові	22	3	$13,64 \pm 8,4$

¹⁾ різниця показників статистично достовірна ($p < 0,05$).

Статистичний аналіз показав, що між аналізованими групами не було суттєвих відмінностей щодо вираженості фібринолітичної активності ($p > 0,05$).

Таким чином, отримані нами дані свідчать про важливу роль фібринолітичної активності ентерококів, що видаляються з патологічних

речовин (ліквору, крові, сечі та ін.) у пацієнтів з НХП після хірургічного втручання, але це твердження вимагає подальшого вивчення..

Результати визначення проникнення фібринолітичної активності в ентерококи, виділені від пацієнтів на ІСВШ і здорових людей, наведені в таблиці 3.2. Аналіз даних показав, що фібринолітично активних ентерококів у групі, виділених від хворих на ІСВШ, було достовірно більше, ніж у групі порівняння ($p < 0,05$). З штамів, здатних до фібринолізу, 8 ($88,9 \pm 8,7$) % припадає на *E. faecalis*, а 1 ($11,1 \pm 8,7$)% – до непідтверджених ентерококів.

Порівняльний аналіз вираженості фібринолітичної активності ентерококів, виділених у хворих з ІСВШ, і здорових людей, не вияви істотних відмінностей ($p > 0,05$).

3.2.4. Антилізоцимна активність ентерококів

Відомо, що персистенція мікроорганізмів в організмі господаря пов'язана з утворенням у бактерій факторів, спрямованих на інактивацію механізмів природної протиінфекційної резистентності, таких як антилізоцим, антикоімплементарність та інші види діяльності [63, 81-82]. Чисельні клінічні та експериментальні дані щодо інфекційної патології свідчать про те, що «лізоцим-антилізоцимна» система сприяє тривалій персистенції патогенів в організмі людини та регулює експресію антилізоцимних ознак у окремих клонів у популяціях патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [81-82]. Спочатку персистенція бактерій вважалася невеликим патогенним фактором, який не чинить власного опіру що змінює дії на клітинному або біологічному рівні, в той час як інші є рівними [82]. У науковій літературі наводяться дані щодо визначення антилізоцимної активності ентерококів, але проблема проникненості та експресії цієї ознаки в організмі людини залишається невирішеною. Популяція мікроорганізмів роду *Enterococcus*, до кінця не вивчена, а вид, їх локалізація відсутні, а також відсутня інформація про характеристики стійкого потенціалу цих мікроорганізмів в залежності від наявності біотопів і запальних процесів в організмі.

Модифікація факторів персистенції, в тому числі АЛА, та вірулентного потенціалу мікроорганізмів у цілому, відбувається в умовах перенесення збудників в інший біотоп і їх вегетації в різних біотопах. З іншого боку, можливість перенесення мікроорганізмів з одного біотопу в інший пов'язано з їх кількісними властивостями та рівнем активності фактора персистенції [81, 82].

Для оцінки інформативності АЛА ентерококів, ми проаналізували результати дослідження цієї ознаки у штамів, виділених з патологічного матеріалу у пацієнта з НХП та пацієнта з ІСВШ. Для проведення – АЛА ентерококів, виділених з кишечника здорових людей. Аналіз даних показав достовірну різницю між проникненням АЛА в штами проаналізованих груп ($p < 0,05$) (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Пенетрантність АЛА у штамів ентерококів різного походження

Походження ентерококів:	Кількість вивчених штамів	Кількість штамів, що проявляли АЛА	
		абс.	$M \pm m, \%$
хворі на НХП	35	32	$91,43 \pm 18,9^1$
хворі на ІСВШ	25	25	100^1
здорові	22	9	$40,9 \pm 10,9$

¹⁾ різниця показників статистично достовірна ($p < 0,05$).

У ході дослідження було встановлено, що діапазон експресії альфа-ліпоїдної активності (АЛА) ентерококів, виділених з патологічних матеріалів у пацієнтів з НХП, коливається від 1 до 6 мкг/мл, тоді як у ентерококів з кишечника здорових людей цей діапазон складав від 1 до 2 мкг/мл.

Кількість штамів з високою активністю АЛА (більше 4 мкг/мл) серед ентерококів, виділених від хворих, становила 21 ($60,0 \pm 8,0\%$), з середньою активністю (від 2 до 3 мкг/мл) – 9 ($25,7 \pm 7,1\%$), а з низькою активністю АЛА (менше ніж 2 мкг/мл) – 5 ($14,3 \pm 5,9\%$).

Це свідчить про те, що ентерококи, виділені з патологічних матеріалів у пацієнтів з НХП, мають значно вищу активність АЛА порівняно з ентерококами, виділеними з кишечника здорових людей.

Статистична обробка результатів показала достовірну різницю між експресією АЛА ентерококів, видалених у пацієнтів і ентерококів, виділених від здорових людей ($p < 0,05$) (рис. 3.7), у той же час не було виявлено достовірних відмінностей в експресії АЛА у ентерококів різних видів або аналізованих груп ($p > 0,05$).

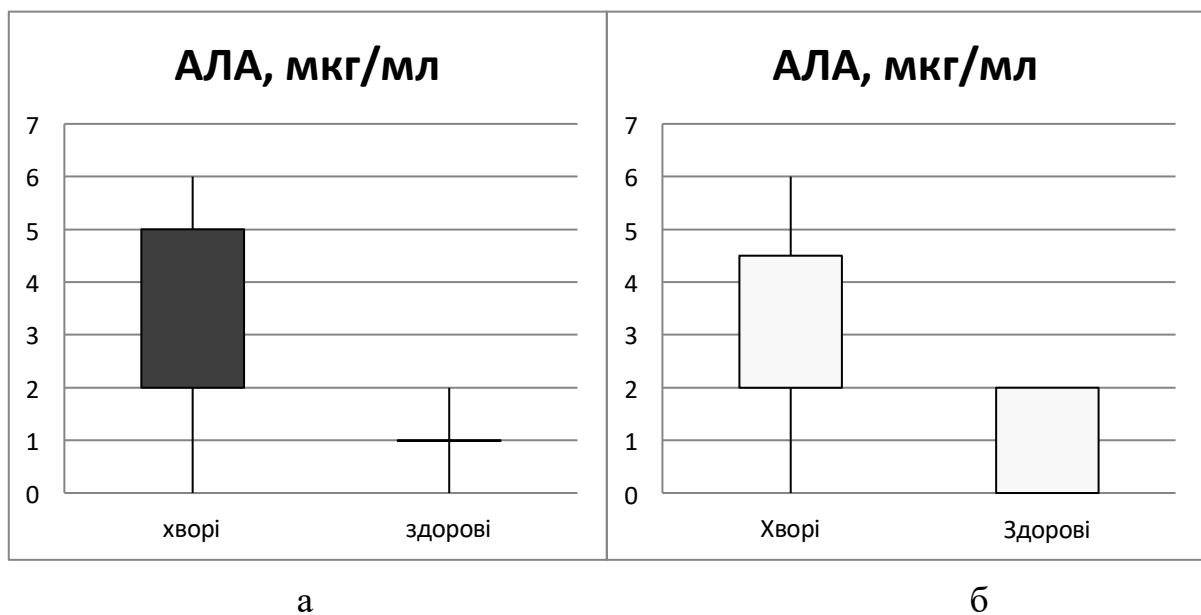


Рис. 3.7 – Діапазон експресивності АЛА *E. faecalis* (а) та *E. faecium* (б), вилучених від хворих на НХП та здорових

Порівняльний аналіз даних про проникнення АЛА між ентерококами, виділеними від пацієнтів з ІСВШ і здорових пацієнтів, встановлені достовірні різниці ($p < 0,05$) (табл. 3.3).

При аналізі експресії ентерококів АЛА, взятих у пацієнтів з ІСВШ, було виявлено, що діапазон експресії антилізоцимної активності становить від 1 до 6 мкг/мл (рис. 3.8). у той же час експресія АЛА у цій групі мікроорганізмів була значно вищою, ніж у штамів, виділених із кишечника здорових людей ($p < 0,05$). Було встановлено, що кількість штамів з високою активністю АЛА (більше 4 мкг/мл) серед ентерококів, вилучених у пацієнтів, становило 21 ($84,0 \pm 7,5$) %, при середній активності (від 2 до 3 мкг/мл) –

3 ($12,0 \pm 6,8$) %, низький рівень АЛА (менше 2 мкг/мл) – 1 ($4,0 \pm 3,6$) % штаму.

Підсумовуючи, аналіз наших даних дослідження АЛА в ентерококах, виділених з патологічного матеріалу пацієнтів показав, що проникнення та вираженість цієї активності були вищими у ентерококів, виділених у пацієнтів з НХП і ІСВШ, ніж у ентерококів із групи порівняння, що узгоджується з нашим попереднім дослідженням [82]. Було встановлено, що АЛА не залежить від виду ентерококів.

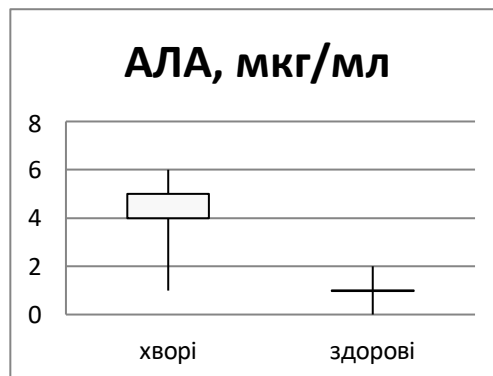


Рис. 3.8 – Діапазон експресивності АЛА *E. faecalis*, вилучених від хворих на ІСВШ та здорових

3.2.5. Гемолітична активність ентерококів

Токсини мікроорганізмів відіграють важливу роль в патогенезі інфекційного процесу, який визначає розвиток симптомів захворювання. Ефектом бактеріального гемолізу є цитотоксичний вплив на еукаріотичні клітини, інгібування фагоцитозу, а також сорбція заліза необхідного для росту мікроорганізмів *in vivo*, що виділяється при лізисі еритроцитів [83].

Відомо, що кілька штамів ентерококів виявляють альфа – та бета-гемолітичні властивості на агарі, який містить еритроцити коня, кролика та людини. Ентерококи з гемолітичним фенотипом частіше виділяються з патологічного матеріалу і за деякими даними, колонізують кишечник клінічно здорових людей [83].

З даних взятих з літературних джерел відомо, що цитотоксини, які викликають лізис еритроцитів з високою частотою виявляються у штамх *E. faecalis*, відібраних при інфекціях різної локалізації і надають

протизапальну дію. Особливо небезпечно, що штами, котрі продукують цитотоксини стійкі до хіміотерапевтичних препаратів [84].

Дані представлені в таблиці 3.4, показують, що проникаюча гемолітична активність ентерококів, виділених з патологічних речовин у пацієнтів була достовірно вище, ніж в групі порівняння ($p < 0,05$).

Видовий склад гемолітично активних штамів ентерококів, ізольованих у пацієнтів на НХП відповідають наступному: *E. faecium* – 8 штамів ($47,1 \pm 11,5$ %), *E. faecalis* – 7 ($41,1 \pm 11,3$ %), *E. spp.* – 2 ($11,8 \pm 7,0$ %); з числа двох здорових штамів, 1 відноситься до виду *E. faecalis*, а інший – *E. casseliflavus* ($22,8 \pm 27,2$).

Таблиця 3.4

Пенетрантність гемолітичної активності у штамів ентерококів різного походження

Походження ентерококів:	Кількість вивчених штамів	Кількість гемолітичноактивних штамів	
		абс.	$M \pm m$, %
хворі на НХП	35	17	$48,6 \pm 8,2^{1)}$
хворі на ІСВШ	25	15	$60,0 \pm 9,0^{1)}$
здорові	22	2	$9,1 \pm 6,4$

¹⁾ різниця показників статистично достовірна ($p < 0,05$).

Було встановлено, що ентерококи серед гемолітично активних штамів *E. faecalis* β -гемолізстановив 6 ($40,0 \pm 15,3$ %) штамів, α -гемоліз – 2 ($13,33 \pm 15,3$ %) штамів; а також *E. faecium* – у 2 ($13,33 \pm 13,8$ %) і у 5 ($33,34 \pm 13,8$ %) відповідно.

При вивченні проникнення гемолітичної активності в штамів ентерококів, ізольованих у пацієнтів на ІСВШ, більшість штамів характеризувалися фенотипом гемолітичної активності (табл. 4.4) і в той же час β -гемолітичний був виявлений у 14 ($93,34 \pm 7,4$ %) штамів, а α -гемолітичний - у 1 ($6,66 \pm 7,4$ %).

3.2.6. Визначення біопротилей мікроорганізмів роду *Enterococcus* різного походження

Відомо, що для збереження виду бактерії повинні адаптуватися до існування в певній екосистемі, а їх розвиток тягне за собою модифікацію комплексу фенотипових характеристик мікроорганізмів, тобто комплексу біологічних особливостей [84].

Для підтвердження цього положення ми визначили біопротиль ентерококів (комплекс фенотипових характеристик) та проаналізували рівень фенотипового поліморфізму в популяціях ентерококів різного походження (рис. 3.9).

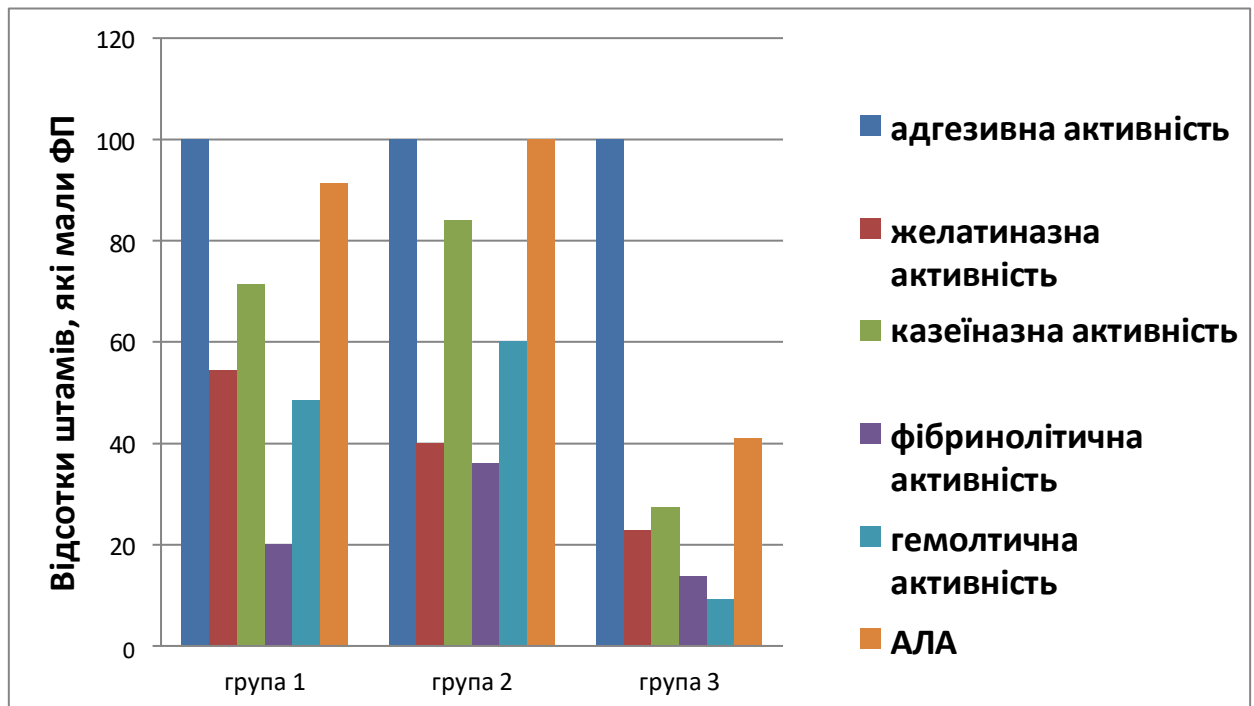


Рис. 3.9 – Пенетрантність факторів патогенності ентерококів різного походження

Примітка:

1. Група 1 – штами, ізолювані з патологічного матеріалу пацієнта з НХП;
2. група 2 – штами, ізолювані з патологічного матеріалу пацієнта з ІСВШ;
3. Група 3 – штами, виділені з кишечника здорових людей

Фенотипічні варіанти, сформовані на основі наявності або відсутності наступних характеристик: адгезивної (АДГ), гемолітичної (ГЕМ), фібринолітичної (ФІБ), желатиназної (ЖЕЛ), казеїназної (КАЗ) та антилізоцимної (АЛА) активності, були розглянуті при аналізі біологічного різноманіття мікробної популяції роду ентерокок. Для оцінки рівня фенотипічного поліморфізму в популяціях бактерій реєстрували велику кількість фенотипу – БФ (кількість варіантів які зустрічали мутації що виникли) [84].

Ми провели комплексний аналіз фенотипової структури популяції ентерококів різних груп спостереження. В оптимальній екологічній ніші (кишечник здорової людини) утворилося 8 мікроорганізмів роду *Enterococcus* БФ. Слід зазначити, що серед ентерококів цієї групи не реєструвались мікроорганізми з повними комплексами вивчених характеристик і на частину штамів з максимальною кількістю факторів патогенності (ФП) (для даної групи їх три) у структурі вивченої частки припадало всього $(25,0 \pm 9,7) \%$. Разом з питомою вагою цих штамів, які мали мінімальний набір, тобто один ФП, складала $(5,0 \pm 4,9) \%$. Основна частина штамів характеризувалась сполученням двох факторів патогенності з домінуючим біопротифілем: (АДГ+), (ЖЕЛ–), (КАЗ–), (ФІБ–), (ГЕМ–), (АЛА+) та (АДГ+), (ЖЕЛ–), (КАЗ+), (ФІБ–), (ГЕМ–), (АЛА–).

Мікроорганізми роду *Enterococcus*, виділені з патологічного матеріалу пацієнтів з НХП характеризувалися максимальним ступенем фенотипового поліморфізму, їх БФ склав 15. З повним комплексом вивчених характеристик було виявлено 3 $(8,1 \pm 4,5) \%$ ентерокока, 7 $(18,9 \pm 6,4) \%$ 5 ФП з повним спектром вивчених характеристик: (АДГ+), (ЖЕЛ+), (КАЗ+), (ФІБ–), (ГЕМ+), (АЛА+). Слід підкреслити, що основна частина штаму - 15 $(40,5 \pm 8,1) \%$ характеризувалася поєднанням 4 ФП, якими були: (АДГ+), (ЖЕЛ+), (КАЗ+), (ФІБ–), (ГЕМ–), (АЛА+); (АДГ+), (ЖЕЛ+), (КАЗ–), (ФІБ–), (ГЕМ+), (АЛА+) і (АДГ+), (ЖЕЛ–), (КАЗ+), (ФІБ–), (ГЕМ+), (АЛА+). Слід підкреслити, що

кількість штамів з активністю трьох ФП становить $7 (18,9 \pm 6,4) \%$, а двох ФП – $3 (8,1 \pm 4,5) \%$.

Аналіз отриманих результатів показав, що у ентерококів, які були відібрані з сечі пацієнтів з ІСВШ виявлено значне зменшення спектру фенотипів, їх БФ становило 7. Також відзначається, що серед ентерококів цієї групи було виявлено $9 (32,2 \pm 8,8) \%$ штамів з повним комплексом вивчених характеристик. А також слід підкреслити, що кількість штамів з активністю п'яти та чотирьох ФП складала по $3 (10,7 \pm 5,8) \%$ та була однаковою. На частку штамів з сполученням трьох ФП припало $(46,4 \pm 9,4) \%$, у цій групі домінуючим біопротифілем був: (АДГ+), (ЖЕЛ–), (КАЗ+), (ФІБ–), (ГЕМ–), (АЛА+).

Узагальнюючи результати аналізу, ми прийшли до наступних висновків. Мікроорганізми роду *Enterococcus* характеризувалися високими і середньо адгезивними властивостями, причому вираженість цієї ознаки була більшою у ентерококів, виділених від пацієнтів з НХП і ІСВШ. Показник адгезії ентерококів, виділених від пацієнтів в залежності від видової приналежності штамів достовірно не відрізнялись. Більш виражена адгезія ентерококів, видалених з патологічних матеріалів, може свідчити про здатність виживати в аномальних умовах і роль адгезії в транслокації мікроорганізмів з природнього середовища, що можна розглядати як фактор патогенності мікроорганізмів.

Було визначено, що проникнення желатиназної, казеїназної, гемолітичної та антилізоцимної активності у клінічних штамів ентерококів становить $50,0 \%$, $79,7 \%$, $57,8 \%$ та $93,8 \%$ відповідно. Проникаюча активність желатинази і казеїнази ентерококів, виділених з патологічного матеріалу у пацієнта з НХП і ІСВШ була достовірно вище, ніж у штамів, виділених з організму здорової людини ($p < 0,05$). Проникаюча фібринолітична активність була достовірно вищою у штамів, виділених від пацієнтів з ІСВШ ніж у штамів у групі порівняння ($p < 0,05$). Аналіз результатів вивчення гемолітичної активності ентерококів показав, що

ентерококи з гемолітичним фенотипом частіше виділяються з патологічного матеріалу пацієнтів з гнійно-запальними інфекціями, ніж з кишечника здорових людей.

Експресія казеїназної активності була достовірно вищою у ентерококів виду *faecalis*, виділених з клінічного матеріалу від хворих пацієнтів, в порівнянні з контрольною групою ($p < 0,05$). Експресія АЛА була вищою у ентерококів обох видів, виділених від хворих пацієнтів на НХП і ІСВШ, ніж у ентерококів з порівнюваної групи ($p < 0,05$).

Для кожної еконіші ентерококів характерний бактеріальний набір фенотипів які регулюються певним біологічним біопрофілем. Визначено високу фенотипову гетерогенність ентерококів у “природному” середовищі за оптимальних умов присутності мікроорганізмів. Розвиток мікроорганізмами іншого економа супроводжується модифікацією комплексу фенотипічних ознак під впливом певних умов навколишнього середовища з накопиченням агресивних біопрофілів.

3.3. Алгоритм лабораторної діагностики ентерококових інфекцій

Довгий час ентерококи не привертали серйозної уваги, оскільки вважалися клінічно не важливими мікроорганізмами. Однак останніми роками їх все частіше виділяють з клінічних матеріалів через патологічні стани різної локалізації [84]. Обґрунтувати етіологічну роль ентерококів, виділених при гнійно-септичних інфекціях, є складним завданням, особливо при виділенні їх з нестерильних вогнищ. Важливим аргументом, що підтверджує патогенну роль ентерококів у розвитку патологічних процесів є наявність патогенних факторів у мікроорганізмів.

Для визначення клінічно значущих ентерококів ми запропонували наступний алгоритм лабораторної діагностики:

а) 1 день – посів клінічного матеріалу.

Для первинного посіву клінічних матеріалів рекомендується використовувати ентерококовий агар. Після інкубації протягом (24–48) годин середовищі *Enterococcus* колонії мікроорганізмів роду *Enterococcus*

набувають правильну округлу форму, гладку і опуклу поверхню, а також однорідні рівні краї.

Посів на ентерококовий агар дозволяє провести попередню диференціацію їх на види *E. faecalis* та *E. faecium*. Так, розмір колоній *E. faecalis* становить близько 1 мм в діаметрі, але на відміну від них, колонії *E. faecium* більші за розміром (1,5 мм в діаметрі і більше). Колонії *E. faecalis* характеризуються бордовим кольором іноді з металевим блиском. Колонії *E. faecium* – рожевого кольору, з більш насиченим кольором центром, світлим краєм та без металевих блисків. Крім цього, перевагою ентерококагару є інгібіція росту супутньої мікрофлори, що обумовлено наявністю в середовищі азиду натрію.

б) 2–3 дні – виділення і гемоліз чистих культур, визначення протеолітичної активності і скринінг стійкості до ванкоміцину.

Для цього ми пропонуємо чашку Петрі з 4 секторами з наступним живильним середовищем (рис. 3.10):

- 1) м'ясо-пептонний агар для накопичення чистої культури для подальшого визначення клінічно значущої чутливості ентерококів до антибіотиків,
- 2) м'ясо-пептонний агар з додаванням знежиреного молока для визначення протеолітичної активності,
- 3) кров'яний агар для визначення і подальшої ідентифікації гемолітичної активності
- 4) з додаванням ванкоміцину в серцево-мозковий агар (6 мг/дм³).

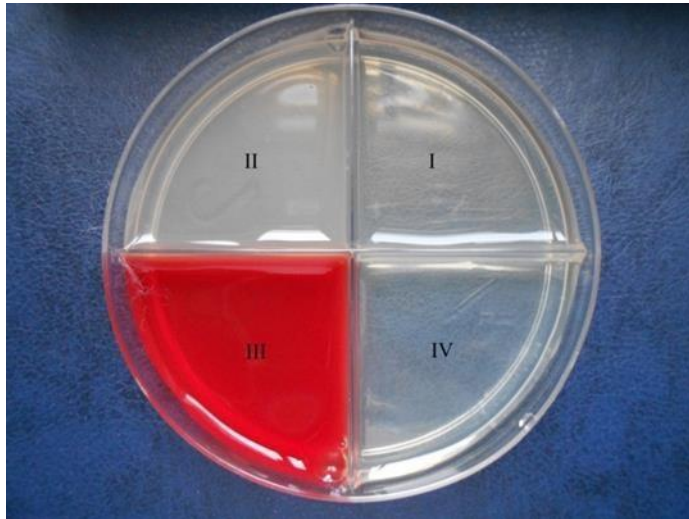


Рис. 3.10 – 4-секторна чашка Петрі для визначення клінічно значущих ентерококів

Примітка:

1. I – середовище для накопичення чистої культури;
2. II – середовище для визначення протеолітичної активності;
3. III – середовище для визначення гемолітичної активності;
4. IV – середовище для скринінгу стійкості до ванкоміцину.

в) 3 - 4 дні – результати протеолітичної та гемолітичної активності, визначення стійкості до ванкоміцину, постановка проведення тесту EN-COCCUStest для видової ідентифікації ентерококів та визначення чутливості до антибіотиків для клінічно значущих штамів.

На зображенні 3.11 надано приклад росту штаму, резистентного до ванкоміцину, але без гемолітичної та казеїназної активності.



Рис. 3.11 – Ріст штамів на 4-х секторній чашці *E. faecium* 1991/1

Примітка:

1. *E. coli* ATCC 25922 (початок теоретичної роботи - негативний контроль для визначення казеїназної активності);
2. *P. aeruginosa* ATCC 27853 (початок теоретичної роботи - позитивний контроль для визначення казеїназної активності);
3. *E. faecium* 1991/1;
4. *E. faecium* 1991/1;
5. *E. faecalis* ATCC 29212 (негативний контроль – чутливий до ванкоміцину штам);
6. *E. faecium* 113 (позитивний контроль – стійкий до ванкоміцину штам);
7. *E. faecium* 1991/1.

На рисунку 3.12 надано приклад росту штаму з казеїназної активності, чутливого до ванкоміцину, без гемолітичної активності.



Рис. 3.12 – Ріст штамів на 4-секторній чашці *E. faecalis* 24/u

Примітка:

1. *E. coli* ATCC 25922 (початок теоретичної роботи негативний контроль для визначення активності казеїнази);
2. *P. aeruginosa* ATCC 27853 (теоретичної роботи позитивний контроль для визначення ативності казеїнази);
3. *E. faecalis* 24/u;
4. *E. faecalis* 24/u;
5. *E. faecalis* ATCC 29212 (негативний контроль – чутливий до ванкоміцину штам);
6. *E. faecium* 113 (позитивний контроль – стійкий до ванкоміцину штам);
7. *E. faecalis* 24/u.

На рисунку 3.13 показаний приклад росту штаму з гемолітичною активністю, чутливого до ванкоміцину, без активності казеїнази.



Рис. 3.13 – Ріст штамів на 4-секторній чашці *E. faecalis* 4/u

Примітка:

1. *E. coli* ATCC 25922 (початок теоретичної діяльності негативний контроль для визначення казеїназної активності);
2. *P. aeruginosa* ATCC 27853 (теоретичної діяльності позитивний контроль для визначення казеїназної активності);
3. *E. faecalis* 4/u;
4. *E. faecalis* 4/u;
5. *E. faecalis* ATCC 29212 (негативний контроль – чутливий до ванкоміцину штам);
6. *E. faecium* 113 (позитивний контроль – стійкий до ванкоміцину штам);
7. *E. faecalis* 4/u.

Реалізація запропонованого нами алгоритму дозволяє виявити клінічно значущі ентерококи і допомагає знизити фінансові витрати лабораторії, що особливо важливо для невеликих і середніх лабораторій з обмеженою кількістю тестів. Живильне середовище, яке пропонуємо, доступне в звичайних бактеріологічних лабораторіях і виробляється в Україні.

3.4. Результати патогенотипування мікроорганізмів роду *Enterococcus* різного походження

3.4.1 Результати ПЛР-детекції генів патогенності у ентерококів, виділених від хворих на нейрохірургічну патологію

Аналізуючи дані генів патогенності ентерококів *E. faecium*, виділених з ліквора і крові хворих пацієнтів на нейрохірургічну патологію, виявлено відсутність гена *asa1* у всіх штамів (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Результати патогенотипування штамів ентерококів *E. faecium*, ізольованих від хворих на нейрохірургічну патологію ($n = 8$)

Комбінація генів патогенності							
<i>asa1</i>		-	-	-	-	-	-
<i>esp</i>		+	+	-	+	-	-
<i>gelE</i>		+	+	+	+	+	-
<i>cylA</i>		+	-	+	-	-	-
<i>hyl</i>		-	+	+	-	-	-
Штам	Абс.	1	1	1	1	2	2
	М ± m %	12,5 ± 11,7	12,5 ± 11,7	12,5 ± 11,7	12,5 ± 11,7	25,0 ± 15,3	25,0 ± 15,3

Ген *cylA* був виявлений у 2 з 8 штамів, що складало $(25,0 \pm 15,3) \%$, було визначено, у 2 ген – *hyl*, у 3 ген $(37,5 \pm 17,1) \%$ – *esp*. У більшості клінічних штамів *E. faecium*, було визначено ген *gelE*, як і у попередніх дослідженнях. Таким чином було встановлено, що ген виявлений у 6 з 8 досліджених штамів складає $(75,0 \pm 15,3) \%$. Встановлено комплекс з 2 - 3 генів патогенності у половини клінічних штамів *E. faecium*, а у 2-х штамів

($25,0 \pm 15,3$) %, що виділених з крові і спинно-мозкової рідини, патогенних генів виявлено не було.

У всіх досліджених штамів, що були вилучені з патологічного матеріалу (сечі та спинномозкової рідини) і поверхні трахеостоми у пацієнтів з нейрохірургічною патологією. Було виявлено відсутність гену *hyl* у ентерококів виду *E. faecalis*, при аналізі даних з виявлення патогенних генів (табл. 3.6). У більшості штамів *E. faecalis* виявлено ген *gelE*, що відповідає за синтез протеолітичних ферментів (казеїнази, желатинази і т.п.). Отже, число штамів з *gelE* склало 7, що еквівалентно ($87,5 \pm 11,7$) %. Ген *esp* був виявлений у 6 штамів ($75,0 \pm 15,3$) %, а ген *asa1* у 4, що еквівалентно ($50,0 \pm 17,7$) %.

Таблиця 3.6

Результати патогенотипування штамів ентерококів *E. faecalis*, ізольованих від хворих на нейрохірургічну патологію ($n = 8$)

Комбінація генів патогенності					
<i>asa1</i>		+	+	-	-
<i>esp</i>		+	+	+	-
<i>gelE</i>		+	-	+	+
<i>cylA</i>		+	-	-	-
<i>hyl</i>		-	-	-	-
Штами	Абс.	3	1	2	2
	М $\pm$ m%	$37,5 \pm 17,1$	$12,5 \pm 11,7$	$25,0 \pm 15,3$	$25,0 \pm 15,3$

У 3 клінічних штаммах ($37,5 \pm 17,1$) % *E. faecalis*, на відміну від *E. faecium*, визначено комплекс з 4 генів патогенності: *asa1*, *gelE*, *cylA* та *esp*. У 3 штамів *E. faecalis* ($37,5 \pm 17,1$) %, було визначено також комплекс, що складався з 2 генів патогенності. У 2 штамів виявлено, по одному гену патогенності (*gelE*).

Отже, в результаті аналізу результатів патогенетичного визначення 5 патогенних генів, виділених у пацієнтів з НХП. У штамі *E. faecalis* були ідентифіковані гени *gelE*, *asa1*, *esp* та *cylA*, що дозволило встановити, що їх співвідношення склало 87,5 %, 50,0 %, 75,0 % і 37,5 % відповідно.

Було ідентифіковано, що у штамів *E. faecium*, відокремлених від хворих на НХП, визначено гени *gelE*, *esp*, *cylA* і *hyl*, питома вага яких складала відповідно 75,0 %, 37,5 %, 25,0 % і 25,0 %. У 2 штамів (25,0) %, виділених з крові і спинномозкової рідини пацієнтів з НХП, патогенних генів не було виявлено.

У клінічних штамів ентерококів найчастіше виявляється ген патогенності *gelE*, незалежно від екотопу виділення. Ген *gelE* зустрічається у 90,1 % *E. faecalis* і 55,5 % *E. faecium*. Ген *gelE* не виявлено, в ентерококів *E. faecium*, ізольованих з кишечника здорових людей.

Слід зазначити, що кількість патогенних генів у геномі 1 штаму змінювалося з 4 до 1. Штам *E. faecali*, виділений з спинномозкової рідини, містить найбільш патогенних генів.

3.4.2. Результати ПЛР-детекції генів патогенності у ентерококів виділених від хворих на ГКІ

При аналізі даних, отриманих методом ПЛР виявлення патогенних генів ентерококів, виділених від пацієнтів з ГКІ, виділили їх відмінності в залежності від типу ентерококів (табл. 3.7). Так штам *E. faecium*, як серед ізольованих від хворих пацієнтів, так і у групі порівняння, генів *asa1* і *cylA* не було знайдено. Одержані результати вивчення узгоджуються з результатами дослідження патогенних генів з *E. faecium* з іншими вченими. Згідно з досліджень яких у ентерококів цього виду визначається в основному гени *esp*, *hyl* [43]. Значною відмінністю клінічних штамів *E. faecium* у дослідженні є присутність гену *gelE* у більшості штамів. Штам, виділений з кишечника у здорової людини, не має *gelE*. Було виявлено, що в двох клінічних штамів з шести, що складає $(33,3 \pm 19,1) \%$, відповідає комбінації з двох генів: *esp* та *hyl*.

Таблиця 3.7

Результати патогенотипування штамів ентерококів, ізолюваних від хворих на ГКІ

Комбінація генів патогенності		<i>esp</i>	<i>hyl</i>	<i>asa1</i>	<i>cylA</i>	<i>gelE</i>	<i>esp, hyl</i>	<i>gelE, hyl</i>	<i>asa1, gelE, cylA</i>
<i>E. faecium</i> i <i>E. faecalis</i> , вилучені від хворих на ГКІ (n = 10)	<i>E. faecium</i> (n = 6)	2 (33,3 %)	2 (33,3 %)	0	0	4 (66,7 %)	2 (33,3 %)	0	0
	<i>E. faecalis</i> (n = 4)	0	1 (25,0 %)	1 (25,0 %)	0	4 (100,0 %)	1 (25,0 %)	1 (25,0 %)	0
<i>E. faecium</i> i <i>E. faecalis</i> , вилучені від здорових (n = 11)	<i>E. faecium</i> (n = 7)	4 (57,1 %)	2 (28,6 %)	0	0	0	1 (14,3 %)	0	0
	<i>E. faecalis</i> (n = 4)	0	0	1 (25,0 %)	1 (25,0 %)	1 (25,0 %)	1 (25,0 %)	0	0

Аналізуючи дані, одержані при виявленні патогенних генів у ентерококів виду *E. faecalis*, ізолюваних з кишечника пацієнтів на ГКІ та з групи порівняння, слід відмітити, що у всіх клінічних штамів виявлено ген *gelE*, що кодує протеолітичні ферменти (табл. 3.7). Серед ентерококів *E. faecalis*, що ізолювано від здорових лише у одного штаму було визначено ген *gelE*, що може свідчити про потенційну небезпеку цього штаму.

Висновки до розділу 3

В результаті проведеного аналізу результатів дослідження нами було встановлено відмінності в видовому складі мікробної популяції ентерококів. Види *E. faecium* та *E. Faecalis* в основному виділялися з патологічного матеріалу від пацієнтів з НХП після хірургічного втручання з частотою 18 ($51,43 \pm 8,0$) % і 12 ($34,29 \pm 7,8$) % відповідно. Серед ентерококів, виділених із сечі пацієнтів на ІСВШ, переважав вид *E. faecalis* 22 ($85,76 \pm 6,8$) %.

Аналізуючи результати дослідження по вивченню адгезивних властивостей ентерококів, виділених у пацієнтів з НХП, було встановлено, що всі штами характеризувалися високим і середніми адгезивними властивостями.

Статистична обробка показала, що вираженість ознак (ІАМ), що характеризують адгезивні властивості ентерококів, виділених від пацієнтів, була достовірно вищою, ніж у групі порівняння.

Слід зазначити, що при виділенні ентерококів з спинномозкової рідини (ліквор) діапазон ІАМ варіював від 3,3 до 5,8, а з кишечника – від 2,2 до 3,9. Статистичний аналіз показав достовірні відмінності між цими групами.

Середня кількість еритроцитів, що беруть участь адгезії ентерококів, в групі пацієнтів на НХП і контрольній групі достовірно не відрізнявся.

При порівнянні адгезивних властивостей ентерококів, виділених у хворих на НХП і практично здорових людей (в залежності від виду штамму) у ентерококів виду *faecium* експресія ІАМ варіювала від 2,9 до 6,4, а у виду *faecalis* – від 4,5 до 8,2. При порівнянні експресії адгезії в цих групах достовірної різниці між показниками виявлено не було.

Ентерококи, виділені з патологічного матеріалу у пацієнтів з НХП, характеризуються більш високими адгезивними властивостями, ніж штами, виділені з природного середовища – кишечника людини. Ентерококи, виділені у пацієнтів з ІСВШ, характеризуються високими і середніми адгезивними властивостями.

Аналіз результатів нашого дослідження показав, що ентерококи можуть продукувати желатин, але частота виявлення цієї активності залежала від наявності запальних процесів. Кількість желатиназоактивних штамів серед ентерококів, виділених з патологічного матеріалу пацієнтів з НХП, була достовірно вищою, ніж у здорових.

Було проведено аналіз казеїназної активності ентерококів, виділених у пацієнтів з НХП, досліджувані ознаки виявлені у 25 штамів. Експресія казеїназної активності була достовірно вищою у ентерококів виду *faecalis*, виділених від пацієнта з НХП, порівняно з контрольною групою. Між ентерококами інших досліджуваних груп достовірних розбіжностей нами не було виявлено.

Серед ентерококів, виділених у пацієнта з ІСВШ, штамів з желатиназною активністю виявилось майже в 4 рази більше, ніж у групі порівняння. Ентерококи, виділені у пацієнтів з ІСВШ, в основному є *E. faecalis*.

Результати визначення проникнення фібринолітичної активності в ентерококи, виділені від пацієнтів на ІСВШ і здорових людей показали, що фібринолітично активних ентерококів у групі, виділеній від хворих на ІСВШ, було достовірно більше, ніж у групі порівняння.

При аналізі експерсії ентерококів АЛА, взятих у пацієнтів з ІСВШ, було виявлено, що діапазон експресії антилізоцимної активності становить від 1 до 6 мкг/мл. У той же час експресія АЛА у цій групі мікроорганізмів була значно вищою, ніж у штамів, виділених із кишечника здорових людей.

Аналіз наших даних дослідження АЛА в ентерококах, виділених з патологічного матеріалу пацієнтів показав, що проникнення та вираженість цієї активності були вищими у ентерококів, виділених у пацієнтів з НХП і ІСВШ, ніж у ентерококів із групи порівняння.

Отримані нами дані під час проведеного дослідження свідчать про те, що проникаюча гемолітична активність ентерококів, виділених з патологічних речовин у пацієнтів була достовірно вище, ніж в групі

порівняння. При вивченні проникнення гемолітичної активності в штамах ентерококів, ізолюваних у пацієнтів на ІСВШ, більшість штамів характеризувалися фенотипом гемолітичної активності і в той же час β -гемолітичний був виявлений у 14 штамів, а α -гемолітичний - у 1.

При здійсненні аналізу даних генів патогенності ентерококів *E. faecium*, виділених з ліквора і крові хворих пацієнтів на нейрохірургічну патологію, нами виявлено відсутність гена *asa1* у всіх штамів. Було виявлено відсутність гену *hyl* у ентерококів виду *E. faecalis*, при аналізі даних з виявлення патогенних генів. У більшості штамів *E. faecalis* виявлено ген *gelE*, що відповідає за синтез протеолітичних ферментів (казеїнази, желатинази і т.п.).

У клінічних штамах ентерококів найчастіше виявляється ген патогенності *gelE*, незалежно від екотопу виділення. Ген *gelE* зустрічається у 90,1 % *E. faecalis* і 55,5 % *E. faecium*. Ген *gelE* не виявлено, в ентерококів *E. faecium*, ізолюваних з кишечника здорових людей.

Кількість патогенних генів у геномі 1 штаму змінювалося з 4 до 1. Штам *E. faecali*, виділений з спинномозкової рідини, містить найбільш патогенних генів.

Дані, одержані нами при виявленні патогенних генів у ентерококів виду *E. faecalis*, ізолюваних з кишечника пацієнтів на ГКІ та з групи порівняння, свідчать про те, що у всіх клінічних штамів виявлено ген *gelE*, що кодує протеолітичні ферменти. Серед ентерококів *E. faecalis*, що ізолювано від здорових лише у одного штаму було визначено ген *gelE*, що може свідчити про потенційну небезпеку цього штаму.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено відмінності у видовому складі мікробних популяцій ентерококів залежно від їх походження. Види *E. faecium* та *E. faecalis* були виділені в основному з патологічного матеріалу від пацієнтів з НХП після хірургічного втручання з частотою 18 ($51,43 \pm 8,0$) % і 12 ($34,29 \pm 7,8$) % відповідно. Серед ентерококів, виділених з сечі пацієнтів на ІСВШ переважають вид *E. faecalis*, частка якого склала $16(76,2 \pm 10,6)$ %.

2. Встановлено, що проникнення желатиназної, казеїназної, гемолітичної та антилізоцимної активності у клінічних штамів ентерококів становило 50,0 %, 79,7 %, 57,8 % та 93,8 % відповідно. Всі штами ентерококів мали помірний і високий рівень адгезії, тоді як ентерококи, видалені при патологічних станах, ймовірно, характеризувалися більш високим ступенем адгезії.

3. Доведено, що кожна екологічна ніша рослинності характеризується набором бактеріальних фенотипів ентерококів з переважанням певного біологічного профілю. Домінуючий фенотипічний варіант штаму ентерококів, виділений при гнійно-запальних захворюваннях, характеризувався більш вираженою агресивністю біологічного профілю з широкою експресією виявлених патогенних факторів.

4. У штаму *E. faecalis*, що був ізольований від пацієнтів з НХП, ідентифіковані гени *gelE*, *asa1*, *esp* та *cylA*, їх відсоткове співвідношення склало 87,5 %, 50,0 %, 75,0 % та 37,5 % відповідно. Патогенні гени були ідентифіковані у штамів *E. faecalis* (виділений з кишечника): *gelE*, *asa1*, *esp*, *cylA*, і *hly* він становить 90,0 %, 65,0 %, 40,0 %, 15,0 % і 10,0 % відповідно.

5. У штаму *E. faecium*, ізольованого від пацієнтів з НХП, ідентифіковано гени *gelE*, *esp*, *cylA* і *hly*, і їх питома вага складала 75,0 %, 37,5 %, 25,0 % та 25,0 % відповідно. У 2 штамі, 25,0 % виділених з крові і ліквору пацієнтів з НХП, патогенність виявлена не була.

6. Кількість патогенних генів в геномі одного штаму варіювала від 4 до 1. Виділений з спинномозкової рідини штам *E. faecalis* містив найбільше патогенних генів.

7. Було встановлено, що патогенні гени *gelE* найбільш часто виявляються у клінічних штаммах ентерококів, незалежно від екотопу виділення. Ген *gelE* знайдено у 90,1 % *E. faecalis* та 55,5 % *E. faecium*. В ентерококів *E. faecium*, ізольованих з кишечника здорових людей, ген *gelE* не був виявлений.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Willems R. J. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2011. № 35. P. 872–900.
2. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study / H. Wisplinghoff et al. *Clinical Infectious Diseases*. 2004. Vol. 39, № 3. P. 309–317.
3. Sood S., Malhotra M., Das B. K. Enterococcal infection and antimicrobial resistance. *Indian Journal Medical Research*. 2008. № 128. P. 111–121.
4. Sreeja S., Babu S., Prathab P. The Prevalence and the Characterization of the Enterococcus Species from Various Clinical Samples in a Tertiary Care Hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2012. Vol. 6(9). P. 1486–1488.
5. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of Enterococcus faecium endocarditis / E. Heikens et al. *Microbes Infection*. 2011. № 13. P. 1185–1190.
6. Munita J., Arias C., Murray B. Enterococcal endocarditis: can we win the war? *Current infectious disease reports*. 2012. № 14(4). P. 339–349.
7. Nallapareddy S. R., Singh K. B., Murray B. E. Contribution of the Collagen Adhesin Acm to Pathogenesis of Enterococcus faecium in experimental endocarditis. *Infection and Immunity*. 2008. Vol. 76(9). P. 4120–4128.
8. Enterococcus durans endocarditis in a patient with transposition of the great vessels / S. Stepanovic et al. *Journal of Medical Microbiology*. 2004. № 53. P. 259–261.
9. Analysis of the structure of the Pyogenic microflora heart hospital / J. N. Maslov et al. *Journal of Microbiology, epidemiology and Immunobiology*. 2011. № 6. P. 80–85.
10. Guidelines for the diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: a report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy / F. Kate Gould et al. *J Antimicrob Chemother*. 2012. № 67. P. 269–289.

11. Gelatinase Contributes to the Pathogenesis of Endocarditis Caused by *Enterococcus faecalis* / L. R. Thurlow et al. *Infection Immunity*. 2010. № 78(11). P. 4936–4943.
12. A sustained hospital outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia due to emergence of vanB E. faecium sequence type 203 / P. D. Johnson et al. *Journal of Infectious Diseases*. 2010. № 202. P. 1278–1286.
13. Hallgren A., Lindqvist M. Enterococcal endocarditis among intravenous drug users: Report of a cluster of cases, possibly caused by contaminated amphetamine. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2011. Vol. 43, № 5. P. 395–398.
14. Bacteriological Profile and Antimicrobial Resistance of Blood Culture Isolates from a University Hospital / A. Garg et al. *Indian Academy of Clinical Medicine*. 2007. Vol. 8(2). P. 139–143.
15. Treatment of dialysis catheter-related *Enterococcus* bacteremia with an antibiotic lock: a quality improvement report / W. J. Peterson et al. *American Journal of Kidney Diseases*. 2009. № 53(1). P. 107–111.
16. Contribution of individual Ebp Pilus subunits of *Enterococcus faecalis* OG1RF to pilus biogenesis, biofilm formation and urinary tract infection / Jouko Sillanpaa et al. *PLOS one*. 2013. № 8(7). P. 68813.
17. Singh K. V., Murray B. E. Efficacy of ceftobiprole Medocaril against *Enterococcus faecalis* in a murine urinary tract infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012. № 56(6). P. 3457–3460.
18. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals / D. Panesso et al. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010. № 48. P. 1562–1569.
19. Olawale K. O., Fadiora S. O., Taiwo S. S. Prevalence of hospital acquired enterococci infections in two primary-care hospitals in Osogbo, Southwestern Nigeria. *African Journal of Infectious Diseases Home*. 2011. Vol 5(2). P. 365–378.
20. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium* induced urinary tract infection in mice / M. Leendertse et al. *Journal of Infectious Diseases*. 2009. № 200. P. 1162–1165.

21. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates / V. Vankerckhoven et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. Vol. 74, № 14. P. 4247–4255.
22. Chaudhary U., Shamma M., Yadav A. Antimicrobial Susceptibility Patterns of Common and Unusual *Enterococcus* species Isolated from Clinical Specimens. *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*. 2007. № 24. P. 55–62.
23. Sinilcumar L., Jayakumar K. Prevalence of *Enterococcus* species from various clinical specimen in shri sathya sai medical college and research institute with special reference to speciation and their resistance to vancomycin. *International Journal of Medical and Clinical Research*. 2012. Vol. 3, № 4. P. 154–160.
24. Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen / P. M. Giridhara et al. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2009. № 27(4). P. 301–305.
25. Bonten M. J., Willems R. J. Vancomycin-resistant *Enterococcus*-chronicle of a foretold problem. *Ned Tijdschr Geneeskde*. 2012. № 156(38). P. 5233.
26. Intravenous Mouse Infection Model for Studying the Pathology *Enterococcus faecalis* Infections / C. Gentry-Weeks et al. *Infection and Immunity*. 2003. Vol. 71, № 3. P. 1434–1441.
27. Мікробіологічна діагностика ранової інфекції у постраждалих з відкритими переломами кісток гомілки / В. Т. Шевченко та ін. *Лабораторна діагностика*. 2006. № 2(36). С. 62–65.
28. Ntziora F., Falagas M. E. Linezolid for the treatment of patients with central nervous system infection. *Annals of Pharmacotherapy*. 2007. № 41(2). P. 296–308.
29. Post-surgical enterococcal meningitis: Clinical and epidemiological study of 20 cases / R. Guardado et al. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2006. Vol. 38(8). P. 584–588.

30. Top J., Willerns R., Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2008. Vol. 52, № 3. P. 297–308.
31. Arias C. A., Contreras G. A., Murray B. E. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010. Vol. 16. P. 555–562.
32. Sava I. G., Heikens E., Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010. Vol. 16, № 6. P. 533–540.
33. Filipová M., Bujdakova H. Factors of virulence and mechanisms of resistance to aminoglycosides in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* with high-level gentamicin resistance. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 2005. Vol. 54, № 2. P. 65–74.
34. Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island / P. S. Coburn et al. *Molecular Microbiology*. 2007. № 63. P. 530–544.
35. Schaik W. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics*. 2010. № 11. P. 239–246.
36. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits / J. M. Mansona et al. *PNAS*. 2010. Vol. 107, № 27. P. 12269–12274.
37. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity / H. Leavis et al. *Journal of Bacteriology*. 2004. Vol. 186, № 3. P. 672–682.
38. Shankar N., Baghdayan A. S., Gilmore M. S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*. 2002. № 417. P. 746–750.
39. Waters C. M., Wells C. L., Dunny G. M. The aggregation domain of aggregation substance, not the RGD motifs, is critical for efficient internalization by HT-29 enterocytes. *Infection and Immunity*. 2003. № 71. P. 5682–5689.

40. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. / S. D. Sussmuth et al. *Infection and Immunity*. 2000. № 68. P.4900–4906.
41. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst / S. D. Sussmuth et al. *Infection and Immunity*. 2000. № 68. P.4900–4906.
42. Hirt H., Schlievert P. M., Dunny G. M. In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromone-sensing system of pCF10. *Infection and Immunity*. 2002. №70. P.716–723.
43. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium* / V. Vankerckhoven et al. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. № 42(10). P. 4473–4479.
44. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein / V. Shankar et al. *Infection and Immunity*. 1999. № 67(1). P. 193–200.
45. Woodford N., Soltani M., Hardy K. J. Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. *Lancet*. 2001. Vol. 358. P. 584–589.
46. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis / E. Heikens et al. *Microbes and Infection*. 2011. Vol. 13. P. 1185–1190.
47. Diversity of the *fsr-gelE* Region of the *Enterococcus faecalis* Genome but Conservation in Strains with Partial Deletions of the *fsr* Operon / R. J. Galloway-Peña et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. Vol. 77, № 2. P. 442–451.

48. Gelatinase Contributes to the Pathogenesis of Endocarditis Caused by *Enterococcus faecalis* / L. R. Thurlow et al. *Infection and Immunity*. 2010. № 78(11). P. 4936–4943.
49. Strzelecki Y., Hryniewicz W., Sadowy E. Gelatinase-Associated Phenotypes and Genotypes Among Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis* in Poland. *Polish Journal of Microbiology*. 2011. Vol. 60, № 4. P. 287–292.
50. Billström H. The Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008. Vol. 32(5). P. 374–377.
51. Giridhara P. M., Umapathy B. L., Ravikumar K.L. Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *enterococcus faecalis*. *Journal of Laboratory Physicians*. 2010. № 2(2). P. 100–104.
52. Teixeira N., Santos S., Hancock P. The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal. *Microbiology*. 2012. № 158. P. 519–528.
53. The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosintesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal / N. Teixeira et al. *Microbiology*. 2012. № 158. P. 519–528.
54. The Fsr Quorum-Sensing System of *Enterococcus faecalis* Modulates Surface Display of the Collagen-Binding MSCRAMM Ace through Regulation of gelE / L. D. Kenneth et al. *Journal of Bacteriology*. 2011. Vol. 193, № 17. P. 4317–4325.
55. Virulence Factors of *Enterococcs faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains isolated from Humans and Pets / T. Gulhan et al. *Turk. Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2006. Vol. 30. P. 477–482.
56. Fisher K., Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Mycrobiology*. 2009. № 155. P. 11749–1757.

57. Siamycin Attenuates fsr Quorum Sensing Mediated by gelatinase Biosynthesis – Activating Pheromone in *Enterococcus faecalis* / J. Nakayama et al. *Journal of bacteriology*. 2007. Vol. 189, № 4. P. 1358–1365.
58. Global spread of the hyl(Efm) colonization-virulence gene in megaplasms of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluste / A. R. Freitas et al. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010. № 54(6). P. 2660–2665.
59. A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a hyl_(Efm) genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates / J. A. Laverde Gomez et al. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011. № 301(2). P. 165–175.
60. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hyl_{Efm}-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium* / C. A. Arias et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009. № 53(10). P. 4240–4246.
61. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model / L. B. Rice et al. *Journal of Infectious Diseases*. 2009. № 199(3). P. 342–349.
62. The hyl_{Efm} gene in pHyl_{Efm} of *Enterococcus faecium* is not required in pathogenesis of murine peritonitis / D. Panesso et al. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/20> (Date of access: 23.11.2024).
63. Sinilcumar L., Jayakumar K. Prevalence of *Enterococcus* species from various clinical specimen in shri sathya sai medical college and research institute with special reference to speciation and their resistance to vancomycin. *International Journal of Medical and Clinical Research*. 2012. Vol. 3, № 4. P. 154–160.
64. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals / D. Panesso et al. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010. № 48. P. 1562–1569.
65. Willems R. J., Schaik L. W. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiology*. 2009. Vol. 4. P. 1125–1135.
66. Макромікроскопічні зміни у нирках лабораторних щурів у нормі, за умов імунокомпрометації та ентерококової інфекції / І. І. Торяник та ін. *Annals of*

- Mechnikov Institute*. 2014. № 2. P. 70-74. URL: https://www.imiamn.org.ua/journal/2_2014/PDF/15.pdf (Date of access: 21.11/2024).
67. Cattoir V., Giard J. C. Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2014. Vol. 12(2). P. 239–248.
 68. Cattoir V., Leclercq R. J. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *Antimicrob Chemother*. 2013. Vol. 68(4). P. 731–742.
 69. Antimicrobial resistance in Europe. URL: [//www.rivm.nl/earss](http://www.rivm.nl/earss) (Date of access: 21.11/2024).
 70. Rezvan M. Enterococcus Resistance to Linezolid without History of Use. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2014. Vol. 24(109). P. 84–91.
 71. Improving linezolid use decreases the incidence of resistance among Gram-positive Microorganisms / E. Ramirez et al. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013. Vol. 41(2). P. 174–178.
 72. Бактеріологічний контроль поживних середовищ : інформ. лист / МОЗ України № 05.4.1/1670. Київ, 2001. 4 с.
 73. Методи виділення і ідентифікації ентерококів : метод. рек. / уклад. О. І. Поліщук та ін. Київ, 2009. 24 с.
 74. Стандартизація приготування мікробних суспензій : інформ. лист / Ю. Л. Волянський та ін. Київ : Укрмедпатентінформ, 2006. 7 с.
 75. Штам *Enterococcus durans* 43-Д для використання в тест-системах для видової ідентифікації ентерококів за біохімічними ознаками : пат. на корисну модель № 70576. № u2010 06008 ; заявл. 18.05.2010 ; опубл. 25.06.2012, Бюл. № 12. 4 с.
 76. Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» : Наказ МОЗ України від 05.04.2007 р. № 167. Київ : МОЗ України, 2007. 51 с.
 77. Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase / R. K. Saiki et al. *Science*. 1988. Vol. 239. P. 487–491.

78. Мироненко Л. Г., Перетятко О. Г. Протеолітична активність ентерококів, вилучених з вмісту трофічних виразок хворих на цукровий діабет. *Лабораторна діагностика*. 2008. № 1. С. 67–70.
79. Siamycin Attenuates fsr Quorum Sensing Mediated by gelatinase Biosynthesis – Activating Pheromone in *Enterococcus faecalis* / J. Nakayama et al. *Journal of bacteriology*. 2007. Vol. 189, № 4. P. 1358–1365.
80. Full activation of *Enterococcus faecalis* Gelatinase by a C–Terminal Proteolytic Cleavage / M. F. Del Papa et al. *Journal of Bacteriology*. 2007. Vol. 189, № 24. P. 8835–8843.
81. Full activation of *Enterococcus faecalis* Gelatinase by a C–Terminal Proteolytic Cleavage / M. F. Del Papa et al. *Journal of Bacteriology*. Vol. 189, № 24. P. 8835–8843.
82. Мироненко Л. Г., Перетятко О. Г. Антилізоцимна активність *E. faecalis*, вилучених у хворих на цукровий діабет. *Шпитальні інфекції: сучасний стан проблеми* : матеріали наук.-практ. конф., м. Харків, 11-12 груд. 2008 р. Харків, 2008. С. 47.
83. Біологічні властивості ентерококів, виділених при бактеріальних уретритах та простатитах / О. І. Поліщук та ін. *Лабораторна діагностика*. 2007. № 3(41). С. 44–47.
84. Sood S., Malhotra M., Das B. K. Enterococcal infection and antimicrobial resistance. *Indian Jurnal Med. Res.* 2008. № 128. P. 111–121.
85. Clonal Structure of *Enterococcus faecalis* Isolated from Polish Hospitals Characterization of Epidemic Clones / M. Kawalec et al. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007. Vol. 45, № 1. P. 147–153.
86. Kayaoglu G. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to Endontic Disease. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 2004. № 15(5). P. 308–320.
87. Медведєва І. М., Дмитрук С. М., Дмитрук С. А. Мікробіологічний моніторинг і антибіотико резистентність мікроорганізмів, виділених у новонароджених дітей. *Лабораторна діагностика*. 2006. № 3(37). С. 51–55.

88. Мікробіологічна діагностика раневої інфекції у постраждалих з відкритими переломами кісток гомілки / В. Т. Шевченко та ін. *Лабораторна діагностика*. 2006. № 2(36). С. 62–65.
89. Яновська В. В. Біологічні властивості ентерококів як збудників запальних процесів сечовивідних шляхів : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України». Харків, 2009. 24 с.
90. Перетятко О. Г. Гетерогенність за факторами патогенності та антибіотикочутливості мікроорганізмів роду *Enterococcus*, вилучених з різних біотопів: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України». Харків, 2009. 24 с.
91. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy / D. N. Gilbert et al. 40th ed. Sperryville : Antimicrobial Therapy, 2010. 220 p.
92. Co-transfer of *vanA* and aggregation substance genes from *Enterococcus faecalis* isolates in intra- and interspecies matings / C. Paoletti et al. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007. Vol. 59. P. 1005–1009.
93. Noble W. C., Virani Z., Cree R. G. A. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *E. faecalis* NCTC 12201 to *S. aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. № 93. P. 195–198.

ДОДАТКИ

Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція : матеріали VII науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, м. Харків, 14 листопада 2024 р.

PATHOGENIC POTENTIAL OF ENTEROCOCCI

**Tishchenko I. Yu.¹, Peretyatko O. H.², Filimonova N. I.¹, Dubinina N. V.¹,
Teslenko D. O.¹**

¹*National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine;*

²*State Organization "Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology",
Kharkiv, Ukraine*

microbiology@nuph.edu.ua

Introduction. Pathogenicity as an integral characteristic of infectious agents is a polydeterminant property of microorganisms, which reflects their ability to form endogenous sources of infections, colonize organs and tissues, and initiate a pathological process in them. This ability is determined not by one, but by a complex of phenotypic characteristics, in other words, by their bioprofile. For many microbes, for example, for *Escherichia coli* (*E. coli*), the signs that characterize their persistence (antilysozyme activity, anticomplementary activity etc.) and are responsible for the survival of bacteria in the presence of effectors of the macroorganism's immunity are highly diagnostically informative.

Significant qualitative and quantitative changes in the structure of infectious pathology are largely associated with changes in the pathogenicity of bacteria at the genetic level. Currently, the greatest importance is given to structural and regulatory genes that determine the pathogenicity of bacteria and are grouped into mobile clusters - "islands of pathogenicity", which contain genes that determine the key stages of interaction with the macroorganism.

Some scientists believe that changes in pathogenicity, which occur according to this mechanism, lead to the formation of pathogenic variants of opportunistic microorganisms. The mobile nature of these genetic elements and the possibility of horizontal and vertical transfer to other strains was established, which largely dictates the nature and direction of selection in the processes of adaptive evolution of bacteria.

Revision of the assessment of the role of enterococci in the pathogenesis of enterococcal infections was facilitated by the discovery of pathogenicity factors in them. However, this issue is not fully explored. The main argument in favor of their pathogenetic role is the high frequency of detection of pathogenicity factors in strains isolated during infectious processes, and their almost complete absence in strains isolated from the intestines of healthy individuals and from environmental objects. In connection with the growing etiopathogenetic significance of *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) in the general structure of enterococcal infections, the interest of researchers in the detailed study of the pathogenic potential of this species of enterococci is also growing.

Aim. To analyze modern studies devoted to the study of pathogenicity of enterococci and the mechanisms of its formation.

Materials and methods. Analysis of modern scientific research and literary sources in the field of bacteriology, clinical microbiology, genetics, pathophysiology and infectious diseases.

Results and their discussion. In the composition of the genome of enterococci, "islands of pathogenicity" associated with DNA fragments, which include discrete

Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція : матеріали VII науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, м. Харків, 14 листопада 2024 р.

genes of pathogenicity, which determine the key stages of interaction with the macroorganism, including adhesion, production of proteolytic enzymes, and the ability to resist factors of nonspecific resistance, were found. On the "islands of pathogenicity" in enterococci, a complex of cytolysin genes *cyl* (*cyl* A, B, M), adhesin gene *esp*, protease gene *spr*, bile acid hydrolases and many genes with an unknown function were found.

Factors of pathogenicity responsible for the beginning of the infectious process (for adhesion and colonization of the pathogen) include aggregating substance, surface proteins, and surface polysaccharides. Aggregating substance (AS), which ensures adhesion of enterococci to various biological structures of barrier tissues during invasion, consists of a group of surface proteins encoded on a pheromone-inducing plasmid. Some scientists believe that not all strains of *E. faecium* are capable of producing AS, according to other researchers, the *asa1* gene is rarely found in enterococci of this species.

Enterococcal surface protein encoded by the *esp* gene was first discovered in *E. faecalis* in 1999, and two years later in *E. faecium*. It should be emphasized that the role of the *esp* gene in the pathogenesis of enterococcal infections has not been fully elucidated. It is known that the *esp* gene determines the adhesion and colonization of enterococci and allows avoiding the influence of effectors of the immunological response.

Research Vankerckhoven V. et al. showed that the number of strains with the *esp* gene is higher among VRE *E. faecium* than VSE strains of this type of enterococci (77% vs. 5%, respectively). Some scientists, based on the high prevalence of the *esp* gene among clinical strains compared to intestinal strains, suggest its possible role in the pathogenesis of enterococcal infections. Although adhesins of enterococci are also needed when they colonize natural habitats.

Virulence factors also include proteolytic enzymes (gelatinase, caseinase, collagenase, elastase), which contribute to the intercellular spread of bacteria in the host's body. The most studied proteolytic enzymes of enterococci are gelatinase and serine protease. Enterococcal protease is an extracellular metalloprotease that hydrolyzes gelatin, casein, hemoglobin and other bioactive peptides and is encoded by an *agr*-linked autoregulatory gene, strains carrying this gene have high virulence.

It is known that protease of enterococci is detected more often in strains extracted from clinical material than from healthy individuals. Researchers believe that the production of gelatinase and serine protease is a quorum-dependent process that regulates the expression of these pathogenicity factors. Research in recent years has shown that gelatinase plays a significant role in the formation of biofilms of enterococci of the *faecalis* species. However, the role of the *gelE* gene of *E. faecalis* has not been fully elucidated, and *E. faecium* remains even less studied.

Cytolysin is the most studied pathogenicity factor of enterococci, some scientists consider it the most important of the known extracellular pathogenicity factors. Cytolysin induces tissue damage, in an experiment on rabbits it was shown that its simultaneous presence with ASA leads to a significant increase in pathogenic potential. It is known that cytolysin can destroy human, ram and horse erythrocytes, polymorphonuclear leukocytes, intestinal epitheliocytes and human retinal cells.

Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція : матеріали VII науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, м. Харків, 14 листопада 2024 р.

Cytolysin is detected with a high frequency in *E. faecalis* strains isolated from infections of different localization. According to some authors, the genes that ensure the production of cytolysin are often detected together with other pathogenicity genes of these bacteria: surface proteins, gelatinase, aggregation substance.

The analysis of the latest scientific publications on the *hyl* gene showed that the gene was first described as encoding hyaluronidase, according to modern ideas it is responsible for the synthesis of glycoside hydrolase. Some researchers found that the *hyl* gene is located on a 145 to 375 Kb plasmid with genes for resistance to glycopeptides. According to other scientists, acquisition of the *hyl_{Efm}* plasmid leads to intestinal colonization and does not depend on the determinant of antibiotic resistance. On the model of experimental peritonitis, it was shown that the acquisition of the *hyl_{Efm}* plasmid by a non-pathogenic variant of enterococcus led to an increase in the virulence of the strain. But the question of the role of this gene in the pathogenesis of enterococcal infections is in the process of comprehensive study.

Conclusions. Thus, the analysis of scientific publications showed that the pathogenicity factors of *E. faecalis* are the most studied, and enterococci of other species are less so. *E. faecalis* has a wider range of virulence determinants compared to *E. faecium*. Previously, it was believed that only *esp* and *hyl* genes are found in the latter. In recent years, publications have appeared, the authors of which claim that the *asa1*, *cyl*, and *gelE* genes have been identified in *E. faecium*. According to the research results of some scientists, the *asa1* gene is absent in *E. faecium*, according to others, the detection of aggregation substance in *E. faecium* is rarely observed.

Therefore, an important direction of research in this area is the study of enterococci pathogenicity factors (FP) at the phenotypic and genetic level and the assessment of the impact of FP on the development of the pathological process. A change in the natural ecological niche, getting into significantly different living conditions leads to the fact that enterococci acquire a number of features that give them certain advantages for survival, and some of these features give them a certain degree of pathogenicity.

However, information on the pathogenicity of enterococci is limited. Comparative analysis of the biological properties and pathogenic potential of enterococci, extracted during pathology from various ecological niches, both sterile (CSF, blood) and non-sterile (intestine, wounds, trophic ulcers, etc.), determination of correlative relationships between individual factors of pathogenicity and place and degree of manifestation of the pathological process will allow to determine the most informative of them to prove the etiological significance of the microorganism. Detection of pathogenicity genes and phenotypic characterization of the expressed pathogenicity factor will allow to judge objectively the etiological role of the isolated enterococcus.

Key words: Enterococci, pathogenicity factors, virulence, discrete pathogenicity genes, pathological process, pathogenesis of enterococcal infections.

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ФІЗИЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ І ЗДОРОВ'Я**



**VII науково-практична internet-конференція
з міжнародною участю**

**«МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ І
ХВОРОБ ТА ЇХ ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ»**

**14 листопада 2024 р.
ХАРКІВ – Україна**

VIRULENCE FACTORS AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF REPRESENTATIVES OF THE GENUS ENTEROCOCCUS

Teslenko D.¹, Tishchenko I.¹, Filimonova N.¹, Dubinina N.¹, Peretyatko O.²

¹*National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine*

²*State Organization "Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology",
Kharkiv, Ukraine*

microbiology@nuph.edu.ua

Introduction. Enterococci are very widespread in nature, being representatives of the normal microbiocenosis in humans and animals. However, in recent decades they have become the subject of close attention of clinical microbiology due to their increasing role in the etiology of nosocomial infections. Enterococci are one of the most common participants in the development of anaerobic-aerobic mixed infections. Being facultative aerobes, they are able to effectively stimulate the growth of obligate anaerobic pathogens, enhancing their virulence potential. Some strains of these microorganisms in the process of evolution have acquired a number of pathogenicity factors and the ability to cause serious infectious diseases with a fairly high mortality rate (over 50%). Serious factors contributing to this are their innate and acquired resistance to widely used antimicrobial drugs. The emergence and spread of enterococcal resistance due to the selective effect of antibiotics on normal microflora in the process of intensive and not always rational antibiotic therapy is a serious clinical and environmental problem of our time. The risk of death of patients from infections caused by vancomycin-resistant enterococci can exceed 70%. Numerous studies have been devoted to this topic in recent years.

Aim. To analyze modern studies devoted to the study of pathogenicity of enterococci and the mechanisms of its formation.

Materials and methods. Analysis of modern scientific research and literary sources in the field of bacteriology, clinical microbiology, genetics, pathophysiology and infectious diseases.

Results and their discussion. Most members of the genus *Enterococcus* are synanthropic microorganisms, but some are opportunistic human pathogens. In clinical material from humans, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gilvus*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. avium* and *E. pallens* are most often encountered. The spectrum of clinical isolates of enterococci demonstrates less species diversity than the species of *Enterococcus spp.* obtained from the environment and other sources. In recent decades, the clinically significant role of two enterococci species, *E. faecalis* and *E. faecium*, as nosocomial pathogens has been clearly observed. Most

enterococcal infections are endogenous and are caused by the invasion of microorganisms during excessive colonization of attachment sites by these bacteria. The possibility of nosocomial infection with a high frequency of use of broad-spectrum cephalosporins has been proven.

Given these facts, antibiotic resistance among some enterococcal species deserves special attention, in particular, resistance to aminoglycosides and cephalosporins or acquired resistance to many other antibiotics (especially vancomycin). Of particular interest is *E. faecium*, which exhibits multidrug resistance to a wide range of antibiotics, as well as *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, and *E. raffinosus*, isolated from patients with enterococcal infections. It has now been established that enterococcal virulence is regulated by virulence-encoding genes located in specific regions of the genome called pathogenicity islands (PAI). The virulence of *Enterococcus spp.* is determined by a number of mechanisms underlying the pathogenesis of the corresponding infectious diseases: the ability to aggregate; the ability to adhere to various extracellular matrix proteins, including thrombospondin, lactoferrin and vitronectin; the ability to form biofilms.

To date, various virulence factors underlying the implementation of pathogenicity mechanisms of enterococcal infections have already been studied. Such pathogenicity factors as the ability to produce hemolysin and gelatinase have been identified. Enterococcal surface protein (ESP) has been discovered and studied; it is a protein associated with the cell wall of a microorganism, more often found in strains that have become pathogenic than in saprophytic enterococci. It has been determined that ESP increases the antibioresistance of *E. faecalis* in the bladder during experimental urinary tract infections.

Aggregate substance (AGG) is a pheromone-induced surface protein of *E. faecalis* that promotes the formation of mating aggregates during bacterial conjugation and mediates effective enterococcal donor-recipient contact for plasmid transfer. Enterococci possessing AGG were found to be significantly more resistant to phagocytosis due to the inhibitory effect on respiratory metabolism in macrophages.

Collagen-binding protein (ACE) is a collagen that binds MSCRAMM (Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule).

Capsular polysaccharides and carbohydrates of the bacterial cell wall are also of interest. The operon encoding the synthesis of capsular polysaccharide is most often found in pathogenic variants of *E. faecalis*. *E. faecalis* isolated from the bloodstream have the ability to produce superoxide, which increases the survival of the

microorganism in mixed infections with *Bacteroides fragilis* in subcutaneous localization.

Conclusions. Enterococci are currently considered to be the leading microorganisms causing both the etiologic factors of hospital-acquired "super-infections" in patients receiving antibiotics. In many countries, vancomycin was used as the drug of choice for the treatment of infections caused by gram-positive bacteria. However, recently, there has been an increase in enterococcal strains resistant to this antibiotic worldwide. This poses a serious problem for the treatment of not only infections caused by *Enterococcus spp.*, but also infections caused by other pathogens, since this resistance can be transmitted by enterococci both horizontally - to other species, but also inherited genetically.

Thus, today an in-depth study of the virulence factors of *Enterococcus spp.* is necessary to characterize the molecular and cellular interactions between the human body and enterococci that lead to intraspecific transmission of genetic multidrug resistance and virulence factors, as well as to develop relevant strategies for the prevention and control of the spread of vancomycin-resistant enterococci.

МІНЛИВІСТЬ ЗБУДНИКА COVID-19 ТА СПЕЦИФІЧНА ПРОФІЛАКТИКА ХВОРОБИ

¹Шаповалова О.В., ²Кучма І.Ю., ³Мурашкін А.В.

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна, кафедра клінічної фармакології;

²Навчально-науковий медичний інститут НТУ «Харківський політехнічний інститут», кафедра мікробіології, бактеріології, вірусології та мікології;

³Лікарська амбулаторія загальної практики сімейної медицини, В.

Синьовидне, Стрийський р-н, Львівська обл.

shapolga2002@gmail.com

Вступ. Вже майже п'ять років людство співіснує з пандемічним коронавірусом SARS-CoV-2 – збудником COVID-19, яким у світі було інфіковано понад 775 мільйонів осіб. Важливою біологічною особливістю вірусу є висока здатність до генетичної варіабельності, яка дозволяє йому уникати імунного захисту макроорганізму. Періодичне виникнення нових варіантів збудника обумовлює потребу оновлювати діагностикуми, протоколи лікування COVID-19, протиепідемічні заходи, а також профілактичні імунобіологічні препарати.



STUDY OF PATHOGENICITY OF MICROORGANISMS OF THE GENUS *ENTEROCOCCUS*

Teslenko D.O.

Scientific supervisor: Tishchenko I. Yu.

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

teslenko700@gmail.com

Introduction. Enterococci (*Enterococcus spp.*) are a genus of gram-positive lactic acid bacteria of the Enterococcaceae family. According to their morphological characteristics, they are difficult to distinguish from streptococci and until 1984, some species of enterococci were attributed to the Streptococcaceae family. The genus of enterococci currently includes 27 species, divided into 5 groups according to phenotypic characteristics.

Enterococci play an ambiguous role in human life due to their wide distribution in nature. They are bacteria of the normal microflora of humans and animals, are found in food, water, plants, animals, birds and insects. Enterococci, on the one hand, are pathogens of urinary tract infections, intra-abdominal infections, pelvic infections, wound infections, endocarditis, and they account for a significant number of nosocomial infections.

On the other hand, enterococci are part of the normal microflora of the gastrointestinal tract of humans and many vertebrates, playing an important role in ensuring colonization resistance of the mucosa. Enterococci colonize mainly the small intestine, but are also found in significant numbers in the large intestine, the spongy part of the urethra, the genitals and, sometimes, in the oral cavity.

Some strains of these microorganisms, having acquired a number of signs of pathogenicity, can cause serious infectious diseases, other strains serve as a necessary component of the normal microbiocenosis. Enterococci play an important role in ensuring colonization resistance of mucous membranes. At the same time, they are opportunistic microorganisms and are capable of autoinfection.

Aim. To analyze modern studies devoted to the study of pathogenicity of enterococci and the mechanisms of its formation.

Materials and methods. Analysis of modern scientific research and literary sources in the field of bacteriology, clinical microbiology, genetics, pathophysiology and infectious diseases.

Research results. Enterococci are characterized by high resistance to environmental factors and disinfectants, the ability to survive for a long time on various objects and the environment. They are resistant to prolonged heating, chlorination, and high salt concentrations. Therefore, they are used as sanitary indicator microorganisms to assess the quality of chlorination of drinking water, mineral springs, and food products with high salt concentrations. Enterococci play a very important role in human life. Along with other resident normoflora (*E. coli*, lactobacilli, bifidobacteria), enterococci perform many useful functions in the human body. They are added to some dairy and meat products during production. They ferment lactose and produce enterocins, which provide antagonism against pathogenic and conditionally pathogenic bacteria (gram-positive and gram-negative), such as staphylococci, listeria, etc.

Enterococci, having the ability to support immunity, form vitamins, help digestion, and exhibit antagonistic activity, are used in the production of probiotics. They are able to influence the level of blood cholesterol and bilirubin, the functioning of the cardiovascular system, as well as immunological parameters that characterize the level of atherosclerosis. The effectiveness of these strains has been proven in chronic tonsillitis, chronic sinusitis, chronic bronchitis, irritable bowel

Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю
«YOUTH PHARMACY SCIENCE»

syndrome, and acute enteritis. Moreover, enterocins, produced by some strains of enterococci in large quantities, destroy *H. pylori* in the stomach and duodenum.

In addition, antitumor activity of some probiotics with strains of enterococci has also been discovered, which has been used in the treatment of cancer patients. For a long time, enterococci were classified as endogenous flora with low virulence. But in recent decades, antibiotic-resistant enterococci have increasingly become the cause of nosocomial infections along with methicillin-resistant staphylococci – *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). It has been proven that they cause severe septic processes, postoperative complications, and acute infections in the neonatal period. They are in second place after coagulase-negative staphylococci. At the same time, *E. faecalis* and *E. faecium* are most often isolated in different clinics.

Due to these properties, enterococci are included in the ESCAPE group of bacteria (pathogens resistant to antibiotics, long-term viable in the external environment, even in the presence of antiseptic solutions, which are constantly part of the intestinal microflora and are the cause of most hospital infections). Exogenous infection occurs mainly through contaminated hands of medical workers, as well as through environmental objects and equipment. All properties and features of enterococci are associated with their pathogenicity and virulence factors. Enterococci have the ability to acquire and transmit extrachromosomal elements of the genome (pathogenicity islands, PAI), which play a role in the development of the pathological process.

Enterococcal virulence factors include various proteins involved in adhesion and invasion: esp, asal, efaA, cyl A, cylM-cytolysins, gel E – gelatinase, Spr E – serine proteinase, hyaluronidase, proteins and toxins, inflammation. Enterococci have proteins that cause resistance to antibiotics.

Modern laboratory diagnostic technologies allow, in addition to the bacteriological method of research, to identify enterococci using the direct protein profiling mass spectrometry method. Molecular genetic identification of DNA is used.

The isolated enterococci have a high degree of resistance to antibiotics: vancomycin, chloramphenicol, erythromycin, tetracycline, clindamycin, cephalosporins of the first and second generations, fluoroquinolones, aminoglycosides, oxolinic acid. The high rate of DNA recombination helps them develop resistance to many antimicrobial drugs (AMPs) used in clinical practice and leads to the selection of highly virulent multi-resistant strains.

Conclusion. The study of the biological properties of enterococci is very important for optimizing the directions of rational antimicrobial therapy. The spread of vancomycin resistance among enterococci, especially *E. faecium*, is a particular problem, since some strains are resistant to almost all existing antibiotics. Today, it is very important to thoroughly study the pathogenicity factors of enterococci, search for new methods of laboratory research of their biological features, develop and improve methods of treatment of enterococcal infections.

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

YOUTH PHARMACY SCIENCE

МАТЕРІАЛИ
V ВСЕУКРАЇНСЬКОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ З МІЖНАРОДНОЮ УЧАСТЮ

10-11 грудня 2024 року
м. Харків

Харків
НФаУ
2024