

хозяйственных животных и технология производства продуктов животноводства. – 1997. – Вып. 2. – С. 151–154. 5. Ajello, L. Cultural methods for human pathogenic fungi / L. Ajello // J. Chronic Diseases. – 1989. – № 5. – P. 5. 6. Odds, F. 5th Conference on Candida and Candidiasis, March 1-4, 1999 in Charlestons South Carolina / F. Odds // Mycology Newsletter. – 1999. – № 1. – P. 9–14. 7. Rabel, G. Dermatophytes the recognition identification / G. Rabel, D. Taplin // Florida. – 1974. – P. 9–14. 8. Scott, D. B. A new variety of *Trichophyton verrucosum* / D. B. Scott // Transaet of the British mycological society. – 1976. – Vol. 67, part 2. – P. 342–344. 9. Star, R. Colony formation in algae / R. Star // Cell. Interact. Berlin. – 1984. – P. 261–282.

Поступила в редакцию 09.03.2020 г.

УДК 637.1/.4:637.075

ВИДОВОЙ СОСТАВ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ВАНКОМИЦИНУ ЭНТЕРОКОККОВ МОЛОКА СЫРОГО И ТВОРОГА

Кожин В.А., Горюк В.В.

Подольский государственный аграрно-технический университет,
г. Каменец-Подольский, Украина

В статье представлены результаты исследования видового состава энтерококков, выделяемых из молока сырого и изготовленного из него творога, и их чувствительность к ванкомицину. Установлено, что основными представителями рода *Enterococcus* в молоке сыром являются *E. faecalis* (53,4%) и *E. faecium* (34,7%). Похожая картина наблюдается и в твороге, однако количество *E. faecalis* в 1,4 раза больше, а *E. faecium* - в 2,8 раза меньше, чем в молоке. Также установлено, что 8,1% проб молока сырого контаминировано устойчивыми к ванкомицину энтерококками, в то время в твороге обнаружено в 1,7 раза больше этих бактерий. В основном ванкомицинрезистентные виды бактерий в молоке сыром представлены *E. faecalis* - 91,6%, а в твороге его количество не превышало 7,4%. **Ключевые слова:** молоко сырое, творог, энтерококки, ванкомицинрезистентность.

SPECIES COMPOSITION AND RESISTANCE TO VANCOMYCIN OF ENTEROCOCCES OF RAW MILK AND COTTAGE CHEESE

Kozhyn V.A., Horiuk V.V.

State Agrarian and Engineering University in Podilya, Kamianets-Podilskyi, Ukraine

The article presents the results of a study of the species composition of enterococci isolated from raw milk and cottage cheese made from it and their sensitivity to vancomycin. It has been established that the main representatives of the genus *Enterococcus* in milk are *E. faecalis* (53,4%) and *E. faecium* (34,7%). A similar pattern is observed in cottage cheese, however, the amount of *E. faecalis* is 1.4 times greater, and *E. faecium* is 2.8 times less than in milk. It was also found that 8,1% of raw milk samples were contaminated with enterococci resistant to vancomycin, while 1,7 times more of these bacteria were found in cottage cheese. Basically, vancomycin-resistant bacterial species in raw milk are represented by *E. faecalis* – 91,6%, and in cottage cheese its amount did not exceed 7,4%. **Keywords:** raw milk, cottage cheese, enterococci, vancomycin resistance.

Введение. Важную и значительную группу микроорганизмов в молоке сыром и молочных продуктах составляют бактерии рода *Enterococcus* [2, 4, 11]. Основным местом обитания энтерококков являются кишечник человека и животных, так как эти бактерии являются их постоянными жителями и составляют резистентную микрофлору [1]. Из этого источника они распространяются и загрязняют окружающую среду. Поэтому исследователи довольно часто обнаруживают эти бактерии в молоке и молочных продуктах, где таковые составляют первичную микрофлору [10]. Энтерококки используются как пробиотики и входят в состав биологически активных веществ, активно участвуют во многих метаболических процессах [12]. Энтерококки в кишечнике коррелируют с уровнем содержания других бактерий, в том числе кишечных палочек, бифидобактерий и лактобацилл [12]. Хотя большинство видов энтерококков является не патогенными для потребителей, есть виды, которые могут вызвать пищевые токсикоинфекции [6].

Важной характеристикой энтерококков, которая вызывает повышенный интерес, является высокая естественная устойчивость их к многим известным антимикробным препаратам. Эти бактерии проявляют повышенную устойчивость к таким антибиотикам, как пенициллины, аминогликозиды, гликопептиды и другим препаратам. Сложным вопросом остается изучение распространения в пищевых продуктах популяций энтерококков с множественной антибиотикоустойчивостью и различными наборами факторов вирулентности, которые представляют опасность для людей [15]. Распространение таких штаммов ученые объясняют высокой устойчивостью энтерококков к факторам внешней среды, интенсивным и неконтролируемым использованием антибиотиков, способностью энтерококков активно обмениваться генетической информацией как между различными видами рода, так и с гетерологичными микроорганизмами [6, 13].

Важным с научной и практической точек зрения остается вопрос распространения через пищевые продукты энтерококков, устойчивых к ванкомицину (VRE) [1, 7]. Этот антибиотик относится к группе резервных и используется для лечения стафилококковых, энтерококковых и других инфекций. Для инфекций, вызванных VRE, характерным является быстрое распространение и сравнительно высокий уровень заболеваемости среди пациентов [8, 9]. Одна из причин высокой смертности - существенные ограничения, связанные с выбором эффективных этиотропных средств лечения для борьбы с указанными возбудителями. Пищевые продукты животного происхождения могут быть резервуаром VRE и играть существенную роль в распространении и передаче их человеку [3, 5, 14]. Поэтому изучение распространения бактерий рода *Enterococcus* в пищевых продуктах, их видовой состав и чувствительность к антибактериальным препаратам является актуальным.

Цель работы - определить видовой состав и устойчивость к ванкомицину энтерококков молока сырого и изготовленного из него творога, которые реализуются на агропродовольственных рынках Украины.

Материалы и методы исследований. Исследовали 115 изолятов *Enterococcus spp.*, выделенных за последние два года из 48 проб молока сырого и 94 проб творога, отобранных на агропродовольственных рынках Украины.

Выделение энтерококков осуществляли на Bile Esculin Azide Agar (Himedia, Индия). Культивировали посеvy при температуре 37°C в течение 24-48 часов.

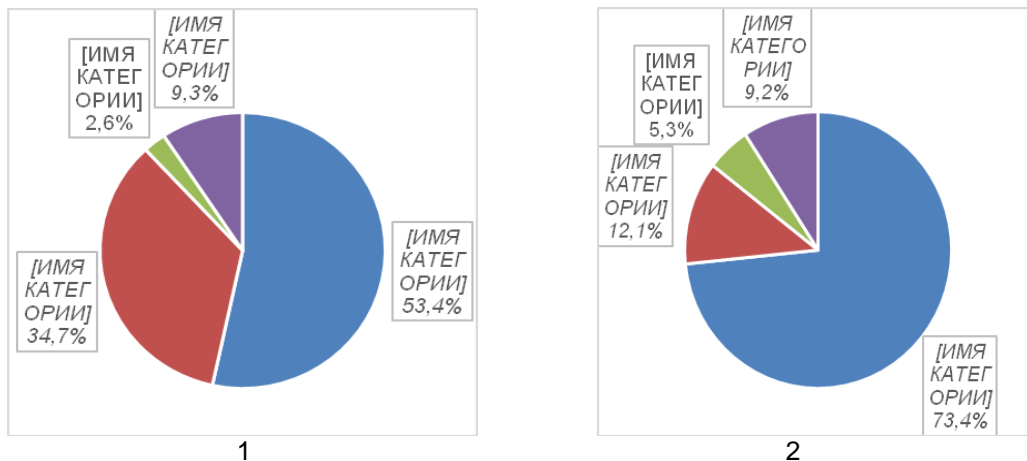
Видовую идентификацию бактерий осуществляли с помощью тест-систем Enterococcus-test (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехия) и программно-аппаратного комплекса MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Германия).

Для выделения ванкомицинрезистентных энтерококков использовали хромогенную среду chromID VRE (BioMérieux, France). Для подтверждения VRE определяли МПК ванкомицина и тикоплана методом Etest (BioMérieux, Франция) в соответствии со стандартами CLSI: ванкомицин ≤4 мкг/мл (чувствительные), 8-16 мкг/мл (мало чувствительные), ≥32 мкг/мл (устойчивые) и тикопланин ≤8 мкг/мл (чувствительные), 8-16 мкг/мл (мало чувствительные), ≥32 мкг/мл (устойчивые).

Статистическую обработку результатов осуществляли методами вариационной статистики с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft Inc., USA). Применяли непараметрические методы исследований (критерии Уилкоксона, Манна-Уитни). Определяли среднее арифметическое (x), стандартную ошибку средней величины (SE). Разницу между сравнимыми величинами считали достоверной при P<0,05.

Результаты исследований. Проведена видовая идентификация и определена чувствительность к ванкомицину бактерий рода *Enterococcus*. При этом исследования были спланированы так, чтобы определить видовой состав энтерококков молока сырого и изготовленного из него творога, а затем сравнить их устойчивость к антибиотику. Проведенные таким образом исследования позволят установить влияние технологии изготовления, а именно температуры, на видовой состав энтерококков и сравнить их чувствительность. Согласно результатам исследований [2] считается, что действие повышенных температур стимулирует стресс-протеины в клетке энтерококков, в результате чего они приобретают повышенную устойчивость к факторам окружающей среды: повышенной концентрации солей, pH, перекиси водорода, этанола и других.

Результаты идентификации бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из молока сырого и творога, приведены на рисунке 1.



1 – состав энтерококков, выделенных из молока сырого; 2 - состав энтерококков, выделенных из творога

Рисунок 1 - Видовой состав бактерий рода *Enterococcus*

Как видно из рисунка 1, из молока сырого нами выделено и идентифицировано три вида бактерий рода *Enterococcus*: *E. faecalis*, *E. faecium* и *E. durans*. Основная часть выделенных энтерококков молока представлена видом *E. faecalis* - 53,4%, доля *E. faecium* в 1,5 раза меньше ($P \leq 0,05$) и составляла 34,7%, а количество *E. durans* не превышало 10% от всех идентифицированных энтерококков. Энтерококки, которые проявляют родственные свойства и слабо дифференцируются, составляли 2,6%.

Доминировали в видовом составе творога микроорганизмы *E. faecalis*, которые составляли 73,4%, что в 1,37 раза ($P \leq 0,05$) больше, чем в молоке сыром. Количество бактерий *E. faecium* в твороге составляло 12,1%, что в 2,86 раза ($P \leq 0,05$) меньше, чем их содержание в молоке сыром, а вид *E. durans* составлял 5,3%. Также отмечали увеличение в 3,5 раза ($P \leq 0,05$) доли неидентифицированных видов энтерококков в твороге (составляли до 9,2%) по сравнению с молоком.

Итак, проведенные исследования указывают, что видовым составом энтерококков, который доминирует в молоке сыром и твороге, является *E. faecalis*, который составляет 53,4 и 73,4% соответственно, и, по нашему мнению, имеет фекальное происхождение.

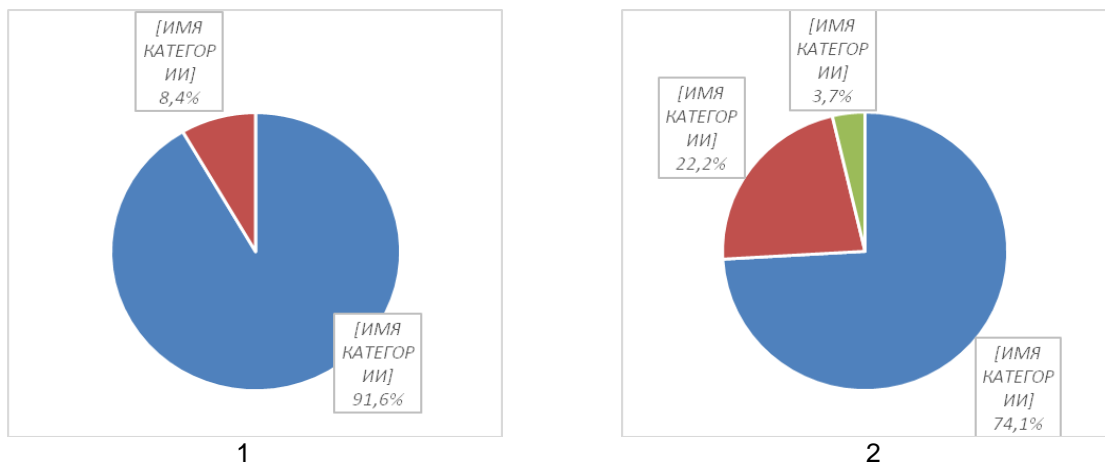
Увеличение в среднем в 1,4 раза *E. faecalis* в твороге связано с дополнительным загрязнением его во время технологии изготовления, хранения и реализации, или этот вид является более устойчивым, по сравнению с другими видами, к температуре, которую используют при изготовлении творога. Чрезмерный рост этого вида является не только показателем нарушения санитарно-гигиенических требований производства, но и может быть причиной инфицирования людей данным продуктом. Это связано с тем, что взгляды на наличие энтерококков в пищевых продуктах неоднозначны. Некоторая часть ученых считает их представителями нормальной микрофлоры кишечника человека, так как они проявляют пробиотические свойства [12], а другая часть склоняется к мнению, что этот вид относится к условно-патогенным бактериям и может вызывать различные воспалительные заболевания, пищевые отравления у людей и животных [1, 2].

Особое внимание уделяют ванкомицинрезистентному энтерококку. Учитывая постоянное присутствие энтерококков в кишечнике животных, а также интенсивное использование антимикробных препаратов для профилактики и лечения бактериальных инфекций, существует реальная опасность передачи человеку генов антибиотикорезистентности и вирулентности. Однако, несмотря на важность и практическую значимость проблемы распространения антибиотикорезистентных популяций микроорганизмов в Украине, недостаточно объективных данных о возможном резервуаре и источнике распространения генов антибиотикорезистентности известных патогенов человека, в том числе генов ванкомицинрезистентности.

Результаты исследования распространения ванкомицинрезистентных энтерококков в молоке сыром и твороге представлены в таблице 1 и на рисунке 2.

Таблица 1 - Частота выделения ванкомицинрезистентных энтерококков из молока сырого и творога

Объект исследований	Исследовано образцов		Количество VRE	
	n	%	n	%
Молоко сырое	48	100	4	8,3
Творог	94	100	13	13,8



1 – состав энтерококков, выделенных из молока сырого; 2 - состав энтерококков, выделенных из творога

Рисунок 2 - Видовой состав ванкомицинрезистентных энтерококков

В результате проведенных исследований определили, что 8,3% проб молока сырого были контаминированы ванкомицинрезистентными энтерококками, в то же время в твороге выделено в 1,7 раза ($P < 0,05$) больше этих бактерий. Идентификация VRE определила присутствие двух видов: *E. faecalis* и *E. faecium*. В основном, VRE молока сырого представлены видом *E. faecalis*, так как на его долю приходится 91,6%. В твороге отмечено увеличение доли VRE за счет *E. faecium* в 2,6 раза ($P < 0,05$) по сравнению с молоком сырым.

Таким образом, исследования указывают на возможность селекции в твороге, который поступает для реализации на агропродовольственных рынках, бактерий вида *E. faecalis* с устойчивыми свойствами к антибиотикам. Это, в свою очередь, может формировать устойчивые штаммы данных бактерий в желудочно-кишечном тракте людей - потребителей творога.

Заключение. 1. В твороге среди энтерококков доминирует вид *E. faecalis*, который составляет 73,4%, что в 1,37 раза ($P < 0,05$) больше, чем в молоке сыром. Количество бактерий *E. faecium* в твороге составило 12,1%, что в 2,9 раза ($P < 0,05$) меньше, чем в молоке, а вид *E. durans* составил 5,3%.

2. Установлено, что 8,1% проб молока сырого контаминированы VRE, в то время в твороге выявлено в 1,7 раза ($P < 0,05$) больше этих бактерий. В основном VRE молока сырого представлены *E. faecalis* - 91,6%, а в твороге его количество не превышало 7,4%.

Литература. 1. Ahmed, M.O. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health / M. O. Ahmed, K. E. Baptiste // *Microbial Drug Resistance*. – 2018. – № 24(5). – P. 590–606. 2. Al-Shammery, A.H.A. Run-off Patterns of Vancomycin Resistant Enterococci (VRE clones) in Cows Raw Milk and Imported Milk Powders at Baghdad Markets / A. H. A. Al-Shammery // *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*. – 2019. – № 43(2). – P. 61–66. 3. Arias, C. A. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance / C. A. Arias, B. E. Murray // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2012. – № 10. – P. 266–278. 4. Call, D. R. Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production / D. R. Call, M. A. Davis, A. A. Sawant // *Animal Health Research Reviews*. – 2008. – № 9(2). – P. 159–167. 5. Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins / A. Carlos [et al] // *J. Appl. Microbiol.* – 2010. – № 108. – P. 1563–1575. 6. Distribution of antibiotic resistance genes in *Enterococcus* spp. isolated from mastitis bovine milk / G. Erbas [et al] // *Acta Veterinaria*. – 2016. – № 66(3). – P. 336–346. 7. Foka, T. Detection of Virulence Genes in Multidrug Resistant Enterococci Isolated from Feedlots Dairy and Beef Cattle: Implications for Human Health and Food Safety / T. Foka, F. Eric, C. N. Ateba // *BioMed research international*. – 2019. – P. 1–14. 8. Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses / R. Gaglio[et al] // *International journal of food microbiology*. – 2016. – № 236. – P. 107–114. 9. Giraffa G. Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses / G. Giraffa, A. M. Olivari, E. Neviani // *Food Microbiology*. – 2000. – №17(6). – P. 671–677. 10. Detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* hospital-adapted lineages in municipal wastewater treatment plants indicates widespread distribution and release into the environment / T. Gouliouris [et al] // *Genome research*. – 2019. – № 29(4). – P. 626–634. 11. Hamzah, A. M. Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* from cow milk samples and vaginal swab from human / A. M. Hamzah, H. K. Kadim // *Entomol Zool Sci*. – 2018. – № 6. – P. 218–222. 12. Probiotic properties of *Enterococcus* isolated from artisanal dairy products / Y. Nami [et al] // *Frontiers in microbiology*. – 2019. – №10. – P. 1–13. 13. Occurrence of enterococci in mastitic cow's milk and their antimicrobial resistance / H. Rózańska [et al] // *Journal of veterinary research*. – 2019. – № 63(1). – P. 93–96. 14. Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans / R. Schrijver [et al] // *Clinical microbiology and infection*. – 2018. – № 24(6). – P. 577–590. 15. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China / F. Yang [et al] // *Journal of dairy science*. – 2019. – № 102(1). – P. 140–144.

Поступила в редакцию 02.04.2020 г.

УДК 619:576.89:004.4

РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАЗАРИТОВ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА

Конахович И.К., Мироненко В.М.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

Использование разработанной компьютерной программы для идентификации паразитов мелкого рогатого скота позволяет точно осуществлять идентификацию возбудителей паразитозов с минимальными временными затратами. **Ключевые слова:** паразит, база данных, мелкий рогатый скот, идентификация, диагностика.