



Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.
Серія: Сільськогосподарські науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.
Series: Agricultural sciences

ISSN 2519-2698 print
ISSN 2707-5834 online

doi: 10.32718/nvlvet-a9503
<https://nvlvet.com.ua/index.php/agriculture>

UDC 606:637.3:637.055

Influence of enterococci on the sensitivity of opportunistic microflora to antibiotics

I. I. Kushnir¹, I. S. Semen², O. Y. Tsisaryk¹, I. M. Kushnir²

¹Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Ukraine

²State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, Lviv, Ukraine

Article info

Received 09.04.2021

Received in revised form
12.05.2021

Accepted 13.05.2021

Stepan Gzhytskyi National
University of Veterinary
Medicine and Biotechnologies,
Pekarska Str., 50, Lviv,
79010, Ukraine.
Tel.: +38-098-290-16-94
E-mail: irynakushn@gmail.com

State Scientific-Research
Control Institute of Veterinary
Medicinal Products and Feed
Additives, Donetsk Str., 11,
Lviv, 79019, Ukraine.

Kushnir, I. I., Semen, I. S., Tsisaryk, O. Y., & Kushnir, I. M. (2021). Influence of enterococci on the sensitivity of opportunistic microflora to antibiotics. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricultural sciences, 23(95), 25–28. doi: 10.32718/nvlvet-a9503

The article presents the results of determining the ability of enterococci isolated from traditional Carpathian cheese to affect the antibiotic sensitivity of opportunistic gram-positive and gram-negative microorganisms, particularly test strains of *S. aureus* and *E. coli*. It was found that enterococci had different effects on the sensitivity of opportunistic pathogens to different groups of antimicrobial drugs. In particular, co-cultivation of *S. aureus* with enterococci did not affect the change in sensitivity to amoxicillin and glycopeptides (vancomycin). In the study of aminoglycosides, it was found that the sensitivity of staphylococcus to gentamicin increased when co-cultured with strains of *E. faecium* SB12 and *E. durans* SB18 by 14.8 ($P < 0.05$) and 13.1 % ($P < 0.01$), respectively. The tendency to increase the sensitivity of staphylococcus to streptomycin was also observed in cultivation with *E. faecium* SB12 and *E. durans* SB18. Concerning macrolides, in particular erythromycin, only one strain of *E. durans* SB18 caused a 3.2 % increase in staphylococcal susceptibility, and a probable increase in staphylococcal susceptibility was found in fluoroquinolones. In particular, the sensitivity of staphylococci to enrofloxacin and norfloxacin increased by 7.6 and 5.3 %, respectively ($P < 0.05$). The antibiotic susceptibility of *E. coli* with enterococci found a slight increase in sensitivity to penicillins when co-cultured with strains of *E. faecium* SB12 and *E. durans* SB18. Thus, the antibiotic sensitivity of *E. coli* increased by 5.1 and 7.5 %, respectively. In addition, the sensitivity of *E. coli* to aminoglycosides (streptomycin) increased under co-cultivation with *E. durans* SB6 and SB18 strains by 7, 5, and 9.7 %, respectively ($P < 0.05$). In addition, when co-cultured with *E. faecium* SB12 and *E. durans* SB18 strain, the sensitivity of *E. coli* to enrofloxacin increased by 7.6 and 5.3 %, respectively ($P < 0.05$), and to norfloxacin – by 3, 8, and 4.9 %. Co-cultivation with *E. durans* SB6 and *E. faecium* SB12 strains increased the sensitivity of *E. coli* to β -lactam antibiotics, in particular, cefazolin by 9.1 % ($P < 0.05$), and in co-cultivation with *E. durans* SB18 – at 14.1% ($P < 0.01$).

Key words: *Enterococcus durans*, *E. faecium*, antibiotics, susceptibility, cultivation, opportunistic pathogens.

Вплив ентерококів на чутливість умовно-патогенної мікрофлори до антибіотиків

I. I. Кушнір¹, I. С. Семен², О. Й. Цісарик¹, I. М. Кушнір²

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна

²Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів, Україна

У статті наведено результати визначення здатності ентерококів, виділених з традиційної карпатської бринзи, впливати на антибіотикочутливість умовно-патогенних грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів, зокрема тест-штамів *S. aureus* та *E. coli*. Було встановлено, що ентерококи по-різному впливали на підвищення чутливості умовно-патогенної мікрофлори до різних груп протимікробних препаратів. Зокрема, сумісне культивування *S. aureus* з ентерококами не впливало на зміну чутливості до амоксициліну та глікопептидів (ванкоміцину). При дослідженні аміноглікозидів встановили, що чутливість стафілококу до гентаміцину зростала за умови спільного культивування із штамами *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18 відповідно на 14,8 ($P < 0,05$) та 13,1 % ($P < 0,01$). Тенденцію до підвищення чутливості стафілококу до стрептоміцину відзначали також при культивуванні із *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18. Щодо макролідів, зокрема еритроміцину, тільки один штам *E. durans* SB18 спричинював підвищення чутливості стафілококу на 3,2 %, а вірогідне підвищення чутливості стафілококу встановили до фторхінолонів. Зокрема, чутливість стафілококу до енрофлоксацину та норфлоксацину підвищувалась відповідно на 7,6 та 5,3 % ($P < 0,05$). При вивченні антибіотикочутливості *E. coli* з ентерококами встановили незначне підвищення чутливості до пеніцилінів за сумісного культивування із штамами *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18. Так, антибіотикочутливість *E. coli* підвищувалась відповідно на 5,1 та 7,5 %. Також чутливість *E. coli* до аміноглікозидів (стрептоміцину) зростала за умови спільного культивування із штамами *E. durans* SB6 та SB18 відповідно на 7, 5 та 9,7 % ($P < 0,05$). Крім того, за спільного культивування із штамом *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18 чутливість *E. coli* до енрофлоксацину підвищувалась відповідно на 7,6 та 5,3 % ($P < 0,05$), а до норфлоксацину – відповідно на 3,8 та 4,9 %. Спільне культивування зі штамами *E. durans* SB6 та *E. faecium* SB12 сприяло підвищенню чутливості *E. coli* до β -лактамних антибіотиків, зокрема цефазоліну на 9,1 % ($P < 0,05$), а при спільному культивуванні із *E. durans* SB18 – на 14,1 % ($P < 0,01$).

Ключові слова: *Enterococcus durans*, *E. faecium*, антибіотики, чутливість, культивування, умовно-патогенна мікрофлора.

Вступ

Сьогодні особлива увага провідних фахівців приділяється застосуванню пробіотиків, що пов'язано зі зниженням ефективності антибіотикотерапії та збільшенням частоти побічних реакцій при використанні антимікробних препаратів. Однак за використання таких препаратів є загроза поширення генів антибіотикостійкості як при кон'югації, так і інших механізмах, зокрема трансформації або трансдукції (Oryshak et al., 2013; Kushnir et al., 2020). Важливою перевагою пробіотиків з властивим їм широким спектром антагоністичної активності щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів є те, що на відміну від антибіотиків вони не викликають утворення до них стійких форм бактерій (Dinleyici et al., 2013; Vitetta et al., 2014; Musiy et al., 2017) і не пригнічують імунітет, а стимулюють вироблення антитіл і його неспецифічних факторів (Serebryakova, 2014; Ashraf & Shah, 2014; Kushnir et al., 2015). Штами, призначені для використання як пробіотики або бактеріальні закваски, не повинні мати вірулентних детермінантів, мають бути чутливими до антибіотиків і при цьому володіти добрими функціональними та технологічними властивостями (Franz, 2003).

Оскільки ентерококи можуть проявляти як патогенні, так і пробіотичні властивості, вони повинні бути добре охарактеризовані та оцінені з огляду їхньої безпечності. Надзвичайно важливим є розмежування патогенних та безпечних ентерококів з метою оцінювання їх як потенційних пробіотичних штамів. Використання таких штамів повинно враховувати раціональне застосування антибіотиків у гуманній та ветеринарній медицині (Braiek & Smaoui, 2019).

З огляду на це метою нашої роботи було вивчити вплив ентерококів *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20, виділених із традиційної карпатської бринзи (Slyvka et al., 2018) за сумісного культивування з умовно-патогенними мікроорганізмами на чутливість останніх до антибіотиків.

Матеріал і методи досліджень

Для проведення досліджень з визначення чутливості умовно-патогенної мікрофлори до антибіотиків застосовували метод дифузії в агар із використанням стандартних паперових дисків з антибіотиками. Цей метод базується на здатності антибіотика дифундувати в агарове середовище і перешкоджати розмноженню культури, що призводить до утворення прозорих зон гальмування їхнього росту. Результати враховували за величиною зони затримки росту мікроорганізмів навколо дисків. За допомогою лінійки вимірювали діаметр зони затримки росту довкола дисків, включаючи самі диски (Avdyeyeva et al., 2005). Перед проведенням спільного культивування тест-культури *S. aureus* та *E. coli* із різними штамами ентерококів визначили чутливість тест-штамів до антибактеріальних препаратів. Спільне культивування проводили в м'ясо-пептонному бульйоні упродовж трьох діб. Культури дослідних штамів ентерококів і тест-мікробів готували в однакових умовах росту, при цьому провели попередню адаптацію до поживних середовищ шляхом 2–3 пасажів. Після чого готували завись мікроорганізмів за оптичним стандартом Мак Фарланда із розрахунку $1,5 \times 10^8$ КУО/см³ та вносили окремо культури ентерококів та тест-штамів мікроорганізмів у пробірки із 9 см³ МПБ у кількості: ентерококи – 1 см³ а тест-штами *S. aureus* та *E. coli* – 0,5 см³.

Після спільного культивування проводили виділення чистої тест-культури мікроорганізмів, шляхом висівання на відповідні селективні живильні середовища для кожної культури та проводили визначення чутливості тест-штамів *S. aureus* та *E. coli* до антибіотиків.

Результати та їх обговорення

Чутливість *S. aureus* до антимікробних препаратів після спільного тридобового культивування із досліджуваними ентерококами наведено у таблиці 1. Як видно з результатів досліджень, сумісне культивування *S. aureus* з ентерококами не впливало на зміну чутливості до пеніцилінів, зокрема, амоксициліну. При дослідженні аміноглікозидів встановили, що

чутливість стафілококу до гентаміцину зростала за умови спільного культивування зі штамми *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18 відповідно на 14, 8 (P < 0,05) та 13,1 % (P < 0,01). Тенденцію до підвищення чутливості стафілококу до стрептоміцину виявляли також при культивуванні з *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18. Щодо макролідів, зокрема еритроміцину, тільки один штамп *E. durans* SB18 спричинював підвищення чутливості стафілококу на 3,2 %. Вірогідне підвищення чутливості стафілококу до фторхінолонів спостерігали за спільного культивування із штамом *E. durans*

SB18. Зокрема, чутливість стафілококу до енрофлоксацину та норфлоксацину підвищувалась відповідно на 7,6 та 5,3 % (P < 0,05). До β-лактамних антибіотиків, зокрема цефазоліну, спільне культивування із штамми *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18 сприяло підвищенню чутливості стафілококу відповідно на 13,5 та 16,4 % (P < 0,01).

Впливу досліджуваних штамів на чутливість стафілококу до глікопептидів, зокрема ванкоміцину, не виявили.

Таблиця 1

Вплив ентерококів на чутливість *S. aureus* до антибіотиків (M ± m, n = 3)

Антибіотики	<i>S. aureus</i> до спільного культивування	<i>S. aureus</i> після спільного культивування з:			
		<i>E. durans</i> SB6	<i>E. faecium</i> SB 12	<i>E. durans</i> SB18	<i>E. durans</i> SB20
Амоксицилін	24,3 ± 0,3	24,3 ± 0,3	23,3 ± 0,3	24,3 ± 0,3	23,6 ± 0,3
Оксацилін	23,3 ± 0,3	23,6 ± 0,3	22,6 ± 0,3	23,3 ± 0,3	23,3 ± 0,3
Гентаміцин	20,3 ± 0,3	18,3 ± 0,3	23,6 ± 0,3**	23,3 ± 0,3*	19,3 ± 0,3
Стрептоміцин	15,6 ± 0,3	15,3 ± 0,3	16,3 ± 0,3	16,6 ± 0,3	15,6 ± 0,3
Канаміцин	17,3 ± 0,3	16,6 ± 0,3	17,3 ± 0,3	18,3 ± 0,3	16,6 ± 0,3
Еритроміцин	21,6 ± 0,3	20,6 ± 0,3	21,6 ± 0,3	22,3 ± 0,3	20,6 ± 0,3
Тилозин	23,3 ± 0,3	22,6 ± 0,3	21,6 ± 0,3*	23,3 ± 0,3	21,6 ± 0,3*
Тетрацин	22,3 ± 0,3	22,6 ± 0,3	22,6 ± 0,3	23,3 ± 0,3	22,6 ± 0,3
Доксициклін гідрохлорид	23,3 ± 0,3	23,6 ± 0,3	24,3 ± 0,3	24,6 ± 0,3*	23,6 ± 0,3
Енрофлоксацин	26,3 ± 0,3	26,6 ± 0,3	27,3 ± 0,3	28,3 ± 0,3*	27,3 ± 0,3
Норфлоксацин	24,3 ± 0,3	25,3 ± 0,3	25,3 ± 0,3	25,6 ± 0,3*	24,6 ± 0,3
Цефалексин	21,6 ± 0,3	22,3 ± 0,3	22,6 ± 0,3	25,6 ± 0,3**	23,3 ± 0,3*
Цефазолін	24,3 ± 0,3	24,3 ± 0,3	27,6 ± 0,3**	28,3 ± 0,3**	24,3 ± 0,3
Нітрофураратоїн	21,6 ± 0,3	20,6 ± 0,3	20,3 ± 0,3*	22,3 ± 0,3	21,3 ± 0,3
Левоміцетин	18,3 ± 0,3	20,3 ± 0,3*	20,6 ± 0,3**	21,3 ± 0,3**	19,3 ± 0,3
Ванкоміцин	15,3 ± 0,3	15,6 ± 0,3	15,6 ± 0,3	16,3 ± 0,3	16,3 ± 0,3
Поліміксин В	9,6 ± 0,3	10,3 ± 0,3	10,6 ± 0,3	11,3 ± 0,3*	10,6 ± 0,3
Рифампіцин	25,6 ± 0,3	25,3 ± 0,3	27,3 ± 0,3*	27,3 ± 0,3*	26,3 ± 0,3

Примітка: * – P < 0,05, ** – P < 0,01

Таблиця 2

Вплив ентерококів на чутливість *E. coli* до антибіотиків (M ± m, n = 3)

Антибіотики	<i>E. coli</i> до спільного культивування	<i>E. durans</i> SB6	<i>E. faecium</i> SB 12	<i>E. durans</i> SB18	<i>E. durans</i> SB20
Оксацилін	-	-	-	-	-
Гентаміцин	18,3 ± 0,3	19,3 ± 0,3	18,3 ± 0,3	18,7 ± 0,3	18,3 ± 0,3
Стрептоміцин	13,3 ± 0,3	14,6 ± 0,3*	13,3 ± 0,3	14,3 ± 0,3	13,6 ± 0,3
Канаміцин	17,3 ± 0,3	15,7 ± 0,3*	17,7 ± 0,3	17,7 ± 0,3	15,3 ± 0,3*
Еритроміцин	8,6 ± 0,3	7,3 ± 0,3*	9,3 ± 0,3	8,3 ± 0,3	9,3 ± 0,3
Тетрациклін	20,3 ± 0,3	19,6 ± 0,3	21,7 ± 0,3*	20,6 ± 0,3	18,7 ± 0,3*
Доксициклін гідрохлорид	15,3 ± 0,3	16,3 ± 0,3	18,3 ± 0,3**	17,6 ± 0,3**	18,3 ± 0,3**
Енрофлоксацин	26,3 ± 0,3	26,7 ± 0,3	28,6 ± 0,3**	28,6 ± 0,3**	26,6 ± 0,3
Норфлоксацин	26,3 ± 0,3	27,3 ± 0,3	27,3 ± 0,3	27,6 ± 0,3*	26,3 ± 0,3
Цефалексин	14,3 ± 0,3	14,3 ± 0,3	14,7 ± 0,3	14,7 ± 0,3	14,3 ± 0,3
Цефазолін	18,7 ± 0,3	20,3 ± 0,3*	20,3 ± 0,3*	21,3 ± 0,3**	18,7 ± 0,3
Нітрофураратоїн	19,3 ± 0,3	19,3 ± 0,3	20,7 ± 0,3*	21,3 ± 0,3*	19,6 ± 0,3
Левоміцетин	21,3 ± 0,3	20,6 ± 0,3	20,7 ± 0,3	21,3 ± 0,3	21,3 ± 0,3
Ванкоміцин	17,3 ± 0,3	18,3 ± 0,3	19,3 ± 0,3*	17,7 ± 0,3	16,6 ± 0,3
Поліміксин В	14,3 ± 0,3	14,7 ± 0,3	14,3 ± 0,3	14,7 ± 0,3	14,3 ± 0,3
Рифампіцин	16,3 ± 0,3	15,6 ± 0,3	16,3 ± 0,3	16,6 ± 0,3	17,3 ± 0,3

Примітка: * – P < 0,05, ** – P < 0,01

Результати визначення чутливості *E. coli* до антимікробних препаратів після спільного тридобового культивування із досліджуваними ентерококами на-

ведено у таблиці 2. Сумісне культивування *E. coli* з ентерококами спричинювало незначне підвищення чутливості до пеніцилінів, зокрема амоксициліну.

Так, чутливість *E. coli* після сумісного культивування із штамами *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18 підвищувалась відповідно на 5,1 та 7,5 %. Чутливість *E. coli* до аміноглікозидів, зокрема стрептоміцину, зростала за умови спільного культивування зі штамами *E. durans* SB6 та SB18 відповідно на 7,5 та 9,7 % ($P < 0,05$). Вірогідне підвищення чутливості *E. coli* до фторхінолонів спостерігали за спільного культивування зі штамом *E. faecium* SB 12 та *E. durans* SB18. Зокрема, чутливість *E. coli* до енрофлоксацину підвищувалась відповідно на 7,6 та 5,3 % ($P < 0,05$), а до норфлоксацину – відповідно на 3,8 та 4,9 %. Щодо β -лактамних антибіотиків, зокрема цефазоліну, спільне культивування із штамами *E. durans* SB6 та *E. faecium* SB12 сприяло підвищенню чутливості *E. coli* на 9,1 % ($P < 0,05$), а при спільному культивуванні з *E. durans* SB18 – на 14,1 % ($P < 0,01$). Крім того, встановили підвищення чутливості до ванкоміцину *E. coli* на 11 % ($P < 0,01$) за її спільного культивування із штамом *E. faecium* SB12.

Висновки

1. Виділені з традиційної карпатської бринзи ентерококи по-різному впливали на чутливість умовно-патогенної мікрофлори до різних груп протимікробних препаратів.

2. Серед виділених із традиційної карпатської бринзи ентерококів штам *E. durans* SB18 проявляв більш виражений вплив на підвищення чутливості тест-штамів *S. aureus* та *E. coli* до більшості досліджуваних антибіотиків.

Відомості про конфлікт інтересів. Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів щодо їхнього вкладу та результатів досліджень.

References

- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2014). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 54(7), 938–956. doi: 10.1080/10408398.2011.619671.
- Avdyeyeva, L. V., Polishchuk, O. I., & Pokas, O. V. (2005). Metodolohichni pidkhody do vyznachennya chutlyvosti mikrorhanizmiv do antybiotyktiv. *Laboratorna diahnozyka*, 3(33), 35–40 (in Ukrainian).
- Braiek, O. B., & Smaoui, S. (2019). Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed Research International*, 2019, 5938210. doi: 10.1155/2019/5938210.
- Dinleyici, E. C., Dalgic, N., Guven, S., Ozen, M., Kara, A., Arica, V., Metin-Timur, O., Sancar, M., Kurugol, Z., Tanir, G., Ozturk, D., Aydogdu, S., Tutanc, M., Eren, M., & Vandenplas, Y. (2013). The effect of a multispecies synbiotic mixture on the duration of diarrhea and length of hospital stay in children with acute diarrhea in Turkey: Single blinded randomized study. *Eur. J. Pediatr*, 172(4), 459–464. doi: 10.1007/s00431-012-1903-5.
- Franz, C. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2–3), 105–122. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00174-0.
- Kushnir, I. M., Semen, I. S., & Mayba, U. Z. (2015). Vyvchennya biolohichnykh vlastyvyostey probiotychnykh shtamiv mikroorhanizmiv. *Nauk.-tekhn. byul. DNDKI vetpreparativ ta kormovykh dobavok ta Instytutu biolohiyi tvaryn*, 16(2), 207–212 (in Ukrainian).
- Kushnir, I., Tsisaryk, O., Shalovylo, S., Gutyj, B., Kushnir, G., Slyvka, I., & Musiy, L. (2020). The ability of enterococci extracted from traditional Carpathian cheese bryndza to produce biologically active substances. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 3(3), 15–19. doi: 10.32718/ujvas3-3.03.
- Musiy, L., Tsisaryk, O., Slyvka, I., Mykhaylytska, O., & Gutyj, B. (2017). Research into probiotic properties of cultured butter during storing. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 3(11(87)), 31–36. doi: 10.15587/1729-4061.2017.103539.
- Oryshak, E. A., Shcheglov, V. S., & Shylova, L. Yu. (2013). Sravnytel'naya kharakterystyka antybyotykorezistentnosti nekotorykh predstaviteley mykrobyotov kyshechnyka y probyotycheskykh shtammov. *Problemy meditsynskoy mikolohii*, 4, 74–80 (in Russian).
- Serebryakova, E. N. (2014). Probiotics for Prevention and Treatment at Diarrhea in Children. *The difficult patient*, 12(5), 20–25.
- Slyvka, I. M., Tsisaryk, O. Y., Dronyk, G. V., & Musiy, L. Y. (2018). Strains of lactic acid bacteria isolated from traditional Carpathian cheese. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(1), 62–68. doi: 10.15421/021808.
- Vitetta, L., Briskey, D., Alford, H., Hall, S., & Coulson, S. (2014). Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease. *Inflammopharmacology*, 22(3), 135–154. doi: 10.1007/s10787-014-0201-4.