

Читать
онлайн
Read
onlineПай Г.В., Ракитина Д.В., Панькова М.А., Федец З.Е., Мания Т.Р.,
Загайнова А.В.

Сравнительная оценка патогенного потенциала энтерококков, выделенных от здоровых людей и из сточных вод

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управление медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства, 119121, Москва, Россия

Введение. Эффективная работа очистных сооружений — важнейший фактор защиты здоровья общества. При этом требования к очистке и обеззараживанию сточных вод предполагают снижение количества бактерий до нормативного уровня, не учитывая патогенного потенциала выживших бактерий в воде, попадающей после обеззараживания в поверхностные водоёмы. Представляется актуальным оценить влияние очистных сооружений именно на патогенный потенциал бактерий. В настоящей работе это выполняется на примере изолятов *Enterococcus*, так как энтерококки, имеющие патогенный потенциал, представляют собой серьёзную угрозу здоровью человека, вызывая инфекционно-воспалительные поражения клапана сердца, мочеполовой системы и другие заболевания.

Материалы и методы. Патогенный потенциал энтерококков оценивали по детектированию в выделенной из изолятов ДНК потенциально патогенных генов методом ПЦР. Детектировали гены адгезивных белков (*Esp*, *Asa I*), лизирующих белков (цитолизина *CytA*, гиалуронидазы *hyl* и желатиназы *gelE*) и факторов устойчивости к антибиотикам (*vanA*, *vanB*). В работе проведена сравнительная оценка наличия патогенного потенциала у 366 изолятов бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из образцов воды со станций очистки сточных вод Москвы и Московской области, и 168 изолятов, выделенных из кала людей из контрольной группы без колопроктологических заболеваний.

Результаты. Процент изолятов бактерий рода *Enterococcus*, обладающих патогенным потенциалом, различался для разных очистных станций (от 36 до 55%), причём этот показатель не зависел от объёма обрабатываемых сточных вод и схемы очистки. Видовой состав энтерококков, выделенных из сточных вод очистных сооружений, в целом сходен с видовым составом изолятов энтерококков, выделенных из кала, который представлен следующими видами: доминировали *E. faecium* (36 и 53% соответственно), *E. faecalis* (28 и 38%). Следующие по представленности виды, выделенные из сточных вод и кишечной микробиоты, отличались соответственно: *E. hirae* (24 и 1,2%) и *E. casseliflavus* (3 и 0,6%). *E. durans*, *E. thailandicus*, *E. avium*, *E. mundtii* представлены в порядке убывания от 2,5 до 1%, одинаково в обеих выборках. Минорные виды *E. raffinosus*, *E. moraviensis*, *E. talodatus* представлены единичными изолятами из очистных сооружений, *E. canintestini* — из кала людей. По проценту наличия изолятов энтерококков, имеющих патогенный потенциал, в обеих выборках с большим отрывом лидирует *E. faecalis* (75–80%). Гены устойчивости к ванкомицину в данной выборке не выявлены. Из патогенных генов чаще остальных встречались *gelE* (30–33% из обоих источников) и *asa I* (18–19%). Ген *esp* представлен различно (9% из очистных, 14% из кала), а ген *suA* одинаково (4,4–4,8%). Ген гиалуронидазы *hyl* выявлялся только в изолятах из очистных сооружений (2,5%), причём у всех неминорных видов (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. thailandicus*) и на разных стадиях очистки. Работа очистных сооружений не оказывала видимого влияния на процент изолятов энтерококков, имеющих патогенный потенциал и спектр генов патогенности. Из обследованных точек отбора (до очистки, после цикла очистки, активный ил, поверхностные воды) наибольший патогенный потенциал демонстрировали изоляты из активного ила.

Ограничения исследования. При изучении патогенного потенциала изолятов энтерококков из очистных сооружений Москвы и Московской области и кала практически здоровых людей проведено сравнение двух выборок, из 366 и 168 изолятов соответственно, что представляет собой достаточную референтную выборку. Выборка ограничена по географии, таким образом, выводы можно применять к очистным сооружениям Москвы и Московской области, где использовались сходные схемы очистки.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что патогенный потенциал энтерококков, выделенных из сточных вод очистных сооружений, несколько выше, чем у изолятов, выделенных из кишечной микробиоты пациентов из контрольной выборки группы практически здоровых людей. Установлено, что наибольшим патогенным потенциалом обладали изоляты, выделенные из активного ила, поступающего в аэротенк со сточными водами. При этом активный ил может выступать в роли резервуара накопления бактерий, обладающих патогенным потенциалом и потенциальным распространения их в окружающую среду.

Ключевые слова: *Enterococcus*; вирулентность; сточные воды; очистные сооружения

Соблюдение этических стандартов. Исследование биологического материала от людей одобрено Локальным независимым этическим комитетом (протокол № 98А заседания Локального независимого этического комитета ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России от 16.07.2018 г.).

Для цитирования: Пай Г.В., Ракитина Д.В., Панькова М.А., Федец З.Е., Мания Т.Р., Загайнова А.В. Сравнительная оценка патогенного потенциала энтерококков, выделенных от здоровых людей и из сточных вод. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(12): 1272–1280. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-12-1272-1280> <https://elibrary.ru/ksnjpx>

Для корреспонденции: Мания Тамари Резоевна, науч. сотр. лаб. микробиологии и паразитологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России 119121, Москва, Россия. E-mail: TManiya@cspniz.ru

Участие авторов: Пай Г.В. — концепция и дизайн исследования, выполнение экспериментальной работы, статистическая обработка, написание текста, редактирование; Ракитина Д.В. — написание текста; Панькова М.А. — сбор и обработка образцов, культивирование бактерий; Федец З.Е. — сбор и обработка образцов, культивирование бактерий; Мания Т.Р. — сбор материала, редактирование; Загайнова А.В. — концепция и дизайн исследования, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование проведено в рамках НИР «Разработка унифицированных методов, включающих отбор проб, для осуществления определения микробиологического и паразитологического загрязнения сточных вод» (шифр «Сточные воды»). Госконтракт 12.11.2021 г. № 212338810015200000000000/145.001.216.

Поступила: 31.07.2023 / Принята к печати: 15.11.2023 / Опубликовано: 28.12.2023

Galina V. Pay, Darya V. Rakitina, Marina A. Pankova, Zlata E. Fedets, Tamari R. Maniya, Anzhelika V. Zagaynova

Pathogenic potential of enterococcus isolated from healthy people and wastewater

Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121, Russian Federation;

Introduction. Efficiency of wastewater treatment plants is a key for protection of common health. At the same time, all criteria for its evaluation are concerned about the overall biomass reduction rather than on pathogens that, in low amount, can still be present in the efflux.

Purpose of the study. Therefore it seems important to evaluate the effect of purification procedures on the pathogenic potential of bacteria. In the current study, it is performed using *Enterococcus* isolates, since pathogenic strains present considerable threat for human health, causing endocarditis, infections of urogenic tract, nosocomial infections, etc.

Materials and methods. PCR was used to evaluate the presence of potentially pathogenic genes in the extracted DNA. Seven genes were tested: genes of adhesion proteins (*Esp*, *Asa1*), proteins with lytic activity (cytolysine *CylA*, hyaluronidase *hyl* and gelatinase *gelE*), and antibiotic resistance factors (*vanA*, *vanB*). Three hundred sixty six isolates from wastewater plants of Moscow agglomeration and 168 from feces of healthy people were screened.

Results. Percentage of pathogenic isolates varied in different wastewater treatment plants (from 36 to 55%), with no relation with the volumes of treated sewage and the purification scheme of the plant. Similar species were recovered from wastewater plants and feces, with *E. faecium* (36% and 53%, correspondingly) and *E. faecalis* (28% and 38%) as most abundant. *E. hirae* was presented in different numbers (24% u 1.2%) as well as *E. casseliflavus* (3% and 0,6%). *E. durans*, *E. thailandicus*, *E. avium*, *E. mundtii* were found from 2.5 to 1%, in similar amounts from both sources. Minor species *E. raffinosus*, *E. moraviensis*, *E. malodatus* presented with single isolates in wastewater plants, and *E. canintestini* – in feces. The *E. faecalis* was the leader in percentage of pathogenic potential (75–80%). The most abundant pathogenic gene was *gelE* (30–33% from both sources) and *asa1* (18–19%). *CylA* was found at similar levels (4,4–4,8%). *Esp* was found in 9% of wastewater plants isolates and in 14% from feces. *Hyl* was specific to isolates from wastewater plants (2,5%), and was present in all non-monor species (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. thailandicus*) and at different stages of water treatment. Vancomycin resistance genes were not detected.

Limitations. When studying the pathogenic potential of enterococcal isolates from wastewater treatment plants in the city of Moscow and the Moscow region and the feces of practically healthy people, two samples were compared, consisting of 366 and 168 isolates, respectively, which represents a sufficient reference sample. The sample was limited by geography, so the conclusions can be applied to wastewater treatment plants in the city of Moscow and the Moscow region, where similar treatment schemes were used.

Conclusions. The data from this study suggests the pathogenic potential of bacteria from wastewater treatment plants to be a little bit more than that of isolates from feces of healthy people. The activated sludge can be a reservoir for pathogens and can bring contamination to the environment.

Keywords: *Enterococcus*; virulence; wastewater treatment plants

Compliance with ethical standards. The study of biological material from humans was approved by the Local Independent Ethics Committee (Minutes No. 98A of the meeting of the Local Independent Ethics Committee of the Federal State Budgetary Institution “GNCC named after A.N. Ryzhykh of the Ministry of Health of Russia dated 16.07.2018).

For citation: Pay G.V., Rakitina D.V., Pankova M.A., Fedets Z.E., Maniya T.R., Zagaynova A.V. Pathogenic potential of *Enterococcus* isolated from healthy people and wastewater. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)*. 2023; 102(12): 1272–1280. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-12-1272-1280> <https://elibrary.ru/ksnjpx> (In Russ.)

For correspondence: Tamari R. Maniya, scientific researcher of Microbiology and Parasitology laboratory of the Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: TManiya@cspmrz.ru

Information about authors:

Pay G.V., <https://orcid.org/0000-0001-7086-0899>
Rakitina D.V., <https://orcid.org/0000-0003-3554-7690>
Pankova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-9133-3665>
Fedets Z.E., <https://orcid.org/0000-0002-2396-9231>
Maniya T.R., <https://orcid.org/0000-0002-6295-661X>
Zagaynova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4772-9686>

Contribution: Pay G.V. – concept and design of the study, collection and processing of material, performing the experiments, statistical processing, writing, editing; Rakitina D.V. – writing; Pankova M.A. – samples collection, bacteria cultivation; Fedets Z.E. – samples collection, bacteria cultivation; Maniya T.R. – collection and processing of material, editing; Zagaynova A.V. – concept and design of the study, editing, approval of the final version of the article. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The research was carried out within the framework of the research work “Development of unified methods, including sampling, for the determination of microbiological and parasitological contamination of wastewater” (code “Wastewater”). State contract 12.11.2021 No. 212338810015200000000000/145.001.216.

Received: July 31, 2023 / Accepted: November 15, 2023 / Published: December 28, 2023

Введение

Эффективность работы сооружений по очистке сточных вод – важнейший фактор общественного здоровья, предотвращения инфекций, защиты окружающей среды. В Российской Федерации проводятся исследования по изучению эффективности работы (и барьерной роли) очистных сооружений канализации в отношении обеззараживания сточных вод от микроорганизмов [1]. Используемые в настоящий момент показатели эффективности очистки воды от биологических объектов и органических веществ позволяют судить о количестве микроорганизмов, но не об их патогенном потенциале*. В настоящей работе предпринята попытка оценить влияние очистных сооружений на количество потенциально вирулентных изолятов оппортунистического патогена, обильно встречающегося в сточных водах, – энтерококка.

Энтерококки – грамположительные кокки, являются представителями нормальной микрофлоры кишечника и урогенитального тракта человека и животных. Вместе с тем потенциально патогенные бактерии рода *Enterococcus*, имеющие патогенный потенциал, представляют серьёзную угрозу общественному здоровью. Они являются одними из важнейших возбудителей внутрибольничных инфекций [2, 3], вызывают послеоперационные осложнения, поражения кровеносной и мочеполовой систем, инфекции в неонатальном периоде [4, 5]. Основным источником энтерококков является кишечник человека и животных, так как они выявляются в высоких концентрациях в человеческих фекалиях (10^4 – 10^6 КОЕ на один грамм сырого веса) [6], хотя и составляют менее 1% микрофлоры кишечника. Их выявление используется в качестве индикатора фекального загрязнения поверхностных вод, хотя эта практика ставится под сомнение сообщениями о возможности размножения энтерококков в почвах, на растениях, в воде, содержащей планктон и водоросли [7].

Рядом исследователей высказаны предположения, что разные экологические ниши колонизируются разными видами энтерококков. Сообщалось, что видовой состав энтерококков во внешних местах обитания (повышенное содержание *Enterococcus casseliflavus* и *Enterococcus mundtii*) отличается от такового в микрофлоре кишечника, где преобладают *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis* [8–10]. С другой стороны, есть множество свидетельств того, что видовой состав энтерококков из водных резервуаров в антропогенном окружении в целом не отличается по спектру видов и их количественному составу от выделяемых из кала здоровых людей и животных [11, 12].

Патогенными генетическими детерминантами энтерококков считаются белки, способствующие агрегации клеток, желатиназа, цитоллизин, поверхностные адгезионные белки, гиалуронидаза, а также белки, обеспечивающие антибиотикорезистентность (например, устойчивость к ванкомицину) [13].

* СанПиН 1.2.3685–21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания». М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2021.

Агрегирующий белок, продукт гена *asa1*, локализованного на плазмиде, обеспечивает конъюгацию бактериальных клеток в процессе передачи плазмид [14]. В качестве вирулентного фактора он обеспечивает адгезию и инвазию к клеткам почечных канальцев и эндокарда [15]. Ген желатиназы *gelE* кодирует внеклеточную эндопептидазу, гидролизующую коллаген и желатин и способную вызывать эндокардит у животной модели [16]. Продукт гена *cytA*, активатор цитоллизина, утяжеляет симптомы эндокардита у животной модели и парэнтеральных инфекций у человека [17, 18]. Поверхностный белок энтерококка, закодированный в гене *esp* и вовлечённый в колонизацию мочевыводящих протоков и образование биоплёнки [19, 20], рассматривается как маркер вирулентности (в том числе считается ассоциированным с ванкомицин-устойчивыми штаммами *E. faecium* [21]). Ген гиалуронидазы (*hyl*) энтерококка по сходству с другими гиалуронидазами может быть вовлечён в лизис тканей хозяина, разрушая защитные эпителиальные слои и облегчая проникновение бактерий при инфекции [22, 23].

Цель исследования – сравнительная оценка патогенного потенциала изолятов энтерококков, выделенных из образцов сточных вод, отобранных на очистных сооружениях на разных стадиях очистки, и изолятов из кишечной микрофлоры группы практически здоровых людей.

Материалы и методы

Отбор проб сточных вод. Отбор проб сточных вод проводили на четырёх очистных сооружениях Москвы и Московской области: Зеленоградские очистные сооружения (ЗОС), очистные сооружения «Южное Бутово» (ЮБОС), Люберецкие очистные сооружения (ЛОС) и Курьяновские очистные сооружения (КОС). Характеристики очистных сооружений представлены в табл. 1, схемы очистки и точки отбора образцов описаны в табл. 2. Образцы отбирали с июня по декабрь 2022 г. Отбор проб воды проводили в соответствии с МУК 4.2.1884–04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов». Объём отбора с каждой точки составлял 1 л. В качестве основного использовали фильтрационный метод (объёмы фильтрации: 1; 10 и 100 мл), а также метод прямого посева (по 100 мкл на чашку Петри (энтерококк агар) с разведением).

Отбор образцов кала. Критерии включения пациентов в контрольную группу практически здоровых: возраст старше 18 лет, отсутствие жалоб на здоровье в области желудочно-кишечного тракта, нормальный стул, отсутствие антибиотикотерапии в течение последних 3 мес. У всех пациентов получали письменное информированное согласие на сбор материала и проведение исследования.

Исследование биологического материала от людей одобрено Локальным независимым этическим комитетом (протокол № 98А заседания Локального независимого этического комитета ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России от 16.07.2018 г.).

Бактериальные изоляты. В работе исследованы 366 изолятов *Enterococcus* spp., выделенных из сточных вод четырёх

Таблица 1 / Table 1

Характеристика станций

Characteristics of wastewater treatment plants

Станция Wastewater treatment plants	Производительность, тыс. м ³ в сутки Performance, 1000 m ³ /day	Число дат отбора Number of sampling dates	Число пунктов отбора Number of sampling points	Схема очистки Treatment scheme
ЗОС / Zelenograd sewage treatment plants (ZSTP)	140	14	6	Схема (schema) 1
КОС / Kuryanovsky sewage treatment plants (KSTP)	3000	10	7	Схема (schema) 2
ЛОС / Lyubertsy sewage treatment plants (LSTP)	3000	13	8	Схема (schema) 2
ЮБОС / Yuzhnoye Butovo sewage treatment plants (SBSTP)	80	16	6	Схема (schema) 1

Таблица 2 / Table 2

Стадии очистки сточных вод на различных очистных сооружениях и точки отбора проб
Wastewater treatment stages for different sewage treatment plants (STP) and points of sampling

Точки отбора проб Sampling points	ЗОС/ЮБОС ZSTP/SBSTP	ЛОС/КОС LSTP/KSTP
Отбор после решётки Sampling after gratings (before purification)	Насосная станция / Pumping station	–
	Решётки / Gratings	Решётки / Gratings
	Аэрируемые песколовки-жироловки Aerated grit and fat chamber	Песколовки / Grit catcher
	–	Первичные отстойники / Primary settling
	Биореактор для удаления фосфора Bioreactor with phosphorous removal	–
Отбор активного ила Activated sludge sampling	Аэротенки с нитриденитрификацией Aerotanks with nitrification	Аэротенки с технологией удаления биогенных элементов Aerotanks with biogenic elements removal
	Вторичные отстойники / Secondary settling	Вторичные отстойники / Secondary settling
После цикла очистки After the whole purification treatment	Фильтры доочистки / Additional filters	–
	УФ-обеззараживание / UV-treatment	УФ-обеззараживание / UV-treatment
	Насосная станция / Pumping station	–
Водовыпуск / Water outlet		
Выводной канал / Outlet channel		
Река до водовыпуска River water upstream the STP outlet		

очистительных станций аэрации (КОС, ЛОС, ЮБОС и ЗОС) г. Москвы и Московской области, в соответствии с техническим заданием НИР «Разработка унифицированных методов, включающих отбор проб, для осуществления определения микробиологического и паразитологического загрязнения сточных вод» (Госконтракт 12.11.2021 г. № 2123 38810015200000000000/145.001.216 (шифр «Сточные воды») и 168 изолятов из кала практически здоровых людей (без

жалоб на проблемы с желудочно-кишечным трактом), выделенных в рамках выполнения государственного задания по теме НИР «Разработка технологий криоконсервации и архивирования биообразцов микробиологических ресурсов человека (шифр «Криобанк») в 2021–2022 гг.

Изоляты выделяли культуральным методом на плотных дифференциальных средах (Эндо (HiMedia), Агар ВСР (Conda), Chromocult Coliform Agar (Merk)). Идентифика-

Таблица 3 / Table 3

Олигонуклеотиды, используемые для выявления генов, ассоциированных с патогенностью энтерококков
Oligonucleotides used for PCR-testing of *Enterococcus* pathogenic genes

Ген-мишень ПЦР Target gene	Функция белка Protein function	Название олигонуклеотида Oligonucleotide name	Последовательность олигонуклеотида Oligonucleotide sequence	Размер ампликона (пн) Amplicon size (bp)	Исходная публикация Reference
<i>gelE</i>	Желатиназа (колонизация) Gelatinase (colonisation)	gelE 1	ACCCCGTATCATTGGTTT	419	[13]
		gelE 2	ACGCATTGCTTTCCATC		
<i>Esp</i>	Внеклеточный поверхностный белок, адгезия / Cell surface protein, adhesion)	esp 1	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	93	[13]
		esp 2	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA		
<i>asa1</i>	Адгезия Adhesion	asa1 1	CCAGCCAACATATGGCGGAATC	529	[13]
		asa1 2	CCTGTGCGCAAGATCGACTGTA		
<i>cytA</i>	Цитолизин Cytolysin	Cyt1	ACTCGGGGATTGATAGGC	688	[13]
		Cyt2	GCTGCTAAAGCTGCGCTT		
<i>hyl</i>	Гиалуронидаза Hyaluronidase	Hyl n1F	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276	[13]
		Hyl n1R	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA		
<i>E. faecalis</i>	Видоспецифичные олигонуклеотиды Species-specific primers	<i>E. faecalis</i> F	ATCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG	941	[22]
		<i>E. faecalis</i> R	ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT		
<i>E. faecium</i>	Видоспецифичные олигонуклеотиды Species-specific primers	<i>E. faecium</i> F	TTGAGGCAGACCAGATTGACG	658	[22]
		<i>E. faecium</i> R	TATGACAGCGACTCCGATTCC		
<i>vanA</i>	Устойчивость к антибиотикам Antibiotic resistance	vanAF	CATGAATAGAAATAAAAGTTGCAATA	1030	[22]
		vanAR	CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA		
<i>vanB</i>	Устойчивость к антибиотикам Antibiotic resistance	vanBF	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA	433	[22]
		vanBR	CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA		

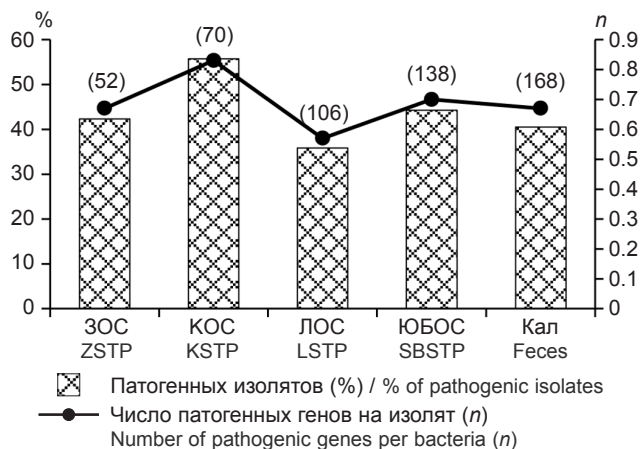


Рис. 1. Процент патогенных энтерококков от общего числа изолятов (с данной станции) и число патогенных генов на 1 бактерию в зависимости от станции очистки сточных вод в сравнении с патогенным потенциалом кала здоровых людей. В скобках указано количество изолятов, полученных из данного источника.

Fig. 1. Pathogenic potential of *Enterococcus* from various wastewater treatment plants, in comparison with the pathogenic potential of isolates from feces of healthy people. Percent of pathogenic bacteria of the *Enterococcus* isolates from the station and number of pathogenic genes per isolate. Number of isolates from each source is indicated in brackets.

цию проводили с применением матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролётной масс-спектрометрией (microflex Biotyper MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics GmbH & Co. KG).

Выделение ДНК. Культивированные бактериальные клетки ресуспендировали в 0,5 мл стерильного физраствора, собирали центрифугированием 10 мин при 3000 g, осадок промывали ещё раз стерильным физраствором, добавляли 200 мкл стерильного физраствора и лизировали 15-минутным прогреванием при 70 °С. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием 10 мин при 3000 g, а надосадочную жидкость, содержащую бактериальную ДНК, использовали для постановки ПЦР.

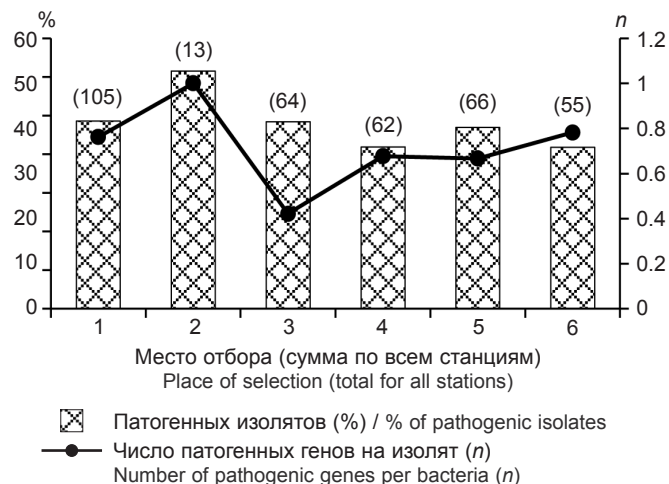
ПЦР-анализ. ПЦР-анализ производили на приборе Bio-Rad Thermal Cycler T100 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) с использованием набора реактивов для ПЦР с Taq-полимеразой (PK114, Евроген) согласно протоколу производителя.

ДНК, выделенную из изолятов энтерококков, тестировали на наличие генов, характерных для патогенных штаммов энтерококка. Детектировали три группы генов: адгезивных белков (*Esp*, *AsaI*), лизинов (цитоллизина *cytA*, гемолизина *hyl* и желатиназы *gelE*) и устойчивости к антибиотикам (*vanA*, *vanB*). Дополнительное подтверждение дифференцировки видов *E. faecalis* и *E. faecium* проводили с помощью видоспецифичных олигонуклеотидов. Используемые олигонуклеотиды перечислены в табл. 3.

Для детекции генов *asaI*, *gelE*, *hyl*, *cytA* и *esp* использовали следующую программу: 95 °С 15 мин, 30 циклов (денатурация 94 °С 1 мин, отжиг 56 °С 1 мин, достройка 72 °С 1 мин), финальная достройка 72 °С 10 мин [13]. Условия реакции для детекции генов *vanA*, *vanB* и идентификации *E. faecalis* и *E. faecium* были следующими: 94 °С 5 мин, 30 циклов (денатурация 94 °С 1 мин, отжиг при 54 °С 1 мин, достройка 72 °С 1 мин), финальная достройка 72 °С в течение 10 мин [24].

Продукты реакции детектировали методом электрофореза в 1,2% агарозном геле на трис-борат-ЭДТА буфере с окрашиванием бромистым этидием. Детекцию производили с помощью системы BioRad Gel-detection (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Статистический анализ. Анализ статистической достоверности различных представлений патогенных детер-



- 1 – До цикла очистки (после решёток) / Before purification (after gratings)
- 2 – Активный ил / Active sludge
- 3 – После цикла очистки / After the whole purification treatment
- 4 – Водовыпуск / Water outlet
- 5 – Выпускной канал / Outlet channel
- 6 – Река до водовыпуска / River water upstream the STP outlet

Рис. 2. Процент энтерококков, содержащих патогенные гены, от общего числа изолятов и число патогенных генов на 1 бактерию в зависимости от стадии очистки. В скобках указано общее число изолятов в данной категории.

Fig. 2. Percent of pathogenic bacteria from the *Enterococcus* isolates and number of pathogenic genes per isolate at various sampling points (purification stages). Number of isolates from each sampling point is shown in brackets.

минант между группами изолятов проводили с помощью программного обеспечения Statistica (Statsoft, Dell) методом критерия согласия Пирсона (χ^2).

Результаты

Распределение патогенного потенциала в зависимости от станции. Доля энтерококков, обладающих патогенным потенциалом (36–56%), и частота генов патогенности (число патогенных генов на 1 бактерию (0,57–0,83)) сильно различались между станциями (рис. 1). Оба эти показателя менялись синхронно – максимальны для КОС и минимальны для ЛОС. Интересно, что эти показатели не зависели ни от мощности станций, ни от схемы очистки, ни от числа произведённых отборов или количества выделенных изолятов (см. табл. 1).

Патогенный потенциал энтерококков в различных точках отбора образцов (на разных стадиях очистки). При оценке распределения патогенного потенциала по разным стадиям очистки выявлено следующее (рис. 2). Наибольший процент изолятов с патогенными генами содержал активный ил (62%, что даже выше, чем до очистки), а наименьший – водовыпуск (42% такой же, как в речных водах выше пункта выброса по течению).

Интересно, что процесс очистки не оказывает видимого влияния на патогенный потенциал бактерий (49% до цикла очистки, 48% после).

Распределение патогенного потенциала энтерококков в сточных водах по месяцам. Установлено (рис. 3, а), что процент изолятов, обладающих патогенным потенциалом среди энтерококков, изолируемых из образцов сточных вод, различался по месяцам – от 35 до 70%. Наименьший процент

Original article

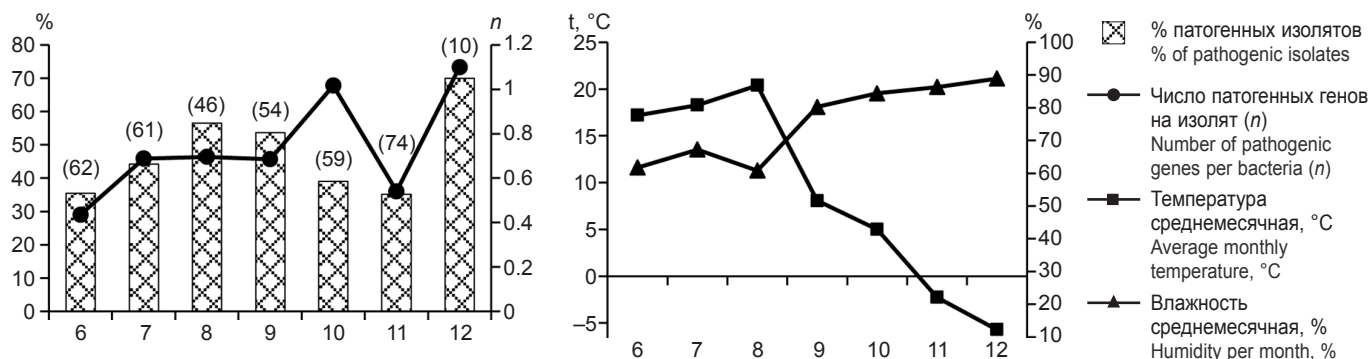


Рис. 3. Процент патогенных изолятов среди выделенных энтерококков, а также число патогенных генов на один изолят в зависимости от месяца. В скобках указано общее число изолятов в данной категории.

Fig. 3. Percent of pathogenic bacteria from the *Enterococcus* isolates and number of pathogenic genes per isolate by month. Number shown in brackets is the total number of isolates for the current month.

наблюдался для июня и ноября, а наибольшие — для августа и декабря (хотя стоит отметить, что выборка для декабря очень мала и выводы о ней нужно делать с осторожностью). Наибольшее число патогенных генов в пересчёте на изолят наблюдалось для октября и декабря, то есть именно в эти месяцы наблюдались наиболее «вирулентные» изоляты.

Следует отметить, что эти параметры не имеют достоверной корреляции со среднемесячными значениями температуры и влажности (рис. 3, б).

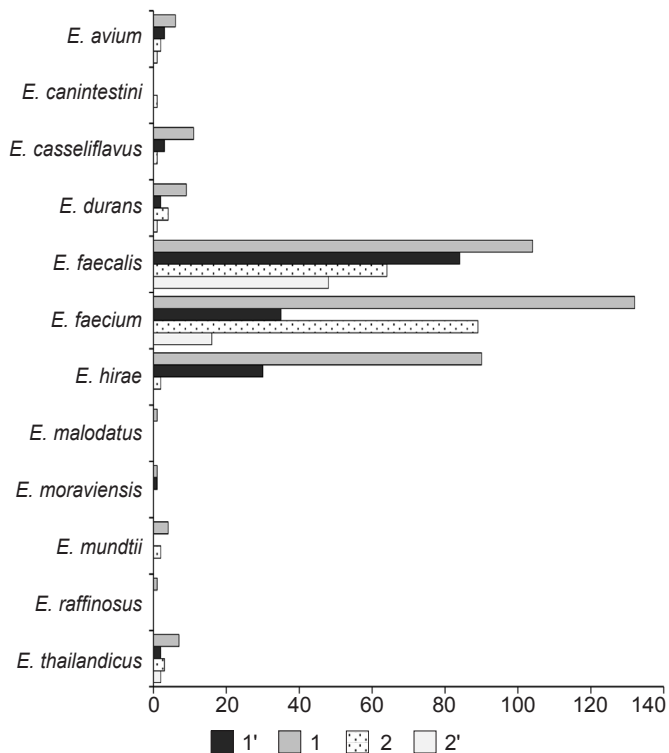


Рис. 4. Видовой состав изолятов энтерококков, полученных из разных источников. По горизонтальной оси – количество изолятов данного вида, полученных из сточных сооружений (1) и из кала здоровых людей (2). Показано также количество изолятов данного вида, у которых выявлены патогенные гены (1' и 2' соответственно).

Fig. 4. Species of *Enterococcus* isolated from various sources. Horizontal axis – number of isolates of every species, achieved from wastewater treatment plants (1) and healthy people feces (2) (shown as percent from all isolates from the category). Number of isolates with pathogenic genes is indicated correspondingly (1' and 2').

Видовое разнообразие энтерококков на очистных сооружениях. Видовой состав энтерококков из очистных сооружений в целом сходен с таковым в фекальной микробиоте группы практически здоровых людей (рис. 4): доминирующими видами являлись *E. faecalis* и *E. faecium*. Самое яркое отличие состоит в том, что среди энтерококков в сточных водах очистных сооружений гораздо больше представлены виды *E. hirae* (25% в сравнении с 1% в кале) и *E. casseliflavus* (3% в сравнении с 0,6%). В настоящей работе *E. hirae* выявлен на всех стадиях водоочистки, включая и очищенные воды (водовыпуск, водосбросный канал, река после водосброса), и поверхностные воды (в реке выше по течению относительно водовыпуска).

Существенных отличий в видовом составе между разными очистными станциями не обнаружено (данные не демонстрируются).

Среди доминирующих видов наибольший процент изолятов с патогенными генами выявлен среди *E. faecalis* (81% для очистных сооружений и 75% для кала), на втором месте находился *E. faecium* (26 и 15% соответственно).

Спектр патогенных генов в изолятах энтерококков. В настоящей работе методом ПЦР оценивали наличие в ДНК изолятов энтерококков 7 различных патогенных генов. Гены устойчивости к антибиотикам (ванкомицину) в настоящей выборке не выявлены. Спектр патогенных генов изолятов из очистных сооружений в целом сходен с таковым у изолятов из кала здоровых людей (рис. 5): чаще других встречался ген желатиназы, реже – гены адгезинов, ещё реже – ген цитолитина. Отличие заключается в том, что в изолятах из сточных сооружений выявлялся ген гиалуронидазы (*hyl*).

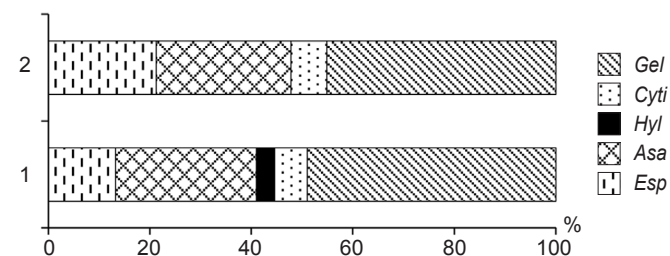


Рис. 5. Процентный спектр патогенных генов, выявляемых у изолятов из очистных сооружений (1) и кала здоровых людей (2). Указаны проценты случаев выявления данного гена от всех случаев выявления патогенных генов.

Fig. 5. Percent of pathogenic genes found in isolates from wastewater treatment plants (1) and feces of healthy people (2). Percent of cases of each gene identification from all cases of pathogenic genes revealed is shown.

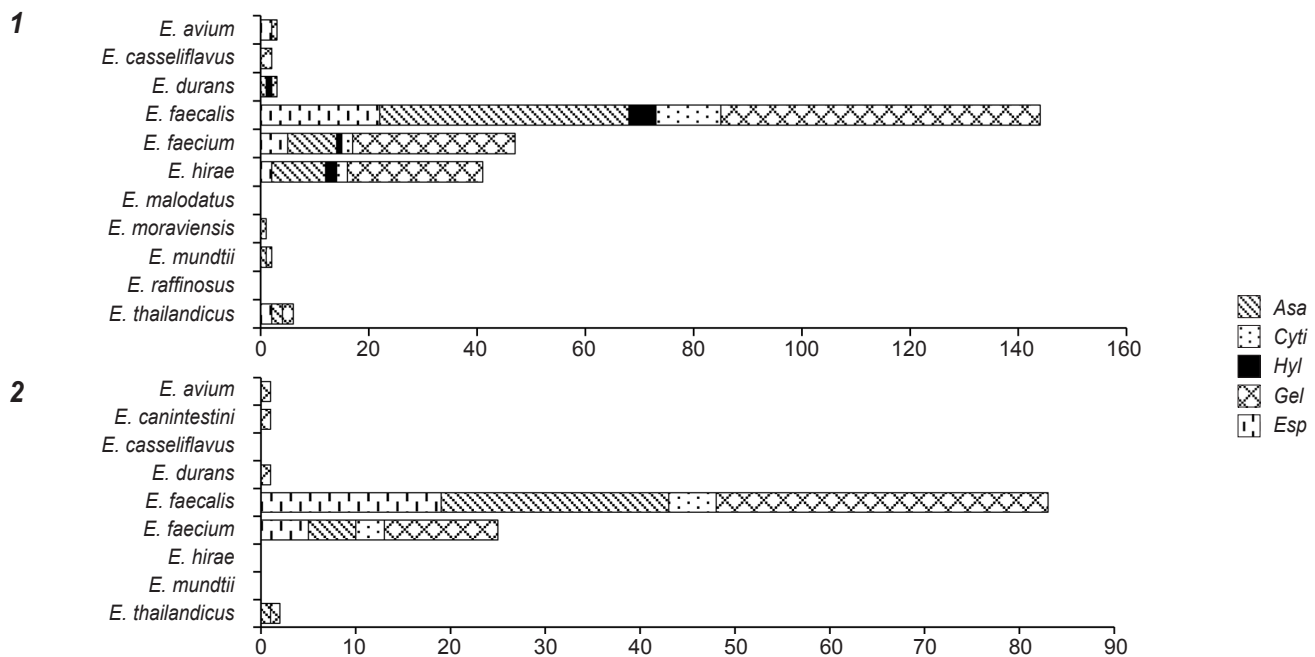


Рис. 6. Патогенные гены, выявленные у различных видов энтерококков, изолированных из очистных сооружений (1) и кала здоровых людей (2). Указано число случаев выявления каждого гена.

Fig. 6. Pathogenic genes found in DNA of *Enterococcus* isolated from wastewater treatment plants (1) and feces of healthy people (2). Number of cases of each gene found is shown.

Доминирующие виды энтерококков из очистных сооружений сходны по составу выявляемых у них патогенных генов (рис. 6). Ген *hyl* встречался у всех доминирующих видов (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*), а также у *E. durans*. Эти изоляты выделены из образцов с разных стадий очистки (4 – до очистки, 2 – после цикла очистки, 2 – активный ил, 1 – поверхностная вода до выпуска обеззараженных сточных вод). Сходным образом у *E. faecalis* и *E. faecium* из кала встречались одни и те же патогенные гены со сходной частотой (см. рис. 6).

Обсуждение

Влияние работы очистных сооружений на патогенный потенциал микробиоты сточных вод – вопрос исследования и дебатов во всём мире. По данным литературы имеются сообщения о том, что работа очистных сооружений может как снижать, так и повышать [25, 26] процент патогенных среди выявляемых микроорганизмов (безусловно, при этом снижая количество бактериальных КОЕ). В нашей работе существенного изменения процента патогенов не обнаружено.

Широко обсуждается роль активного ила как возможного накопителя и резервуара патогенов, особенно в связи с изъятием его из пределов очистных сооружений и использованием для удобрения сельскохозяйственных земель. Сообщается, например, о том, что колиформные бактерии способны налипать на частицы активного ила и образовывать биоплёнку, что повышает время их выживания в отстойниках и снижает эффективность очистных мероприятий [26]. Есть наблюдения о том, что ряд генов антибиотикорезистентности показывают максимальную степень выявления именно среди изолятов из активного ила [27]. Наши данные соответствуют этим наблюдениям.

Различные виды энтерококков, обнаруженные в исследуемой выборке изолятов, отличаются по распространённости в различных экологических нишах. Результаты нашего анализа в целом соответствуют данным литературы.

E. faecalis и *E. faecium*, доминирующие среди выявляемых изолятов, являются в то же время наиболее клинически значимыми изолятами, вызывая подавляющее большинство энтерококковых инфекций у человека [28]. Таким образом, можно заключить, что именно эти виды вносят максимальный вклад в патогенный потенциал энтерококков в сточных водах. *E. hirae*, встречавшийся в нашей выборке изолятов из сточных вод в десять раз чаще, чем в кале, по данным литературы, действительно выделяется как один из доминирующих видов из сточных вод [29]. У людей он выявляется достаточно редко (как правило, у больных) и известен в основном как микроорганизм, вызывающий инфекции у животных [30, 31]. *E. casseliflavus* редко выделяется из клинических образцов (около 1%) и является оппортунистическим патогеном, способным вызывать очень редкие, но тяжёлые инфекции [32]. Данный вид выявляется у животных, на растениях, а в поверхностных водах он обнаруживается в таком же процентном содержании относительно других видов, как и в настоящем исследовании, – около 3% [33].

Патогенный фактор (*Hyl*), в данном исследовании выявлявшийся только в изолятах из очистных сооружений, в ряде других исследований обнаруживался в клинических изолятах из внекишечных инфекций, а также в изолятах из сточных вод, хотя разные исследования показывают разный процент выявления (3,2–20%) [34, 35]. В изолятах из фекалий здоровых людей процент обнаружения низкий – максимум в 2–5% случаев [36, 37], что не противоречит данным настоящей работы.

Ограничения исследования. При изучении патогенного потенциала изолятов энтерококков из очистных сооружений Москвы и Московской области и кала практически здоровых людей проведено сравнение двух выборок, из 366 и 168 изолятов соответственно, что представляет собой достаточную референтную выборку. Выборка ограничена по географии, таким образом, выводы можно применять к очистным сооружениям Москвы и Московской области, где применялись сходные схемы очистки.

Заклучение

В исследованной выборке изолятов *Enterococcus*, полученных из сточных вод и кишечной микробиоты людей из контрольной выборки, доминирующими видами оказались *E. faecalis* и *E. faecium*, а наиболее частыми вирулентными факторами — желатиназа и адгезивный белок. Самая существенная разница между выборками изолятов, выделенных из сточных вод очистных сооружений и из кала, заключалась в выявлении в сточных водах *E. hirae*. Ген гиалуронидазы (*hyl*) обнаружен только у изолятов из сточных вод. Для разных очистных сооружений различался процент изолятов, обладающих патогенным потенциалом и числом вирулентных генов в расчёте на изолят. При этом различия в спектре вирулентных генов не выявлено. Также установлено, что

наибольшим патогенным потенциалом обладали изоляты, выделенные из активного ила, поступающего в аэротенк со сточными водами. Полученные данные свидетельствуют о том, что патогенный потенциал у бактерий рода *Enterococcus* на очистных сооружениях несколько выше, чем у изолятов, выделенных из кишечной микробиоты из группы контроля практически здоровых людей. Состав активного ила во многом определяется составом стоков, поступающих в аэротенк, в составе которого могут присутствовать простейшие, актиномицеты, бактерии, инфузории, амёбы, нематоды и т. д., так как именно они являются питательной средой для жизнедеятельности микроорганизмов. При этом активный ил может выступать в роли резервуара накопления бактерий, обладающих патогенным потенциалом, с риском потенциального распространения их в окружающую среду.

Литература

(п.п. 2–4, 6–37 см. References)

- Журавлёв П.В., Хуторянина И.В., Марченко Б.И. Барьерная роль очистных сооружений канализации в отношении санитарно-показательных и патогенных бактерий, паразитарных агентов на примере южной зоны России. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(10): 1070–6. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-10-1070-1076> <https://elibrary.ru/rmypum>
- Оганян К.А., Аржанова О.Н., Заиорская С.Л., Савичева А.М. Энтерококки и их роль в перинатальной патологии. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2015; 64(5): 48–54. <https://elibrary.ru/tgpsyu>

References

- Zhuravlev P.V., Khutoryanina I.V., Marchenko B.I. The barrier role of sewage treatment plants in relation to sanitary-indicative and pathogenic bacteria, parasitic agents on the example of the southern zone of Russia. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)*. 2021; 100(10): 1070–6. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-10-1070-1076> <https://elibrary.ru/rmypum> (in Russian)
- Zhao-Fleming H.H., Wilkinson J.E., Larumbe E., Dissanaik S., Rumbaugh K. Obligate anaerobes are abundant in human necrotizing soft tissue infection samples – a metagenomics analysis. *APMIS*. 2019; 127(8): 577–87. <https://doi.org/10.1111/apm.12969>
- Libertucci J., Bassis C.M., Cassone M., Gibson K., Lansing B., Mody L., et al. Bacteria detected in both urine and open wounds in nursing home residents: a pilot study. *mSphere*. 2019; 4(4): e00463–19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00463-19>
- Shrestha L.B., Baral R., Poudel P., Khanal B. Clinical, etiological and antimicrobial susceptibility profile of pediatric urinary tract infections in a tertiary care hospital of Nepal. *BMC Pediatr*. 2019; 19(1): 36. <https://doi.org/10.1186/s12887-019-1410-1>
- Oganyan K.A., Arzhanova O.N., Zatsiorskaya S.L., Savicheva A.M. Enterococci and their role in perinatal pathology. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2015; 64(5): 48–54. <https://elibrary.ru/tgpsyu> (in Russian)
- Layton B.A., Walters S.P., Lam L.H., Boehm A.B. Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol*. 2010; 109(2): 539–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x>
- Boehm A.B., Sassoubre L.M. Enterococci as indicators of environmental fecal contamination. In: Gilmore M.S., Clewell D.B., Ike Y., Shankar N., eds. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014.
- Bahirathan M., Puente L., Seyfried P. Use of yellow-pigmented enterococci as a specific indicator of human and nonhuman sources of faecal pollution. *Can. J. Microbiol*. 1998; 44(11): 1066–71. <https://doi.org/10.1139/cjm-44-11-1066>
- Ferguson D.M., Moore D.F., Getrich M.A., Zhouandai M.H. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. *J. Appl. Microbiol*. 2005; 99(3): 598–608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02660.x>
- Wheeler A.L., Hartel P.G., Godfrey D.G., Hill J.L., Segars W.I. Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J. Environ. Qual*. 2002; 31(4): 1286–93. <https://doi.org/10.2134/jeq2002.1286>
- Ben Said L., Klibi N., Lozano C., Dziri R., Ben Slama K., Boudabous A., et al. Diversity of enterococcal species and characterization of high-level aminoglycoside resistant enterococci of samples of wastewater and surface water in Tunisia. *Sci. Total Environ*. 2015; 530–531: 11–7. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.091>
- Łuczkiwicz A., Jankowska K., Kurlenda J., Olańczuk-Neyman K. Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from surface water. *Water Sci. Technol*. 2010; 62(2): 466–73. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.909>
- Vankerkhoven V., Van Outgaerden T., Vael C., Lammens C., Chapelle S., Rossi R., et al. 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*. *J. Clin. Microbiol*. 2004; 42(10): 4473–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004>
- Galli D., Lottspeich F., Wirth R. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol. Microbiol*. 1990; 4(6): 895–904. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00662.x>
- Guzmán C.A., Pruzzo C., LiPira G., Calegari L. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infect. Immun*. 1989; 57(6): 1834–8. <https://doi.org/10.1128/iai.57.6.1834-1838.1989>
- Gutschik E., Møller S., Christensen N. Experimental endocarditis in rabbits. 3. Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of *Streptococcus faecalis*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B*. 1979; 87(6): 353–62.
- Chow J.W., Thal L.A., Perri M.B., Vazquez J.A., Donabedian S.M., Clewell D.B., et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1993; 37(11): 2474–7. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.11.2474>
- Ike Y., Hashimoto H., Clewell D.B. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J. Clin. Microbiol*. 1987; 25(8): 1524–8. <https://doi.org/10.1128/jcm.25.8.1524-1528.1987>
- Shankar N., Lockatell C.V., Baghdadyan A.S., Drachenberg C., Gilmore M.S., Johnson D.E. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun*. 2001; 69(7): 4366–72. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4366-4372.2001>
- Toledo-Arana A., Valle J., Solano C., Arrizubieta M.J., Cucarella C., Lamata M., et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001; 67(10): 4538–45. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4538-4545.2001>
- Woodford N., Soltani M., Hardy K.J. Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. *Lancet*. 2001; 358(9281): 584. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05726-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05726-9)
- Kariyama R., Mitsuhashi R., Chow J.W., Clewell D.B., Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol*. 2000; 38(8): 3092–5. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.8.3092-3095.2000>
- Loge F.J., Emerick R.W., Ginn T.R., Darby J.L. Association of coliform bacteria with wastewater particles: impact of operational parameters of the activated sludge process. *Water Res*. 2002; 36(1): 41–8. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00204-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00204-4)
- Zhang Y., Marrs C.F., Simon C., Xi C. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Sci. Total Environ*. 2009; 407(12): 3702–6. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.02.013>
- Hynes W.L., Walton S.L. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett*. 2000; 183(2): 201–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08958.x>
- Rice L.B., Carias L., Rudin S., Vael C., Goossens H., Konstabel C., et al. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J. Infect. Dis*. 2003; 187(3): 508–12. <https://doi.org/10.1086/367711>
- Auerbach E.A., Seyfried E.E., McMahon K.D. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Res*. 2007; 41(5): 1143–51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.045>
- Fiore E., Van Tyne D., Gilmore M.S. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol. Spectr*. 2019; 7(4): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018>
- Ferreira da Silva M., Tiago I., Verissimo A., Boaventura R.A., Nunes O.C., Manaia C.M. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol*. 2006; 55(2): 322–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00032.x>

30. Salem-Bekhit F.F., Posch J., Feierl G., Wüst G., Haas D., Ruckebauer G., et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.* 2003; 37(8): 1685–90. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00569-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00569-9)
31. Piccinini D., Bernasconi E., Di Benedetto C., Martinetti Lucchini G., Bongiovanni M. Enterococcus hirae infections in the clinical practice. *Infect. Dis. (Lond.)*. 2023; 55(1): 71–3. <https://doi.org/10.1080/23744235.2022.2125066>
32. Yoshino Y. Enterococcus casseliflavus infection: a review of clinical features and treatment. *Infect. Drug Resist.* 2023; 16: 363–8. <https://doi.org/10.2147/IDR.S398739>
33. Alipour M., Hajiesmaili R., Talebjannat M., Yahyapour Y. Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from the river and coastal waters in northern Iran. *ScientificWorldJournal*. 2014; 2014: 287458. <https://doi.org/10.1155/2014/287458>
34. Gotkowska-Płachta A. The prevalence of virulent and multidrug-resistant Enterococci in river water and in treated and untreated municipal and hospital wastewater. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2021; 18(2): 563. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020563>
35. Jahangiri S., Talebi M., Eslami G., Pourshafie M.R. Prevalence of virulence factors and antibiotic resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from sewage and clinical samples in Iran. *Indian J. Med. Microbiol.* 2010; 28(4): 337–41. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.71828>
36. Jannati E., Amirmozaffari N., Saadatmand S., Arzanlou M. Faecal carriage of high-level aminoglycoside-resistant and ampicillin-resistant *Enterococcus* species in healthy Iranian children. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2020; 20: 135–44. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.022>
37. Motallebi M., Seyyedi Z.S., Azadchehr M.J. Genetic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of *Enterococcus faecalis* isolates obtained from stool samples of hospitalized patients. *Jundishapur. J. Microbiol.* 2022; 15(6): e121379. <https://doi.org/10.5812/jjm-121379>