

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ВІШОВАН ЮРІЙ ЮРІЙОВИЧ

УДК 619:616.98:579.861.2:636(477)

**ДИСЕРТАЦІЯ
БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ
STARPHYLOCOCCUS ТА РОЗРОБКА ЗАСОБІВ ЇХ ІНДИКАЦІЇ**

Спеціальність 211 – ветеринарна медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають
посилання на відповідне джерело _____Ю.Ю. Вішован

Науковий керівник:
Ушкалов Валерій Олександрович,
доктор ветеринарних наук, професор
академік НААН України

Київ – 2023

АНОТАЦІЯ

Вішован Ю.Ю. Біологічні властивості бактерій роду *Staphylococcus* та розробка засобів їх індикації. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина. Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ 2023.

У дисертаційній роботі висвітлено результати досліджень культурально-морфологічних, ферментативних та біохімічних властивостей бактерій роду *Staphylococcus*, виділених зі зразків біологічного матеріалу від свійських тварин та людини. Вивчено чутливість до антибіотиків ізолятів стафілококів отриманих з молока хворих на мастит корів, від свиней, котів, собак та людей. Досліджена здатність виділених бактерій роду *Staphylococcus* до формування біоплівки. Проведено молекулярно-генетичні дослідження з метою виявлення детермінант патогенності – генів, що викликають стійкість до метициліну та інших β - лактамних антибіотиків та утворення біоплівки. З'ясовано ефективність застосування різних культуральних середовищ для відновлення ліофілізованих штамів стафілококів та накопичення їх біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів.

Встановлено що частота виділення стафілококів становила: з молока 41,0%, від свиней 74,1%, собак і котів 56,8%. Коагулазопозитивні стафілококи переважали серед ізолятів виділених від свиней (45,3%) і людей (57,9%), а коагулазонегативні – виділені з молока (94,2%) та від тварин-компаньйонів (92,0%). Частіше спроможність до гемолізу еритроцитів виявлено у стафілококів виділених від свиней (71,0%), тварин-компаньйонів (84,0%) та людей (100%).

Встановлено що полірезистентні стафілококи складали - 34,2% культур виділених з молока; понад 50,0%, штамів виділених від свиней; 32% - тварин-компаньйонів та 21,0% від людей. Під час дослідження стафілококів виділених з молока встановлено, що коагулазопозитивний штам «133»

володів одночасною резистентністю до 9 з 13 досліджених антибіотиків за виключенням ванкоміцину, хлорамфеніколу, гентаміцину та тобраміцину. Інший коагулазопозитивний штам «136» був стійким до 5 з 13 досліджуваних антибіотиків за виключенням оксациліну, ванкоміцину, хлорамфеніколу, тобраміцину, норфлуксацину, ципрофлуксацину, тетрацикліну, доксицикліну. Коагулазонегативний штам «114» був стійкий до 9 з 13 досліджених антибіотиків а саме до: бензилпеніциліну, оксациліну, ампіциліну, еритроміцину, тетрацикліну, доксицикліну, норфлуксацину, ципрофлуксацину, хлорамфеніколу.

Необхідно відзначити, що серед досліджених 18 коагулазопозитивних *Staphylococcus spp.* виділених від свиней резистентними до бензилпеніциліну, ампіциліну, норфлуксацину та ципрофлуксацину були 100% культур; до спарфлуксацину - 97%, до офлуксацину - 95,3%, до левофлуксацину - 93,3%, до лінкоміцину - 92%, до гатіфлуксацину - 87% культур, ломефлуксацину - 87% культур, до пефлуксацину 70% помірно резистентних та резистентних культур, до тетрацикліну 52%, до доксицикліну - 28,5%, до кліндаміцину - 42%, до оксациліну помірно стійкими і стійкими 9%. Аналогічна ситуація щодо поширення резистентних ізолятів відмічалась і серед групи коагулазонегативних *Staphylococcus spp.* виділених від свиней.

З 25 досліджених стафілококів виділені штами від котів і собак володіли множинною резистентністю до двох і більше груп антибіотиків. Так виділено від котів коагулазонегативний штам «17» який був резистентним до 10 з 13 досліджуваних антибіотиків за виключенням левофлуксацину, фузидієвої кислоти та був помірно резистентним до доксициліну. Також від котів виділено резистентний до 9 з 13 досліджуваних антибіотиків окрім хлорамфеніколу та групи фторхінолонів штам «30». 35,7% виділених від котів штамів були чутливими до всіх досліджуваних груп антибіотиків.

Два виділені від собак коагулазопозитивні штами проявляли різну резистентність. Так, штам «19» був чутливий до бензилпеніциліну, ампіциліну, оксациліну еритроміцину та водночас стійкий до 9 інших

антибіотиків; штам «33» був резистентний до бензилпеніциліну, гентаміцину, тобраміцину та фузидієвої кислоти і водночас чутливий до решти 9 антибіотиків. Серед коагулазонегативних штамів виділених від собак один штам «38» був резистентний до 12 досліджуваних антибіотиків окрім за виключенням доксицикліну. Виділено також один штам «25» резистентний до групи пеніцилінів та еритроміцину і два штами «23» «36» резистентні до групи пеніцилінів. Лише 27,2% досліджених ізолятів стафілококів були чутливими до антибіотиків із всіх груп.

Провівши дослідження результатів вивчення стійкості до антибактеріальних препаратів 19 штамів стафілококів виділених від пацієнтів однієї з лікарень з ознаками нозокоміальних бактеріальних інфекцій було з'ясовано що, до бензилпеніциліну стійкими були 72,7% (8 з 11) коагулазопозитивних та 100% коагулазонегативних (8) культур стафілококів.

До оксациліну стійкими було 21,1% досліджених штамів (1 - коагулазопозитивний та 3 коагулазонегативних). Коагулазопозитивний штам «2» проявляв одночасну стійкість до антибіотиків групи пеніцилінів, макролідів та фузидієвої кислоти. Коагулазонегативні стафілококи «14» «19» були резистентними до 12 досліджуваних антибіотиків за виключенням ванкоміцину та хлорамфеніколу, а штам «17» - був резистентними до 11 досліджуваних антибіотиків окрім доксицикліну, ванкоміцину та хлорамфеніколу.

Досліджено високу здатність до утворення біоплівки стафілококами виділеними від тварин компаньйонів (88,0%) та від хворих людей (68,4%), Формували біоплівки низької щільності 28,5% та не утворення її взагалі 17,2% ізолятів, виділених з молока. Стафілококи виділені з молока хворих на мастит корів, фенотипово утворювати біоплівку високої (20,0%), середньої (34,3%) та низької (28,5%) щільності. Водночас (17,2%) стафілококів не утворювали біоплівки взагалі.

Виділені від свиней і обрані для подальших досліджень 10 стафілококів у 100% випадків виявили фенотипову спроможність до біоплівкоутворення,

зокрема біоплівку високої щільності утворювали 10,0%, а 90,0% стафілококів утворювали біоплівку середньої щільності.

Що стосується фенотипової здатності до утворення біоплівок то у 100% досліджених нами ізолятів стафілококів виділених від тварин-компаньйонів виявлено спроможність до утворення біоплівок, частіше - високої щільності 88,0%, решта 12,0% - формували біоплівки середньої щільності.

Під час дослідження стафілококів отриманих від людей на виявлення фенотипової здатності до формування біоплівок встановлено що серед цієї групи штамів біоплівки високої щільності були спроможні утворювати 68,4%, а біоплівки середньої щільності - 31,6%.

Виявлено наявність у досліджуваних стафілококів детермінант патогенності – генів, носія стійкості до метициліну та інших β -лактамних антибіотиків *mec A* та гену *femB* що сприяє підвищенню стійкості у 2,8% з молока, 10,0% від свиней, 26,3% від людей. У стафілококів виділених від тварин компаньйонів дослідні гени не виявлено.

Встановлено присутність у досліджуваних стафілококів детермінант патогенності – генів, що беруть участь в формуванні біоплівок (*ica D*, *ica A*, *ica AB*) у 20,0% з молока, 10,0% від свиней, 9,0% від тварин-компаньйонів, 78,9% від людей.

Встановлено, що в процесі сублімації та кріоконсервації культур *Staphylococcus aureus* втрати життєздатних мікробних клітин становили 99,98%. Найбільш високу продуктивність у відновлених культур було отримано за застосування Серцево-мозкового бульйону (концентрацію живих мікробних клітин у дослідних культур реєстрували $6,4 \times 10^9$ КУО/см³). Продуктивність культури *S. aureus* за застосування інших середовищ була нижчою на 64 %, 69 % та 36 % відповідно. Таким чином експериментально обґрунтовано застосування культуральних середовищ серцево-мозковий бульйон та триптон-соевий бульйон для відновлення ліофілізованих

стафілококів та накопичення бактеріальної біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів.

Аналіз проведених результатів досліджень дає підстави для проведення моніторингу із застосуванням мікробіологічних та молекулярно-генетичних методів для виявлення циркуляції потенційно небезпечних культур стафілококів серед тварин і людей та визначення генетичних маркерів патогенності.

Ключові слова: *Staphylococcus spp.*, біологічні властивості, антибіотикорезистентність, метицилінрезистентний стафілокок, коагулазопозитивний стафілокок, коагулазонегативні стафілококи формування біоплівки, ген *tes A*, полімеразно-ланцюгова реакція, ліофілізація, молоко, свині, собаки і коти, зоонози.

ANNOTATION

Vishovan Yu.Yu. Biological properties of bacteria of the genus *Staphylococcus* and development of means of their indication - Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 211 - veterinary medicine. National University of Bioresources and Nature Management of Ukraine, Kyiv 2023.

The results of studies of cultural-morphological, enzymatic and biochemical properties of bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from samples of biological material from domestic animals and humans are highlighted in the dissertation. The sensitivity to antibiotics of staphylococcal isolates obtained from the milk of cows with mastitis, from pigs, cats, dogs and humans was studied. The ability of selected bacteria of the genus *Staphylococcus* to form biofilms was studied. Molecular genetic studies were conducted in order to identify determinants of pathogenicity - genes that cause resistance to methicillin and the formation of biofilms. The effectiveness of the use of different culture media for the recovery of

lyophilized strains of staphylococci and the accumulation of their biomass for the purpose of producing standard antigens has been clarified.

It was established that the frequency of staphylococci release was: from milk 41.0%, from pigs 74.1%, dogs and cats 56.8%. Coagulase-positive staphylococci predominated among isolates isolated from pigs (45.3%) and humans (57.9%), while coagulase-negative ones were isolated from milk (94.2%) and from companion animals (92.0%). More often, the ability to hemolysis of erythrocytes was found in staphylococci isolated from pigs (71.0%), companion animals (84.0%) and humans (100%). It was established that polyresistant staphylococci made up 34.2% of cultures isolated from milk; more than 50.0%, strains isolated from pigs; 32% - companion animals and 21.0% from people. During the study of staphylococci isolated from milk, it was established that the coagulase-positive strain "133" had simultaneous resistance to 9 out of 13 studied antibiotics, excluding vancomycin, chloramphenicol, gentamicin and tobramycin. Another coagulase-positive strain "136" was resistant to 5 out of 13 studied antibiotics, excluding oxacillin, vancomycin, chloramphenicol, tobramycin, norfloxacin, ciprofloxacin, tetracycline, doxycycline. Coagulase-negative strain "114" was resistant to 9 out of 13 studied antibiotics, namely: benzylpenicillin, oxacillin, ampicillin, erythromycin, tetracycline, doxycycline, norfloxacin, ciprofloxacin, chloramphenicol.

It should be noted that among the studied 18 coagulase-positive *Staphylococcus* spp. 100% of cultures isolated from pigs were resistant to benzylpenicillin, ampicillin, norfloxacin and ciprofloxacin; to sparfloxacin - 97%, to ofloxacin - 95.3%, to levofloxacin - 93.3%, to lincomycin - 92%, to gatifloxacin - 87% of cultures, lomefloxacin - 87% of cultures, to pefloxacin 70% of moderately resistant and resistant cultures, to tetracycline 52%, to doxycycline - 28.5%, to clindamycin - 42%, to oxacillin moderately resistant and resistant 9%. A similar situation regarding the distribution of resistant isolates was noted among the group of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from pigs. Of the 25 studied staphylococci, isolated strains from cats and dogs had multiple resistance

to two or more groups of antibiotics. Thus, the coagulase-negative strain "17" was isolated from cats, which was resistant to 10 out of 13 studied antibiotics with the exception of levofloxacin, fusidic acid and was moderately resistant to doxycillin. Also, strain "30" resistant to 9 out of 13 studied antibiotics, except for chloramphenicol and fluoroquinolones, was isolated from cats. 35.7% of the strains isolated from cats were sensitive to all studied groups of antibiotics.

Two coagulase-positive strains isolated from dogs showed different resistance. Thus, strain "19" was sensitive to benzylpenicillin, ampicillin, oxacillin, erythromycin and at the same time resistant to 9 other antibiotics; strain "33" was resistant to benzylpenicillin, gentamicin, tobramycin and fusidic acid and at the same time sensitive to the remaining 9 antibiotics. Among coagulase-negative strains isolated from dogs, one strain "38" was resistant to 12 studied antibiotics except doxycycline. One strain "25" resistant to the group of penicillins and erythromycin and two strains "23" "36" resistant to the group of penicillins were also isolated. Only 27.2% of studied staphylococcal isolates were sensitive to antibiotics from all groups.

After conducting a study of the results of the study of resistance to antibacterial drugs of 19 strains of staphylococci isolated from patients of one of the hospitals with signs of nosocomial bacterial infections, it was found that 72.7% (8 out of 11) of coagulase-positive and 100% of coagulase-negative (8) cultures were resistant to benzylpenicillin staphylococci. 21.1% of the studied strains were resistant to oxacillin (1 - coagulase-positive and 3 coagulase-negative). The coagulase-positive strain "2" showed simultaneous resistance to penicillin antibiotics, macrolides, and fusidic acid. Coagulase-negative staphylococci "14" "19" were resistant to 12 studied antibiotics except vancomycin and chloramphenicol, and strain "17" was resistant to 11 studied antibiotics except doxycycline, vancomycin and chloramphenicol.

The high ability to form biofilms of staphylococci isolated from companion animals (88.0%) and from sick people (68.4%) was studied. 28.5% formed biofilms of low density, and 17.2% of isolates isolated from milk did not form

biofilms at all. . Staphylococci isolated from the milk of cows suffering from mastitis, phenotypically form a biofilm of high (20.0%), medium (34.3%) and low (28.5%) density. At the same time (17.2%) staphylococci did not form biofilms at all.

10 staphylococci isolated from pigs and selected for further research showed phenotypic ability to form biofilm in 100% of cases, in particular, 10.0% formed a biofilm of high density, and 90.0% of staphylococci formed a biofilm of medium density.

As for the phenotypic ability to form biofilms, the ability to form biofilms was found in 100% of the staphylococcal isolates we studied isolated from companion animals, more often - high density 88.0%, the remaining 12.0% - formed biofilms of medium density.

During the study of staphylococci obtained from humans to identify the phenotypic ability to form biofilms, it was established that among this group of strains, 68.4% were able to form high-density biofilms, and 31.6% were able to form medium-density biofilms.

The presence of determinants of pathogenicity in the studied staphylococci - genes, the carrier of resistance to methicillin and other β -lactam antibiotics *mec A* and the *femB* gene, which contributes to increased resistance in 2.8% from milk, 10.0% from pigs, 26.3% from humans . No experimental genes were detected in staphylococci isolated from companion animals.

The presence of pathogenicity determinants - genes involved in the formation of biofilms (*ica D*, *ica A*, *ica AB*) in the studied staphylococci was established in 20.0% from milk, 10.0% from pigs, 9.0% from companion animals, 78.9% of people. It was established that in the process of sublimation and cryopreservation of *Staphylococcus aureus* cultures, the loss of viable microbial cells was 99.98%. The highest productivity in reconstituted cultures was obtained with the use of Heart-brain broth (the concentration of live microbial cells in experimental cultures was recorded at 6.4×10^9 CFU/cm³). Productivity of *S. aureus* culture using other media was lower by 64%, 69% and 36%, respectively.

In this way, the use of culture media heart-brain broth and tryptone-soy broth for recovery of lyophilized staphylococci and accumulation of bacterial biomass for the purpose of production of standard antigens was experimentally substantiated.

The analysis of the research results provides grounds for monitoring using microbiological and molecular genetic methods to detect the circulation of potentially dangerous staphylococcal cultures among animals and humans and to determine genetic markers of pathogenicity.

Key words: Staphylococcus spp., biological properties, antibiotic resistance, methicillin-resistant staphylococcus, coagulase-positive staphylococcus, coagulase-negative staphylococci, biofilm formation, gene mec A, polymerase chain reaction, lyophilization, milk, pigs, dogs and cats, zoonosis.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України які входять до

міжнародних наукометричних баз даних:

1. Вішован Ю.Ю. Дослідження на вміст *Staphylococcus* spp молока від хворих на субклінічний мастит корів. Наукові доповіді НУБіП України 2017. №6(70). *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати, сформульовано висновки та підготовлено статтю).*
2. **Вішован Ю.Ю.,** Ушкалов В.О. Поширення стафілококів та захворювань зумовлених ними. *Вісник аграрної науки.* 2018. № 2(779) 36-42 с. *(Здобувачем взято участь у аналізі літературних даних, формулюванні висновків та написанні статті).*
3. **Vishovan, Y.,** Ushkalov, V., Vygovska, L., Machuskyu, O., Hranat A., Shaiko, A., Boianovskiy, S. Biological Properties Of Staphylococci Derived From Cats And Dogs. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences.* 2020. 11(3): 56–64. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати, сформульовано висновки та підготовлено статтю).*

4. Ushkalov, V., Vygovska, L., Ushkalov, A., Boianovskiy, S., Hranat A., Tereshchenko, S., Davydovska, L., **Vishovan, Y.** A Study Of The Efficiency Of Culture Media For The Recovery Of Lyophilized Pathogenic Bacteria. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*. 2021. 12(1): 40–50. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати, сформульовано висновки та підготовлено статтю).*

Статті у періодичних наукових виданнях інших держав

5. **Vishovan, Y.**, Ushkalov, V., Vygovska, L., Ishchenko L., Salmanov A., Bilan A., Kalakailo L., Hranat A., Boianovskiy, S. Biofilm formation and antibiotic resistance in staphylococcus isolated from different objects. *EUREKA: Life Sciences*. 2021. 4, 58–65. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати, сформульовано висновки та підготовлено статтю).*

6. **Vishovan, Y.**, Ushkalov, V., Kepple, O., & Granate, A. Antimicrobial resistance and biological properties of Staphylococci isolated from pigs. *One Health & Risk Management*. 2020. 1(1), 58-63. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати, сформульовано висновки та підготовлено статтю).*

Патенти України на корисну модель:

7. **Вішован Ю. Ю.**, Виговська Л. М., Ушкалов В. О. Данчук В. В. Патент України на корисну модель u201903914. МПК: А61К 39/085 (2006.01) Коагулазопозитивний штам *Staphylococcus aureus* з множинною стійкістю до антибіотиків для виготовлення діагностичних та імунобіологічних препаратів № 141004: заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. Заявлено 15. 04. 2019 опубліковано 25.03.2020, бюл. № 6/2020.

(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати та підготовлено документацію).

8. Виговська Л. М., Ушкалов В. О., Данчук В. В., **Вішован Ю. Ю.**, Ушкалов А. В. Патент України на корисну модель u201907865. МПК: (2006): A61K 39/02 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01), C12Q 1/00, C12R 1/00 Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів (*Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Escherichia* тощо), придатних до використання в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) як позитивних контролей № 141068: заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. Заявлено 11. 07. 2019 опубліковано 25.03.2020, бюл. № 6/2020. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, взято участь у написанні текстової частини та підготовлено документацію).*

Методичні рекомендації:

9. Виговська Л. М., Іщенко Л. М., Ушкалов В. О., Данчук В. В., Мідик С. В., Кепл О. Ю., Калакайло Л. І., **Вішован Ю. Ю.**, Ушкалов А. В., Гранат А. В., Терещенко С. А., Давидовська Л. О., Бояновський С. О., Довбня Ю. Ю. Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів: [методичні рекомендації]. Київ, 2019. 36 с. *(Затверджено Вченою радою Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК протокол № 13 від 27.11.2019 р.) (Здобувачем взято участь у написанні текстової частини).*

Тези наукових доповідей:

10. **Vishovan Y.**, Ushkalov V. Biological properties of *Staphylococcal* animal companies. Youth and modern problems of microbiology and virology: conference materials, Kyiv, 2019. p 33. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, взято участь у написанні тез).*

11. **Вішован Ю. Ю.**, Ушкалов В. О., Виговська Л. М. Поширення мікроорганізмів роду *Staphylococcus* серед клінічно здорових свиней. Актуальні інфекційні захворювання. Сучасні аспекти клініки, діагностики, лікування та профілактики: між нар. наук-практ. конф.: тези доп., Київ, 2019.

(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, взято участь у написанні тез).

12. V. Ushkalov, L. Vygovska, A. Salmanov, **Y. Vishovan**, L. Ishchenko. Determination of Pathogenicity Genes (MeC A, Fem B, Ica A, Ica D, Ica AB) in Staphylococcus Spp World Microbe Forum 2021 20-24 June 2021 Online WorldWide <https://worldmicrobeforum.org/images/WMF/06-23-CE-Portal-Tutorial.pdf> *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, взято участь у написанні тез).*

13. **Vyshovan Y.**, Ushkalov V., Vygovska L., Ishchenko L. Detection of Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in Staphylococci Isolated from Milk. BTRP Ukraine 2022 International Biothreat Reduction Symposium. Kyiv, Ukraine, 24-27 October 2022. abstract Kyiv,2022, p.113*(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, взято участь у написанні тез).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	24
1.1. Біологічні властивості <i>Staphylococcus</i> spp.....	24
1.2. Комплекс хвороб стафілококової етіології у тварин і людини.....	26
1.3. Чутливість до антибіотиків у мікроорганізмів роду <i>Staphylococcus</i>	29
1.4. Токсигенні властивості стафілококів.....	33
1.5. Феномен формування біоплівки у стафілококів.....	35
1.6. Молекулярно-генетичні засоби дослідження стафілококів.....	38
Висновки до розділу I.....	41
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	43
2.1 Виділення і вивчення біологічних властивостей досліджуваних штамів бактерій роду <i>Staphylococcus</i>	43
2.2 Визначення чутливості до антибіотиків.....	45
2.3 Вивчення здатності до утворення біоплівки.....	47
2.4 Молекулярно-генетичні дослідження.....	49
2.4.1 Підбір праймерів для виявлення детермінант патогенності – генів, що викликають стійкість до метициліну та утворення біоплівок	49
2.4.2. Полімеразно-ланцюгова реакція.....	50
2.5. Ліофілізація отриманих культур.....	52
Висновки до розділу II.....	54
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	55
3.1 Аналіз поширення стафілококів потенційних патогенів – збудників зооантропонозів.....	55
3.2. Бактеріологічні дослідження виділених культур стафілококів.....	64
3.2.1. Дослідження культурально-морфологічних, ферментативних та біохімічних властивостей бактерій роду <i>Staphylococcus</i> , виділених з молока хворих на мастит корів.....	64

3.2.2. Вивчення особливостей культурально-морфологічних та ферментативних властивостей бактерій стафілококів виділених від свиней..	67
3.2.3. Дослідження культурально-морфологічних властивостей стафілококів одержаних від котів і собак.....	69
3.2.4. Особливості культурально-морфологічних властивостей бактерій роду <i>Staphylococcus</i> , виділених від людей.....	73
3.3. Визначення чутливості до антибактеріальних речовин мікроорганізмів роду <i>Staphylococcus</i> виділених з різних об'єктів.....	75
3.3.1. Дослідження чутливості до антибіотиків у стафілококів, одержаних з молока.....	75
3.3.2. Вивчення чутливості до антимікробних речовин у культур стафілококів виділених від свиней.....	78
3.3.3. Дослідження стійкості до протимікробних засобів у штамів стафілококів, виділених від тварин-компаньйонів.....	82
3.3.4. Дослідження чутливості до антибактеріальних препаратів у культур стафілококів, одержаних від людей.....	83
3.4. Вивчення здатності до біоплівкоутворення у <i>Staphylococcus spp.</i> виділених з різних об'єктів.....	84
3.5. Молекулярно-генетичні дослідження бактерій роду <i>Staphylococcus</i> виділених з різних об'єктів.....	93
3.5.1 Підбір праймерів для виявлення детермінант патогенності – генів, що викликають стійкість до метициліну та утворення біоплівок	93
3.5.2. Результати виявлення генів <i>mec A</i> та <i>fem</i> у культур стафілококів за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції.....	94
3.5.3. Результати виявлення генів <i>ica D</i> , <i>ica A</i> та <i>ica AB</i> у штамів стафілококів за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції.....	96
3.6. Дослідження ефективності культуральних середовищ для відновлення ліофілізованих стафілококів та накопичення їх біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів.....	99

3.7. Депонування штаму <i>Staphylococcus aureus</i> St-2017/1 у Національному центрі штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ, підготовка матеріалів для подачі заявки на патент на корисну модель (на штам, виділений і вивчений в результаті виконаних досліджень).....	103
3.8. Розробка нормативних документів для реєстрації «Набору діагностичного « <i>Staphylococcus aureus</i> -ПЛР», для виявлення здатності до утворення біоплівки та стійкості до метициліну бактерій виду <i>Staphylococcus aureus</i> методом полімеразної ланцюгової реакції» (2020 р.), та методичних рекомендацій «Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів».....	105
Висновки до розділу 3.....	109
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ....	112
ВИСНОВКИ.....	122
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	124
ДОДАТКИ.....	152

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ

АБП – антибактеріальні препарати

AMP – антимікробна резистентність

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДСТУ – Державний стандарт України

EUCAST – Європейський комітет з визначення чутливості до антимікробних препаратів

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

EFSA - European Food Safety Authority

ICA - Intercellular adhesion

ISO – міжнародний стандарт

LA - MRSA - Livestock animals Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

LA - MSSA - Livestock animals Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

СМБ - серцево мозковий бульйон

ТСБ - триптон-соєвий бульйон

MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MRSE – Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

PBP - PBP2a / PBP2 - Penicillin binding protein

PIA - Polysaccharide intercellular adhesin

SCCmec – staphylococcal cassette chromosome mec

CoPS - Coagulase positive staphylococci

CoNS - Coagulase negative staphylococci

ВСТУП

Актуальність теми. У природі стафілококи широко поширені і здатні швидко набувати стійкість до нових протимікробних препаратів (антибіотиків, дезінфектантів) за рахунок їх адаптації до дії несприятливих чинників зовнішнього середовища [68, 155].

В коагулазопозитивних і коагулазонегативних стафілококів виділених від різних тварин зустрічається феномен полірезистентності до антибіотиків різних груп [83, 220]. Резистентні стафілококи здатні заселяти слизові оболонки та шкіру різних видів диких і особливо домашніх тварин (тварин-компаньйонів) несучи у собі загрозу можливості їх передачі до інших тварин та людей [85, 87, 88, 95, 99, 146].

Окрім формування стійкості до антимікробних речовин стафілококи володіють захисним механізмом утворенням біоплівки. Біоплівка захищає їх як від дії антибіотиків так і від дії дезінфектантів і миючих засобів. Здатність утворювати біоплівку *in vitro* варіюється від матеріалу поверхні з якою контактує мікроорганізм. Вид матеріалу є надзвичайно важливим фактором у санації і дезінфекції [21,23,157,158,159,161].

Важливою проблемою є також високий рівень реєстрації стафілококових захворювань серед людей [22, 186, 187, 233].

Зростання стійкості до антибактеріальних засобів, випадки внутрішньолікарняних спалахів стафілококових інфекцій, тривале безсимптомне стафілококоносійство у тварин і людей з можливим перехресним зараженням, феномен утворення біоплівок у відповідь на дію агресивних чинників (миючих засобів, дезінфектантів, антибіотиків) дають підстави для проведення молекулярно-генетичних досліджень на предмет наявності генів, що відповідають за стійкість до антимікробних препаратів і формування біоплівок.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є складовою частиною науково-дослідних робіт

Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України: «Науково-експериментальне обґрунтування моніторингу антибіотикорезистентності у мікроорганізмів – контамінантів продукції АПК в межах концепції «Глобальне здоров'я» (номер державної реєстрації 0117U000511, 2017–2018 рр.); «Науково-експериментальне обґрунтування молекулярно-генетичного скринінгу збудників, які передаються з продуктами харчування (*Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*)» (номер державної реєстрації 0118U002547, 2018–2020 рр.), «Вивчення феномену біоплівкоутворення та антибіотикорезистентності у мікроорганізмів для розробки молекулярно-генетичних засобів діагностики емерджентних зооозів» (номер державної реєстрації 0122U001762, 2022–2023 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета дослідження - вивчити біологічні властивості бактерій роду *Staphylococcus* виділених з різних біологічних ніш та вдосконалити способи лабораторної діагностики потенційно небезпечних штамів.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

- Дослідити зразки біологічного матеріалу від свійських тварин з метою виділення ізолятів стафілококів;
- Вивчити культурально-морфологічні, ферментативні та біохімічні властивості бактерій роду *Staphylococcus*, виділених з молока хворих на мастит корів, від свиней, котів, собак та людей;
- Вивчити чутливість ізолятів стафілококів до антибіотиків;
- Дослідити здатність виділених бактерій роду *Staphylococcus* до формування біоплівок;
- Провести молекулярно-генетичні дослідження для виявлення детермінант патогенності – генів, що викликають стійкість до метициліну і бета-лактамних антибіотиків та кодують утворення біоплівок;

- З'ясувати ефективність застосування різних культуральних середовищ для відновлення ліофілізованих штамів стафілококів та накопичення їх біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів.

Об'єкт дослідження - мікроорганізми із роду *Staphylococcus*.

Предмет дослідження - біологічні властивості стафілококів та особливості їх індикації.

Методи дослідження – бактеріологічні (культурально-морфологічні, ферментативні, біохімічні, визначення чутливості до антибактеріальних препаратів, вивчення здатності до формування біоплівки, молекулярно-генетичні (підтвердження наявності дослідних генів *mec A*; *femB*; *ica A*; *ica D*; *ica AB* методом полімеразної ланцюгової реакції).

Наукова новизна одержаних результатів. Одержано нові дані стосовно культурально-морфологічних, ферментативних та біохімічних властивостей бактерій роду *Staphylococcus*, виділених з молока хворих на мастит корів, від свиней, котів, собак та людей. Вивчено чутливість виділених стафілококів до 21 антибіотика представника 9 груп. Охарактеризовано за показником оптичної щільності здатність до утворення біоплівки дослідженими ізолятами стафілококів.

Встановлено, що незалежно від джерела виділення представники як коагулазопозитивних так і коагулазонегативних стафілококів, проявляють стійкість до антибіотиків та утворення біоплівки, а також є носіями генетичних детермінант патогенності, зокрема генів: носія стійкості до метициліну та інших β -лактамних антибіотиків *mec A* та гену *femB* що сприяє підвищенню стійкості, та генів утворення біоплівки (*ica A*, *ica D* *ica AB*).

Експериментально обґрунтовано застосування культуральних середовищ серцево-мозковий бульйон та триптон-соєвий бульйон для відновлення ліофілізованих стафілококів та накопичення бактеріальної біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів.

Наукова новизна підтверджена деклараційними патентами на корисні моделі: № 141004, № 141068 (Додаток II).

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати поглиблюють сучасні знання про культурально-морфологічні, ферментативні властивості, здатності до коагуляції плазми, гемолізу еритроцитів та утворення біоплівки, а також поширення феномену антибіотикорезистентності серед мікроорганізмів роду *Staphylococcus*, виділених з різних біологічних ніш, що сприятиме розробці ефективних засобів діагностики та схем терапії і профілактики інфекційних захворювань тварин і людини.

На підставі проведеного вивчення біологічних властивостей ізолятів мікроорганізмів роду *Staphylococcus* задепоновано штам *Staphylococcus aureus* що володіє здатністю до утворення біоплівки та стійкістю до метициліну № St 2017/1 (Свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізму № «767» в Депозитарії Державного науково-дослідного контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів від 16.12.2020р.), що дозволяє використовувати цей штам для потреб лабораторної діагностики та біотехнології (Додаток 3).

Результати досліджень стали науковим підґрунтям для розробки проєкту нормативних документів (реєстраційного досьє) для реєстрації в Україні: «Набору діагностичного «STAPHYLOCOCCUS AUREUS-ПЛР», для виявлення здатності до утворення біоплівки та стійкості до метициліну бактерій виду *Staphylococcus aureus* методом полімеразної ланцюгової реакції» (схвалено Вченою радою Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК протокол № 14 від 14.12.2020р.) (Додаток І) та методичних рекомендацій «Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів: [методичні рекомендації]». Київ, 2019. 36 с. (Затверджено Вченою радою Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК протокол № 13 від 27.11.2019р.). Результати роботи було впроваджено в навчальному процесі за спеціальністю 211 «ветеринарна медицина» при викладанні дисциплін епізоотологія та ветеринарна мікробіологія в Одеському державному аграрному університеті кафедри епізоотології, а

також впроваджені в науково-дослідну роботу щодо діагностики бактеріальних зоонозів в Державному науково-дослідному контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів(Додаток І)

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно, здійснено аналіз даних літератури, розроблено схему та методологію досліджень, проведено виконання запланованих експериментальних досліджень, здійснено статистичну обробку, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено до друку публікації за темою дисертації. Обґрунтування теми і концепції дисертаційної роботи, формулювання основних положень, висновків і практичних рекомендацій виконано під керівництвом наукового керівника - доктора ветеринарних наук, професора, академіка НААН України В.О. Ушкалова. Низку досліджень здобувачем проведено спільно із науковими співробітниками, які є співавторами окремих публікацій, включених до списку робіт за темою дисертації, яким висловлюємо вдячність.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на: Науково-практичній конференції молодих дослідників «Молодь і сучасні проблеми мікробіології і вірусології» (м. Київ, 2019 р.); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні інфекційні захворювання. Сучасні аспекти клініки, діагностики, лікування та профілактики» (м. Київ, 2019р); Науково-практичній конференції «COVID-19 та інші інфекційні захворювання у дітей та дорослих. Сучасні аспекти клініки, діагностики, лікування та профілактики» (м. Київ, 2020 р.); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні інфекційні захворювання. Сучасні аспекти клініки, діагностики, лікування та профілактики» (м. Київ, 2020 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «World Microbe Forum» (USA, 2021 р.); 2-ому «Міжнародному симпозіуму зі зменшення біологічної загрози (IBTRS)» (м. Київ, 2022 р.)

Публікації. Основні положення дисертації опубліковано в 13 наукових працях, у тому числі 6 статей, з яких 4 статті у наукових фахових виданнях

України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті у періодичних наукових виданнях інших держав; 2 патенти на корисну модель; 1 методичні рекомендації та 4 тези та матеріали наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, вступу, огляду наукової літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаної літератури, що включає 239 джерел, з них 208 латиницею та додатків. Дисертацію викладено на 186 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстровано 21 таблицею та 15 рисунками.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічні властивості *Staphylococcus spp.*

Рід стафілококів хоча і відомий давно, однак все одно привертає увагу вчених усього світу своєю мінливістю і здатністю набувати нових властивостей [68, 156]. Триває виявлення нових представників роду і дослідження їхніх нових властивостей [77]. За морфологією стафілококи мають кулясту форму, діаметром 0,5–1,5 мкм, зустрічаються поодинокі, парами, тетрадами, короткими ланцюжками (3–4 клітини) і характерно діляться у більш ніж одній площині, утворюючи неправильні виноградні скупчення. Грам позитивні. Нерухомі. Капсул не утворюють [19].

Факультативні анаероби, каталазо-позитивні та оксидазо-негативні. Також більшість штамів мають властивість росту у присутності концентрації 10% NaCl та за температурних режимів від 18 до 40 °С.

Хеморганотрофи. Схильні до лізису лізостафіном, але стійкі до лізису лізоцимом. Деякі види, стійкі до новобіоцину [19]. На агарі Беард-Паркера ростуть у вигляді типових і не типових колоній. Типові колонії чорні та сірі, блискучі і випуклі 1,0-2,5 мм в діаметрі, оточені чистою зоною. Нетипові колонії блискучі чорні колонії з вузьким білим краєм та сірі колонії, чиста зона відсутня [16].

На жовтково-сольовому агарі ріст у вигляді круглих каламутних колоній, що забарвлені в молочно-білий, помаранчевий, жовтий або кремовий колір, із рівним краєм. Навкруги колоній присутня зона лецитинази райдужний вінчик. На молочно-жовтково-сольовому агарі виявляють наявність пігменту, який може бути золотистим, палевим, білим, жовтуватим, оранжевим та ін. Однак варто зазначити що пігментоутворення не є видовою ознакою [27].

Наявність лецитиназної активності того чи іншого виділеного штаму стафілококу свідчить про продукцію ним ферменту ліпази яка розчиняє ліпідну частину яєчного ліпопротеїну ліповітелініну і тим самим змінює його розчинність [1]. Внаслідок цього на початку реакції на середовищах з додаванням яєчного жовтка утворюється зона просвітлення яка з часом переходить у зону опалесценції, помутніння.

Гемолітичні властивості стафілококів є вагомим фактором що забезпечує їх патогенність. На кров'яному агарі стафілококи утворюють непрозорі, злегка опуклі колонії середніх розмірів з гладенькою, блискучою, чітко окресленим краєм, маслянистої консистенції. Деякі штами утворюють навколо колоній прозорі зони гемолізу. Цей фактор патогенності стафілококів спричинений наявністю декількох видів гемолізинів (α , β , γ), що взаємодіючи з еритроцитами в організмі викликають їх руйнування. Взаємодіючи з еритроцитами барана в поживному агаровому середовищі з кров'ю стафілококи викликають β -гемоліз який відноситься до холодкових токсинів [1]. Також стафілококи мають характерну властивість росту колоній на сольовому агарі з манітом висока концентрація в якому NaCl (10%) пригнічує ріст інших мікроорганізмів та росту колоній на агарі з лактозою та кристалічним фіолетовим [19].

Окремі стафілококи продукують фермент коагулазу, що перетворює розчинний у плазмі білок фібриноген на нерозчинний фібрин. Коагулаза володіє двома формами: зв'язана і вільна [1]. Визначення коагулази дозволяє поділити стафілококи на дві великі групи, що вказує на їх різні патогенні властивості та полегшує диференціацію.

Так за коагуляцією плазми кроля відбувся розподіл цієї групи мікроорганізмів на дві підгрупи: коагулазопозитивні (CoPS) та коагулазонегативні стафілококи (CoNS) [1, 10, 15, 19].

Кожна з яких поділяється на певні підгрупи. Коагулазонегативна група розподіляється на групи чутливих і не чутливих до новобіоцину стафілококів. Дві чутливі до новобіоцину групи: *Staphylococcus epidermidis*

(включає *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus warneri*) і *Staphylococcus simulans* (включає *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus simulans*). Дві підгрупи коагулазонегативних і резистентних до новобіоцину *Staphylococcus saprophyticus* (включає: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus*) і *Staphylococcus sciuri* (включає: *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus vitulinus*). Коагулазопозитивних і чутливих до новобіоцину дві групи *Staphylococcus intermedius* (включає *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius*) і *Staphylococcus aureus* (включає: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius*) [1, 10, 15, 19].

Враховуючи видову близькість та спільність біохімічних властивостей видова ідентифікація стафілококів є утрудненою.

Таким чином для остаточної видової ідентифікації стафілококів і підтвердження їх патогенних і вірулентних властивостей необхідно застосовувати збірне дослідження біохімічних властивостей за допомогою автоматизованих комплексів і спеціалізованих наборів, постановки полімеразно-ланцюгової реакції та біопробу.

1.2. Комплекс хвороб стафілококової етіології у тварин і людини

Стафілококи є поширеними у всьому світі й характеризуються різноманітною локалізацією: від шкірних покривів до поверхні слизової оболонки людини та тварин. Стафілококова інфекція та механізми її передачі.

Стафілококова інфекція - група різноманітних за клінічними ознаками інфекційних хвороб, які спричиняють стафілококи. Ці хвороби переважно характеризуються наявністю гнійно-запальних вогнищ та інтоксикацією.

Основні механізми передачі стафілококової інфекції:

- повітряно-крапельний;
- фекально-оральний;
- під час хірургічного втручання через контамінований медичний інструментарій і при проведенні різних маніпуляцій.

Патогенез стафілококової інфекції залежить від характеру інфікування (екзогенне або ендогенне). Зазвичай стафілококова інфекція спостерігається на тлі інших чинників, що пригнічують імунітет [10, 48, 91].

У ВРХ, овець і кіз стафілококи уражують молочну залозу, шкіру, статеві органи. Найпоширеніше захворювання мастит стафілококової етіології є актуальним досі [66, 223, 224]. Мастит у молочних корів призводить до зниження надоїв, необхідності ветеринарного втручання та втрати молока, яке необхідно утилізувати через зараження збудником або антибіотиком. При неефективності лікування вимені тварину часто вибраковують [32, 93, 96, 174, 205].

У птиці стафілококи викликають хвороби з гострим або хронічним перебігом що проявляються у вигляді артриту, синовіту, дерматиту, синуситу, клоациту та запалення сережок [25, 34, 46, 107].

Часто в собак і котів захворювання що викликаються мікроорганізмами з роду *Staphylococcus* проявляються ураженням шкіри і слизових оболонок у формі: фурункулів, піодермії, пустул, а також отиту.

Основними збудниками прийнято вважати *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. pseudointermedius*, *S. haemolyticus* та багато інших коагулазонегативних стафілокококів [88, 99, 128, 135].

Ексудативний епідерміт (ЕЕ), широко відомий як «хвороба жирних свиней», — це генералізоване або локалізоване захворювання шкіри поросят, що характеризується лущенням, виділенням сальних залоз і утворенням шкірочоки, яка може покривати все тіло. Захворювання найчастіше викликається штамами *Staphylococcus hyicus*, які виробляють ексфоліативні токсини [222]. Свині в основному не хворіють на стафілокок однак вони є

носіями стафілоkokів що забезпечує міграцію різних штамів з різним потенціалом патогенності [102, 126].

Вважається що найбільш патогенними стафілококами для людини є :

S. aureus, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*. Велику небезпеку являють екзогенні стафілококові інфекції для хворих у стаціонарах - внутрішньолікарняні (госпітальні) інфекції. Основними їх збудниками є *S. aureus*, *S. epidermidis*.

Найбільшу епідемічну небезпеку становить медичний персонал лікувально-профілактичних установ — постійні (резидентні) носії госпітальних штамів [33, 188, 194].

Небезпеку становить також досить висока сприйнятливість до стафілоkokів, оскільки уражаються хворі з імунodefіцитом різного походження (операція, травма, цукровий діабет і т. ін.) [48, 76, 86, 201].

Форми клінічного перебігу стафілококової інфекції у людини можна розділити на декілька груп залежно від локалізації уражених органів:

Ураження шкіри і слизових оболонок може проявлятися у формі:

фурункулів, піодермії, флегмони, пустул, прищів, панарицій, карбункулів та Стафілококового синдрому «обпеченої шкіри» — генералізованого ексfolіатинового дерматиту, зумовленого штамом золотистого стафілокока, що продукує ексfolіатин (вид протеаз).

Ураження сечостатевої системи проявляється у формі вагініту, уретриту, циститу, пієлонефриту, ендометриту. Ураження дихальної системи проявляється у формі тонзиліту, гаймориту, фронтиту, синуситу, фарингіту, ларингіту, бронхіту, пневмоній, плевриту. Також стафілококи виступають збудниками гнійного отиту.

Потрапляючи у кров стафілококова інфекція може виражатись у формі стафілококового сепсису результатом його можуть бути стафілококовий менінгіт та абсцес мозку, остеомієліти і артрити, стафілококові ентерити та ентероколіти, ендокардит [91, 172, 215].

При контакті з хворими в окремих осіб може формуватись резидентне стафілококове бактеріоносійство, коли постійним місцем їх проживання стає слизова оболонка носа, звідки вони розповсюджуються з секретами. Таке носійство особливо небезпечне серед медичного та ветеринарного персоналу лікарень, оскільки носії можуть стати джерелом внутрішньогоспітальних інфекцій [48, 52, 55, 152, 178, 184, 193, 233].

Також важливи фактором поширення стафілококів та резервуаром для їх передачі слугують контаміновані продукти рослинництва, тваринництва предмети догляду і медичні інструменти [54, 58, 155, 185, 234]. У довкілля стафілококи потрапляють від хворих тварин і людей та клінічно-здорових носіїв вказаних мікроорганізмів.

1.3 Чутливість до антибіотиків у мікроорганізмів роду *Staphylococcus*

Антибіотики знайшли широке застосування в лікуванні стафілококових інфекцій що виникають у тварин і людини. Вже на початку застосування природніх пеніцилінів стало відомо про розвиток стійкості до них стафілококами виділених в лікарнях [53, 115].

Стійкі до пеніциліну штами спричинили госпітальну пандемію у всьому світі[42,182]. Однак вже через якийсь час стафілококи проявили свою стійкість до метициліну у Великій Британії (1961р) а згодом у США (1968р) [45, 101, 122].

В наш час метицилін не застосовують для тесту на чутливість його замінили на оксацилін або цефокситін але назва MRSA стійких стафілококів до β -лактамних антибіотиків залишається. β -лактами зв'язуються з білками, що зв'язують пеніцилін (ПЗБ), необхідними для біосинтезу клітинної стінки та пригнічують утворення пептидогліканів, внаслідок чого клітинна стінка не утворюється і відбувається лізис мікробних клітин.

Стійкість до β -лактамів при MRSA завдяки набутому рухомому генетичному елементу - стафілококовій хромосомній касеті (SCC *mec*), що несе *mec A* ген, який кодує змінений пеніцилін зв'язувальний білок PBP - PBP2a / PBP2' - який має знижену спорідненість до β -лактамічних антибіотиків. Як результат, синтез клітинної стінки у штамів MRSA відбувається навіть за наявності інгібіторних рівнів β -лактамічних антибіотиків. Золотим стандартом для підтвердження MRSA вважається виявлення *mec A*, за допомогою ПЛР, або PBP2a / PBP2' шляхом виявлення антитіл в тесті на аглютинацію [169].

Досліджуючи стійкість до антимікробних речовин у стафілококів постає питання профілю їх резистентності. У медичній літературі використовується багато різних визначень для мультирезистентних (MDR), широко стійких до ліків (XDR) і панрезистентних (PDR) бактерій, щоб охарактеризувати різні форми резистентності бактерій, які пов'язані з медичною допомогою та стійкі до антимікробних препаратів. Група міжнародних експертів об'єдналася завдяки спільній ініціативі Європейського центру профілактики та контролю захворювань (ECDC) і Центрів контролю та профілактики захворювань (CDC), щоб створити стандартизовану міжнародну термінологію для опису профілів набутої резистентності у золотистого стафілококу [140].

Згідно цієї класифікації:

- множинна лікарська стійкість (multidrug-resistant)(MDR) визначалася як набута несприйнятливості принаймні до одного антибіотика в трьох або більше категоріях протимікробних засобів.
- широка лікарська стійкість (extensively drug-resistant) (XDR) визначалася як несприйнятливості принаймні до одного антибіотика у всіх категоріях антимікробних препаратів, крім двох або менше (тобто ізоляти бактерій залишаються чутливими лише до однієї або двох категорій антимікробних засобів).

– пан-резистентність (pandrug-resistant) (PDR) визначалася як несприйнятливість до всіх антибіотиків усіх категорій протимікробних засобів.

Золотистий стафілокок що фенотипово стійкий до Оксациліну або Цефоксітіну або має ген носій стійкості до метициліну *mec A* вважається мультирезистентним (MDR) [140].

Всі ці резистентні штами охопили всю земну кулю і призвели до пандемії MRSA у лікарнях, що триває до нашого часу. Тому для того щоб її побороти почали енергійно застосовувати ванкоміцин - останній антибіотик, до якого чутливі штами MRSA. Ванкоміцин - це глікопептидний антибіотик, який використовується для лікування грампозитивних бактеріальних інфекцій. Він отримав широке застосування в якості препарату останньої надії при лікуванні інфекцій викликаних MRSA.

Але однак у процесі застосування виявилось що MRSA розвиває помірну стійкість (VISA) та повну (VRSA) резистентність до ванкоміцину [100, 110, 162, 196, 216]. Рідкісні штами VRSA несуть транспозон Tn 1546, отриманий від резистентного до ванкоміцину *Enterococcus faecalis*, який, як відомо, змінює структуру клітинної стінки та обмін речовин [151].

Серед свійських тварин перші повідомлення про стійкість стафілококів до антибіотиків почала надходити у 1970 х роках виділених з молока хворих на мастит корів [70].

Проблема стафілококового маститу молочних корів, овець і кіз викликаного стійкими MRSA отримала світове поширення і є актуальною і в наш час на всіх континентах [141, 147, 183]. Що в свою чергу породжує колосальні збитки у молочній галузі, призводить до передчасної вибіраківки тварин, і можливість передачі збудника з продуктами доїння до людини.

MRS і MRSA заселяють слизові оболонки і шкіру дрібних домашніх тварин [124, 137] і призводять до передачі MRS і MRSA між ними [136]. Цьому сприяють тісні постійні контакти між людиною і домашнім улюбленцем. Не завжди вдається встановити джерело збудника ним може

бути як людина так і кішка або собака. Ця проблема отримала значне поширення по всіх континентах, не залежить від соціального розвитку і становища в тій чи іншій країні і залишається актуальною і по сьогодні [49, 60, 136, 143, 170, 235].

Інтенсивний шлях розвитку свинарства дозволив застосувати технології для групового утримання великої кількості поголів'я свиней в обмеженому просторі. Цьому сприяли поява нової системи видалення гноївки (щілинна підлога, гідрозмив) та відмова від вигульного утримання взагалі. З появою системного циклічного підходу до репродукції і вирощування молодняку свиней почали піддавати різним факторам стресу і впливу (кліткове утримання, перегони, формування різних груп свиноматок). Що в свою чергу спричинило до збільшення використання антибіотиків для профілактики і лікування свиноматок і відлучених поросят та свиней на відгодівлі. Це застосування антимікробних речовин призвело до формування стійкості у нормальної і умовно-патогенної мікрофлори свиней.

Стафілококи є одними з численних представників убіквітарної мікрофлори у свиней. Свині як безсимптомні носії MRS і MRSA відіграють важливу роль у процесі передачі стійких стафілококів до людей та інших тварин [118, 126, 202].

Таким чином потрапляючи на слизові оболонки і шкіру працівників, що доглядають за свинями, беруть участь у обробці продуктів свинарства, ветеринарних працівників та контамінуючи продукти і відходи свинарства.

Також піддаються впливу колонізації стійкими до антибіотиків стафілококами такі тварини як коні [64, 65, 190], птиця [89, 107, 175, 179] та кролі [84]. У птиці та кролів стафілококи викликають захворювання і окрім колонізації і носійства спричиняють значний відсоток загибелі поголів'я.

Окрім заселення слизових оболонок і шкіри стійкими до антибіотиків стафілококами свійських тварин необхідно звернути увагу на диких тварин як частину тваринного світу. Вагомим фактором патогенності прийнято вважати циркуляцію стафілококів між свійськими і дикими тваринами.

Колонізація MRS і MRSA відбувається серед диких тварин [35, 87, 148, 197, 199]. Тобто широке застосування антимікробних речовин серед тварин і людей призвело не тільки до появи стійких штамів стафілококів а й призвело до їх міграції у дику природу де вони можуть набувати нових властивостей.

Також з розвитком молекулярно-генетичних методів досліджень було встановлено що MRSA кодує ще один ген *mec C* [169]. Виявлення цього гену гомологу *mec A* дало розуміння фенотипової стійкості до метициліну яка не підтверджувалась полімеразноланцюговою реакцією з класичним праймером *mec A* і штами були класифіковані як MSSA.

Стійкі стафілококи що кодуються цим геном стають широко поширеними серед тварин і людей та стають новим викликом для діагностики і лікування стафілококових інфекцій [62, 107, 167, 176, 191]. Всі ці джерела вказують на вагоме епідеміологічне значення стафілококів у всьому світі і тварини займають центральне місце у забезпеченні існування даних бактерій у природі і здобуток ними нових захисних властивостей у відповідь на вплив на них антимікробних речовин.

Продукти харчування і сировина тваринного походження є невідомою складовою життя людини. Від їхньої якості прямо пропорційно залежить і якість життя і здоров'я людей. Тому виділення метицилінрезистентних стафілококів в харчових продуктах тваринного походження і готовій продукції є маркером поширення стійких стафілококів у системі «єдиного здоров'я». Окремо хочемо виділити випадки виявлення метицилінрезистентних стафілококів у продуктах харчування а також готовій продукції [34, 47, 58, 142, 179, 234].

Наявність метицилінрезистентних стафілококів у продуктах харчування а також готовій продукції може свідчити про не забезпечення належних умов на виробництві, погіршення якості вхідної сировини, контамінацію обладнання та персоналу.

1.4 Токсигенні властивості стафілококів

Харчові отруєння спричинені стафілококовими токсинами значно поширені і різноманітні. Патогенез харчових отруєнь стафілококової етіології представлений різними ступенями важкості і супроводжується різними симптомами. Отруєння спричиняються цілим набором ентеротоксинів які здатний виробляти основний представник з роду *Staphylococcus* - золотистий стафілокок [138, 189, 213, 237].

Ряд джерел [69, 171, 225] наводять відомості про те що гени які спричиняють утворення ентеротоксинів містять у своєму геномі окрім золотистого стафілококу також і представники коагулазонегативних стафілококів які були виділені з молока і харчових продуктів.

На сьогоднішній день було виявлено двадцять чотири стафілококових ентеротоксини (SE) які розділено на дві групи: відповідно класичні SE та нові SE. До першої групи належать класичні токсини SEA, SEB, SEC1, SECbov, SED та SEE, які є причиною приблизно 95% харчових отруєнь викликаних стафілококом. В другу групу відносять решту виділених токсинів [36].

Стафілококові ентеротоксини - SE що виробляються *S. aureus* є термостійкими, і зберігають свою біологічну активність після пастеризації молока. вважається що джерелом токсину у сирому молоці є стафілококи які часто виділяються при субклінічній формі маститу [69].

Ще одним представником токсинів що виділяються стафілококами є Токсин синдрому токсичного шоку TSST-1 що виробляється золотистим стафілококом який колонізує статеві органи [73]. Він володіє властивістю легко проникати через слизові оболонки і є причиною інфекцій статевих органів у жінок. В 1980-х роках минулого століття в США було зареєстровано спалахи летальних інфекцій викликані цим токсином [104].

З того часу після виявлення причини чисельність випадків значно знизилась. Зрозуміло що широка різноманітність токсинів що виробляють стафілококи та їх висока здатність викликати отруєння змусила виробництво

продукції тваринництва підвищити гігієнічні вимоги і стандарти до якості сировини і готового продукту а також до персоналу і обладнання що задіяні у виробництві.

1.5 Феномен формування біоплівки у стафілококів

Ще однією важливою властивістю всіх стафілококів є здатність до утворення біоплівки. Як коагулазопозитивні так і коагулазонегативні стафілококи утворюють біоплівки. Здатністю до утворення біоплівок володіють стафілококи виділені з різних джерел: продуктів харчування [54, 180], молочної залози тварин [71, 224], від свиней [149]. Формуючи біоплівку на внутрішніх стінках молокопроводів стафілококи формують постійне джерело бактеріального обсіменіння молока чим знижують його якість.

Так за даними [21] вказано, що незалежно від санітарного стану доїльного устаткування бактерії *S. aureus* та *P. aeruginosa* в 55,9–71,7 % формують біоплівки високої щільності, а коагулазонегативні стафілококи, в основному, формують біоплівки середньої щільності [21]. На поверхні доїльного устаткування та молочного інвентарю формуються змішані біоплівки [21].

У гуманній медицині утворення стафілококових біоплівок і прикріплення їх до медичного обладнання, венозних і сечових катетерів, протезів та імплантів, тягне за собою колонізацію поверхонь, розвиток мікроорганізмів у не властивих їм місцях, запальні процеси (цистит, уретрит) відторгнення імплантів і протезів, бактеріємію і сепсис [55, 78, 111, 112, 165, 236, 239].

Саме здатність утворювати біоплівку змусила фахівців переглянути свої думки стосовно сапрофітності коагулазонегативних стафілококів.

Біоплівка це складна організована структура, мікробні клітини, які розміщені у виробленій ними матриці позаклітинних полімерів. Також

вважають що біоплівка це скупчення прикріплених до біотичних чи абіотичних поверхонь мікробних клітин. Бактерії в біоплівці володіють власним видом метаболізму. Також відрізняється процес транскрипції генів та утворення білків.

Процес формування біоплівки як правило проходить у три основні етапи:

- прикріплення до поверхні;
- проліферація і дозрівання клітин біоплівки;
- відрив і розсіювання мікробних тіл;

Стафілококи не будучи рухливими мікроорганізмами контактують з поверхнею пасивно за допомогою електростатичних, гідрофобних сил [38, 134, 145, 159, 168, 206, 207, 208].

Ступінь інтенсивності адгезії і формування біоплівки *In vitro* у стафілококів як і в інших бактерій залежить від характеру поверхні до якої кріпиться стафілокок. Найвищий ступінь адгезії і утворення плівки стафілококи проявляють на поверхнях латексу, силікону, полівінілхлориду. Найменший ступінь адгезії проявляються до тefлонових, поліуретанових, нержавіючої сталі та титану [23].

In vivo, при взаємодії стафілококових клітин з клітинами господаря вони швидко покриваються матричним матеріалом господаря, включаючи фібрoneктин, фібриноген, вітронектин та інші матричні молекули [154, 203, 210].

Тому в таких умовах прикріплення до клітин господаря розпочинається з взаємодії специфічних білків поверхні мікробної клітини стафілокока які взаємодіють із цими білками клітини господаря. Найважливішим сімейством таких поверхнево-експресованих білків стафілооків, що зв'язуються із поверхнями є MSCRAMM (мікробіальні поверхневі компоненти, що розпізнають молекули адгезивної матриці) [59].

За даними геномного аналізу, *S. aureus* має близько 20, а *S. epidermidis* - близько 12 MSCRAMM [98]. Окремо виділено біоплівко асоційований білок

(*Var*), який сприяє адгезії стафілококів до поверхні і який був виділений від *S. aureus*, що спричиняв субклінічний мастит [63] та *S. epidermidis*.

Під час другої стадії розвитку біоплівки прикріплені колонії починають своє розмноження. В мікробних клітинах відбувається транскрипція генів необхідних для виділення екзополісахаридів і білків необхідних для формування біоплівки [208]. Склад біоплівки має різну хімічну природу і включає полісахариди, білки та тейхоеві кислоти. Також до матриксу біоплівки входять речовини які виділяються з клітин що відмирають.

Найбільше серед цих речовин заслуговує на увагу ДНК, що після вивільнення з відмираючих клітин відома як позаклітинна ДНК (eДНК) [121]. Екзополісахариди являють собою компоненти матриці, що найбільше пов'язані з утворенням біоплівки [38, 90, 159, 204].

Стафілококи продукують один основний екзополісахарид біоплівки, який називають полісахаридним міжклітинним адгезивом (PIA), або, за його хімічним складом, полі-N-ацетилглюкозамін (PNAG) [139].

Біосинтез PIA здійснюється продуктами локусу гена *ica* (intercellular adhesion) *ica* (міжклітинної адгезії), який включає гени *ica A*, *ica D*, *ica B* та *ica C* [109].

Ica A - це N-ацетилглюкозамін трансфераза, яка спільно з *Ica D* виробляє олігомер N-ацетилглюкозамін [232]. *Ica C* це мембранний білок який вважається експортером PIA. *Ica B*, що знаходиться на поверхні бактерій, - це деацетилаза PIA [232]. Деацетилювання має вирішальне значення для утримання PIA на поверхні та включає підвищену стійкість до антимікробних речовин (AMP) та нейтрофільний фагоцитоз [232].

Перед потоком оперона *ica* знаходиться ген *ica R*, який транскрибується у зворотному напрямку оперона *ica ADBC*. *Ica R* працює як репресор оперона *ica* [6]. *S. epidermidis* частіше покладається на PIA, щоб утворити біоплівки, з додатковим внесеним білком [181]. Серед безлічі поверхнево розташованих білків, залучених до утворення стафілококової

біоплівки відносять протеїн, асоційований із накопиченням *S. epidermidis* (Aap) [119, 181].

Структура і дозрівання. Біоплівки ростуть у вигляді веж схожих на гриби з заповненими рідиною каналами поміж них з характерною тривимірною структурою [97]. Дозрівання біоплівки включає запуск механізмів для відриву і розсіювання біоплівки. Цей процес відбувається завдяки ферментам що руйнують полімери біоплівки.

До них відносять нуклеази та протеази, і молекули поверхнево-активних речовин - стафілококові фенолорозчинні модуліни (PSM) які порушують нековалентну взаємодію [50, 158]. PSM володіють властивостями схожими на поверхнево активні речовини (ПАР) [56].

PSM виробляються у *S. aureus*, *S. epidermidis* і, можливо у всіх стафілококів [56, 177]. Комплекс цих ферментів і PSM призводить до відшарування мікробних клітин поверхневого шару біоплівки що призводить до їх відриву і розповсюдженню з потоком рідин по організму. Також існують інші види регуляції дозрівання і розсіювання біоплівки, які ще не достатньо вивчені [150, 153]. Наслідком є інвазія всього організму і виникнення нових вогнищ ураження організму, розмноження і розвитку бактерій та формування нових біоплівок [38, 159].

Виявлено вплив аеробних та анаеробних умов навколишнього середовища на інтенсивність утворення біоплівок [40, 206]. Біоплівка виступає додатковим захисним механізмом стафілококів від дії антимікробних і антисептичних речовин [200]. Вона зменшує проникність антибіотиків у глибші шари клітин плівки, зменшує проникність в саму мікробну клітину, збільшує швидкість виведення антибіотика з клітини.

1.6 Молекулярно-генетичні засоби дослідження стафілококів

З моменту можливості застосовувати засоби молекулярної генетики з'явилась можливість дослідити склад геному тих чи інших мікроорганізмів.

Для підтвердження існуючих фенотипових властивостей бактерій а також для виявлення нових які почали або будуть проявлятися в найближчий час.

Одним з найширших і найцінніших досліджень стафілококів є повне секвенування їх геному. Воно дало можливість розшифрувати генетичний склад мікроорганізму, виділити відповідальні гени що кодують патогенні властивості. Розуміння геному пролило світло на виникнення антимікробної резистентності, шляху її набуття і її подальший розвиток.

Також визначення генетичної спадковості дало розуміння циркуляції і поширення стафілококів на різних континентах, виявлення ендемічних штамів і шлях їх географічного поширення серед тварин і людей. Повний сиквенс послідовності геномів двох споріднених штамів *S aureus* N315 - штам *S aureus*, стійкий до метициліну, що був виділений у 1982 році, а Mu50 - штам MRSA з резистентністю до ванкоміцину, що виділений у 1997 р було проведено у 2001 році [132]. Надалі були сквеновані і інші штами стафілококів і вся інформація про склад їх геному зберігається в GenBank® - це база даних генетичних послідовностей, анотована колекція всіх загальнодоступних ДНК-послідовностей. GenBank є частиною міжнародної співпраці з базами даних про нуклеотидні послідовності, яка включає бази даних Японських, Європейських і Американських науковців [116, 117]. Таким чином було встановлено властивості циркулюючих штамів золотистого стафілококу у світі та їх поширення на всіх континентах.

Особливу увагу було присвячено вивченню появи і циркуляції MRSA як основного патогену внутрішньо лікарняних інфекцій та хвороб тварин.

Тому для дослідження основних властивостей основного патогенного представника роду золотистого стафілококу застосовують цілий арсенал молекулярно-діагностичних методів досліджень. До їх складу входять:

- виявлення гену *tes A* який кодує змінений пеніцилін зв'язувальний білок PBP - PBP2a / PBP2' - що в свою чергу має знижену спорідненість до β -лактамних антибіотиків [238];

- виявлення стафілококової касетної хромосоми *mec* (SCC*mec*) мобільного генетичного елементу, який легко переноситься серед різних видів стафілококів і кодує резистентність до метициліну та несе унікальні сайтоспецифічні рекомбінази, позначені як касетні хромосомні рекомбінази (*csc*) [238];

- multilocus sequence typing (MLST) - схема багатотипового набору послідовностей внутрішніх фрагментів семи генів. В результаті чого виділяють певний секвенс тип (ST) який в комплексі з виявленням стафілококової касетної хромосоми *mec* (SCC*mec*) дає розуміння розповсюдження того чи іншого клону метицилінрезистентного стафілококу в певному середовищі (лікарні, країні, континенті) [238];

- Spa Typing (Spa) Спа-типізація Ця методика включає секвенування поліморфної X-області або області короткого повторення послідовності short sequence repeat (SSR) гена білка A. Ці регіони мають високий ступінь поліморфізму, а тому потенційно придатні для розрізнення під час спалаху [238].

На сьогоднішній день 13 типів SCC*mec* виявлено у штамів *S. aureus*, [44, 238]. Застосовуючи одночасно два методи виділення певного секвенс типу (ST) та стафілококової касетної хромосоми *mec* (SCC*mec*) та використовуючи цю стандартизовану номенклатуру, дослідники з усього світу продемонстрували, що найбільше епідемічних ізолятів MRSA належать до восьми основних клональних комплексів (CC), але про них найчастіше повідомляється п'ять у всьому світі: CC5, CC8, CC22, CC30 та CC45 [51, 120, 133, 238]. З них, CC5 і CC8 є найбільш поширеними в усьому світі. Ці два CC містять декілька типів ST, деякі з них ці типи, що відрізняються точковими мутаціями гена, що використовується для присвоєння типу MLST ST. Цікаво відзначити, що хоча деякі клони широко поширюються, інші обмежені в певних районах світу [238].

Також дослідження секвенс типу (ST) та стафілокової касетної хромосоми *tec* (SCC_{tec}) застосовується для вивчення резистентності у інших коагулазопозитивних та коагулазонегативних стафілококів [44].

Варто звернути увагу що досліджені клональні комплекси в основному досліджені у стафілококів що виділяються від людини. Стафілококи виділені від тварин представлені своїми клональними комплексами. MRSA що колонізують Велику рогату худобу, свиней та птицю є клонально специфічними для CC398 (ST398), CC9 (ST9), CC5 (ST5) та CC49 (ST49), і відомі як асоційовані з тваринництвом (LA MRSA). У собак, котів та коней ідентифіковано різні клони MRSA.

Клони MRSA, пов'язані з людиною, є основною популяцією у дрібних тварин-компаньйонів, і CC398 був спорадично визначений як субпопуляція [57, 103, 137]. Крім того, дрібні тварини-компаньйони виступають в ролі резервуарів MRSA у спільноті та можуть бути джерелом зараження у людей [143, 210]. Передача міжвидових видів між групами ризику, включаючи ветеринарний персонал, власників домашніх тварин та здорових носіїв домашніх тварин, була доведена за допомогою бактеріальної генетичної ідентичності [41, 57].

Нещодавно все більше повідомлень, що описують інфекції MRSA у тварин та передачу від тварини до людини, викликали тривогу щодо можливої появи мультирезистентного патогену [75, 125]. Попередні дослідження ілюструють, що різні клони MRSA, пов'язані з людиною та тваринництвом, були вилучені у пацієнтів та носіїв собак та котів [57].

Висновки до розділу 1

На основі аналізу літературних джерел нами встановлено, що стафілококи є дуже поширеними патогенами серед тварин і людей, і завдають відчутних збитків пов'язаних з лікуванням та вибраківкою тварин.

Вони володіють широким спектром патогенних властивостей, які забезпечують їм поширення на всіх континентах. Однак, у вітчизняній літературі недостатньо описані окремі властивості стафілококів, відсутні дані моніторингу взаємної кореляції між величиною поширення захворювань стафілококової етіології серед тварин та людей.

Недостатньо описані дані щодо моніторингу стійкості стафілококів виділених від тварин і людей до певних антимікробних речовин. Не систематизовано інформацію щодо поширеності феномену біоплівкоутворення стафілококами виділеними від тварин, з об'єктів ветеринарно-санітарного нагляду, харчових продуктів та агросировини і від людей.

Відсутні дані про проведення скринінгу певних властивостей стафілококів шляхом застосування ПЛР та секвенування геному виділених представників стафілококів на території України.

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У даному розділі наведено опис методик, що використані для виконання поставлених завдань і аналізу отриманих результатів.

2.1. Виділення і вивчення біологічних властивостей досліджуваних штамів бактерій роду *Staphylococcus*

Дослідження проводили протягом 2016-2023 років на кафедрі епізоотології, мікробіології і вірусології а також у відділах мікробіологічних та молекулярно-біологічних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК НУБіП України.

Експериментальні дослідження проводили в 5 етапів (Рисунок 2.1).

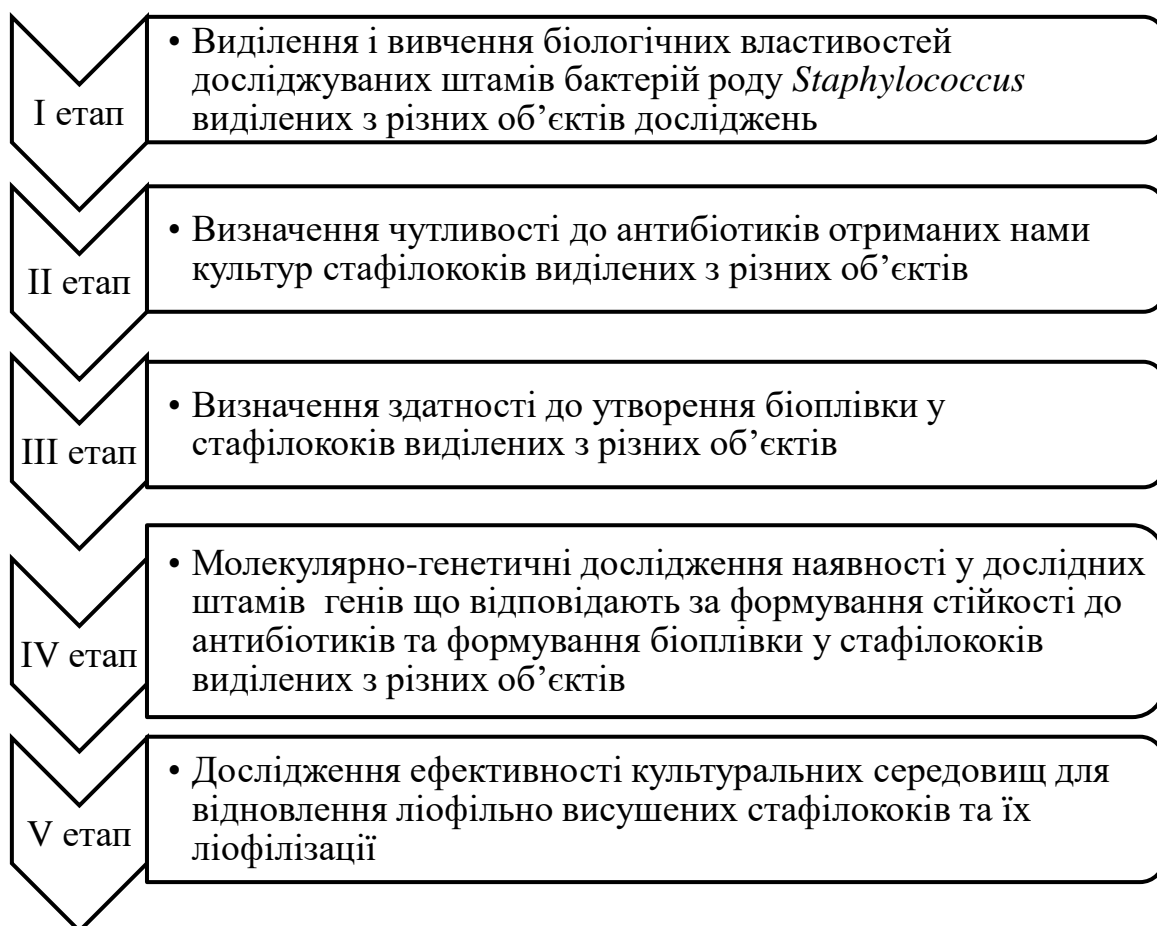


Рисунок 2.1 Етапи проведення дисертаційного дослідження

Кількісну характеристику відібраних проб з різних об'єктів наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Кількісна характеристика відібраних проб

Об'єкт виділення	Кількість відібраних проб	Кількість виділених стафілококів (%)
Молоко ВРХ	195	80 (41,0%)
Свині	116	86 (74,1%)
Собаки і коти	44	25 (56,8%)
Люди	19	19 (100%)

В роботі використовували: стафілококи виділені від свиней з промислових свинокомплексів розташованих у Київській (77 проб) та Вінницькій (39 проб) областях; ізоляти від тварин-компаньйонів відбирали у ветеринарній клініці Київська область; ізоляти стафілококів з молока хворих на мастит корів, були передані в межах співпраці з «Лабораторії якості молока «Uman Labs» (35 проб) Черкаська область та виділені з 2-х господарств Київської області і господарства(146 проб) у Хмельницькій області(14 проб); ізоляти виділені від людей були передані нам в межах співпраці з Національним університетом охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика.

Виділення та ідентифікацію *Staphylococcus spp.* проводили відповідно до чинних стандартизованих методик (ДСТУ ISO 6888-1:2003, ДСТУ ISO 6888-2:2003) [16]. Гемолітичні властивості досліджували на колумбійському кров'яному агарі (Biomeriux, Франція) при температурі 37°C протягом 24 годин. Визначали активність коагулази *in vitro* ліофілізованою цитратною плазмою кролика (Bioliq, Україна). Утворені згустки оцінювали візуально через 2, 4, 18 та 24 години інкубації при температурі 37°C. Також визначали основні характеристики росту колоній на сольовому агарі з манітом (Merck) та на агарі з лактозою і кристалічним фіолетовим (HiMedia) [19].

2.2. Визначення чутливості до антибіотиків

Резистентність культур до антибіотиків та виведення антибіотикограми визначали диск-дифузійним методом за методологією EUCAST [80] з використанням агарового середовища Мюллера-Хінтона (HiMedia).

Для цього простерилізований агар охолоджували до температури 42–45 °С, ретельно перемішували та розливали у чашки Петрі так щоб товщина шару агару була завтовшки $4,0 \pm 0,5$ мм. За наявності конденсату чашки з агаром підсушували. Розлитий і підсушений агар перевіряли на стерильність, та придатність для росту стафілококів. Інокулюм 0,5 по Макфарланду готували прямим методом рекомендованим EUCAST [80]. Для цього стерильною бактеріологічною петлею відбирали кілька типових колоній 18–24-годинної культури досліджуваних стафілококів культивованих на кров'яному агарі. Бактеріальну масу вносили у стерильний фізіологічний розчин і ретельно перемішували.

Оптичну щільність мікробної суспензії стафілококів визначали за допомогою денситометра DEN-1 (Biosan) та стандарту McFarland (HiMedia). Інкубацію проводили при 35° С протягом 18 ± 2 год. У роботі використовували поживне середовище та комерційні диски з антибактеріальними препаратами виробництва HiMedia. Перелік антибіотиків що використовували у даному дослідженні наведено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Антимікробні препарати використані у дослідженні

№ п/п	Назва групи антибіотиків	Назва антибіотика	Вміст діючої речовини в диску
1	2	3	4
1	Пеніциліни	Бензилпеніцилін	10 мкг
		Оксацилін	5 мкг
		Ампіцилін	10мкг
2	Аміноглікозиди	Гентаміцин	10 мкг
		Тобраміцин	10 мкг

Продовження таблиці 2.2

1	2	3	4
3	Тетрацикліни	Тетрациклін	30 мкг
		Доксициклін	30 мкг
4	Лінкозаміди	Лінкоміцин	15 мкг
		Кліндаміцин	2 мкг
5	Макроліди	Еритроміцин	15 мкг
6	Фторхінолони	Норфлоксацин	10 мкг
		Ципрофлоксацин	5 мкг
		Офлоксацин	5 мкг
		Пефлоксацин	5 мкг
		Ломефлоксацин	10 мкг
		Левовфлоксацин	5 мкг
		Спарфлоксацин	5 мкг
		Гатіфлоксацин	5 мкг
7	Амфеніколи	Хлорамфенікол	30 мкг
8	Глікопептиди	Ванкоміцин	30 мкг
9	Похідний стероїдів	Фузідієва кислота	10 мкг

Результати оцінювали відповідно до рекомендацій Європейського комітету з протимікробної чутливості EUCAST версія (8.0 - 10.0) та національних критеріїв оцінки стійкості до антибіотиків - методичних вказівок «Визначення сприйнятливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» [144].

Для початку обліку результатів звертали увагу на сформований рівномірний суцільний ріст бактерій *Staphylococcus*. Облік результатів проводили шляхом вимірювання зон затримки росту навколо диску з будь-яким антибіотиком, орієнтуючись на зону пригнічення росту мікроорганізмів, яку можна визначити візуально. Вимірювання зон

пригнічення росту проводили за допомогою лінійки. Для вимірювання зон затримки росту чашку Петрі із закритою кришкою розміщували догори дном над темною матовою поверхнею так, щоб світло падало під кутом 45° - ефект відбитого світла.

Паралельно ручному методу було використано облік результатів зон затримки росту за допомогою приладу «Scan® 500 automatic color colony counter» виробництва INTERSCIENCE. Scan®500 - прилад автоматичного підрахунку колоній, а також визначення зон затримки росту, що дозволяє досліджувати чутливість бактерій до антибіотиків. Він дозволяє проводити вимірювання зони затримки росту в автоматичному або ручному режимі та проводить фото та відео фіксацію матеріалу у кольоровому режимі.

Отримані результати автоматично обробляються в комп'ютерній програмі та обраховуються згідно з заданими параметрами. Результати оцінювали відповідно до рекомендацій Європейського комітету з протимікробної чутливості EUCAST версія (10.0) [80] та національних критеріїв оцінки стійкості до антибіотиків - методичних вказівок «Визначення сприйнятливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» [144].

У процесі обліку результатів з визначення чутливості дослідних стафілококів до Оксациліну ретельно оглядали зону затримки росту в пронизуючих променях джерела світла з метою виявлення росту окремих колоній. За відсутності росту колоній, дослідний ізолят оцінювали, як чутливий; поява видимого росту більше 1 колонії або вуалеподібного росту на місці нанесення культури означає резистентність даного штаму до оксациліну [144].

2.3. Визначення здатності до утворення біоплівки

Біоплівка це складна організована структура, мікробні клітини, які розміщені у вироблених ними матриці позаклітинних полімерів. Бактерії в

біоплівці володіють власним видом метаболізму. Також відрізняється процес транскрипції генів та утворення білків у мікроорганізмів що знаходяться у біоплівці.

Визначали здатність утворювати біоплівки у похідних ізолятах та інтерпретували отримані результати [20]. Для чого використовували стерильні полістирольні чашки Петрі (Greiner Bio-One GmbH, Німеччина) діаметром 35 та 100 мм, в які додавали по 5 - 10 мл триптон-соєвого бульйону (HiMedia, Індія) і додавали 1 мл інокуляту з вмістом клітин добової культури досліджуваних стафілококів 0,5 по MacFarland.

Культури стафілококів внесені в чашки Петрі культивували в термостаті при температурі 37°C протягом 24 годин, залишки живильного середовища обережно видаляли, планктонні форми промивали тричі стерильним розчином фосфатного буфера ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{Na}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) (pH 7.2–7.4). Чашки Петрі сушили на повітрі та додавали 5 мл 96 % етанолу для фіксації утворених біоплівок.

Експозиція фіксації становила 10 хвилин. Після чого фіксуючу рідину зливали, висушували на повітрі, біоплівку що сформувалася на дні чашок Петрі фарбували 0,1% спиртовим розчином кристалічного фіолетового протягом 10 хв.

Зафарбовані розчином кристалічного фіолетового біоплівки тричі промивали стерильним розчином фосфатного буфера (pH 7,2) і висушували. Оцінювали візуально інтенсивність сформованої біоплівки. З метою визначення оптичної щільності утворених біоплівок вносили 5 мл етанолу 96 % і поміщали на шейкер для струшування протягом 30 хв.

Після чого вміст чашок Петрі відбирали і вимірювали кількість поглинання біоплівкою барвника на спектрофотометрі Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, США) на довжині хвилі 570 нм.

Щільність утвореної біоплівки визначали шляхом вимірювання рівня адсорбції барвника з етанолом, виміряного в одиницях оптичної густини (ОД) за допомогою спектрофотометра.

В якості негативного контролю використовували чашки з незасіяним поживним середовищем які промивали і фарбували як зазначено вище.

Коли значення оптичної щільності менше 0,1, вважалось, що штами не утворюють біоплівки, від 0,1 до 0,49 - здатність утворювати плівку вважалась низькою. При значенні оптичної щільності від 0,5 до 1,0 - середня щільність біоплівки та здатність її формувати. При значеннях вище 1,0 - висока здатність утворювати біоплівку та її висока щільність [20].

2.4 Молекулярно-генетичні дослідження

2.4.1 Підбір праймерів для виявлення детермінант патогенності – генів, що викликають стійкість до метициліну та утворення біоплівок

З даних спеціальної літератури встановлено, що різні фактори патогенності у стафілококів кодують різні гени. Нами було підібрано праймери, які використовують для виявлення здатності до утворення біоплівки та стійкості до метициліну (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Характеристики праймерів, які були використані в дослідженні.

№	Дослідний ген	Властивості	Джерела
1	2	3	4
1	<i>mec A</i>	Кодує додатковий пеніцилінзв'язувальний білок(ПЗБ2а), який відповідає за стійкість до метициліну та інших β -лактамних антибіотиків у мікроорганізмів з роду <i>Staphylococcus</i>	[123]
2	<i>fem B</i>	Кодує фермент, який зшиває білки пептидоглікани мікробної стінки у мікроорганізмів з роду <i>Staphylococcus</i> таким чином підвищує стійкість до антибіотиків.	[123]

Продовження таблиці 2.3

1	2	3	4
3	<i>ica A</i>	Кодує утворення біоплівки у стафілококів. Разом з генами <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>icaB</i> та <i>icaC</i> входить до локусу гена <i>ica</i> (intercellular adhesion) (міжклітинної адгезії), <i>IcaA</i> - це N-ацетилглюкозамін трансфераза, яка спільно з <i>IcaD</i> виробляє олігомер N-ацетилглюкозамін	[209]
4	<i>ica D</i>	Кодує утворення біоплівки у стафілококів Разом з генами <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>icaB</i> та <i>icaC</i> входить до локусу гена <i>ica</i> (intercellular adhesion) (міжклітинної адгезії), спільно з <i>IcaA</i> виробляє олігомер N-ацетилглюкозамін	[209]
5	<i>ica AB</i>	Кодує утворення біоплівки у стафілококів. Разом з генами <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>icaB</i> та <i>icaC</i> входить до локусу гена <i>ica</i> (intercellular adhesion) міжклітинної адгезії.	[92]

2.4.2. Полімеразно-ланцюгова реакція

Дослідження отриманих ізолятів на наявність генів *tesA*, *fem B*, *ica A*, *ica D* та *ica AB* виконували методом ПЛР з розділенням продуктів ампліфікації в агарозному гелі. Як негативний контроль використовували суміш для ПЛР без ДНК.

Геномну ДНК із культури *Staphylococcus spp* виділяли експрес-методом згідно методичних рекомендацій «Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів» [3].

Для цього ліофілізовану масу культури *Staphylococcus spp* розчиняли в 1 см³ стерильної забуференої пептонної води (HiMedia, Індія) і центрифугували при 13,5 тис. Об/хв протягом 2 хв і супернатант видаляли.

Бактеріальну масу ресуспендували в буфері 200 мм³ TE і інкубували в термостаті при 95°C протягом 5 хвилин. Клітинний залишок осаджували центрифугуванням при 5,0 тис. об/хв. протягом 2 хв і брали 180 мм³ супернатанту, який використовували в ПЛР. Концентрацію ДНК вимірювали на спектрофотометрі Biofotomer (Еппендорф, Німеччина) при довжині хвилі 260 нм.

Реакцію ампліфікації проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл із наступним складом: 1х буфер ПЛР, 2,5 мМ MgCl₂, 2,0 мМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 10 мкМ кожного з праймерів для виявлення цільової мішені та 1 Од ДНК-полімерази. ДНК додавали в кількості 5,0 мм³ (100–150 нг). Дослідження проводили на термоциклері 2720 (Applied Biosystems, США) з температурним профілем, наведеним у відповідному джерелі літератури. Нуклеотидні послідовності та інші характеристики праймерів, які були використані в дослідженні, наведені в табл. 2.4. Продукти ампліфікації розділяли в 1,5% агарозному гелі.

Таблиця 2.4

Нуклеотидна послідовність праймерів які були використані в дослідженні

№	Дослідний ген	Нуклеотидна послідовність праймерів	Розмір (bps)	Джерела
1	2	3	4	5
1	<i>tec A</i>	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	310	[123]
2	<i>fem B</i>	TTA CAG AGT TAA CTG TTA CC ATA CAA ATC CAG CAC GCT CT	651	[123]

Продовження таблиці 2.4

1	2	3	4	5
3	<i>ica A</i>	ACA CTT GCT GGC GCA GTC AA TCT GGA ACC AAC ATC CAA CA	188	[209]
4	<i>ica D</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG AGT ATT TTC AAT GTT TAA AGC AA	198	[209]
5	<i>ica AB</i>	TTA TCA ATG CCG CAG TTG TC GTT TAA CGC GAG TGC GCT AT	546	[92]

2.5. Ліофілізація отриманих культур

З метою подальшого вивчення, формування колекції цінних для біотехнології штамів та створення і реєстрації «Засобу виявлення збудників харчових зоонозів з використанням полімеразної ланцюгової реакції» попередньо дослідженні виділені культури стафілококів піддавали ліофільному висушуванню для довготривалого зберігання.

В роботі використовували штами *Staphylococcus aureus* виділені під час проведення мікробіологічних досліджень патологічного матеріалу від тварин в науково-дослідному відділі мікробіологічних досліджень УЛЯБП АПК НУБІП України. Культуральні та захисне середовища виготовляли та контролювали відповідно до ISO 11133:2014 “Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media”. В якості кріопротектора використовували захисне середовище Файбича (желатин – 1,0 %; сахароза – 10,0 %, вода дистильована – 89 %); до бульйонних 24 - годинних культур *Staphylococcus aureus* додавали захисне середовище у співвідношенні об’єму 1 : 1. Кожну досліджувану культуру розфасовували по 1,0 см³ у флакони об’ємом 5 см³.

Перед відправленням на ліофілізацію (кріоконсервацію та подальшу сублімацію) з кожної дослідної партії відбирали по три флакони для визначення типовості, однорідності та концентрації бактеріальної маси у

суспензії (КУО/см³). Кріоконсервацію культур здійснювали у морозильній камері Forma 700 Series Thermo Scientific (USA) за температури -70 °С

Сублімаційне висушування проводили в апараті LP-3 фірми TelStar (Іспанія) з глибоким вакуумом 0,17 mB і температурою конденсора 45–50 С. Після ліофілізації визначали типовість, однорідність та концентрацію життєздатних мікробних клітин (КУО/см³) у дослідних зразках.

З метою встановлення концентрації життєздатних мікроорганізмів готували зразки відповідно до ISO 6887-1 «Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Приготування проб для випробувань, вихідних суспензій і десятикратних розведень для мікробіологічних досліджень. Частина 1. Загальні правила приготування вихідної суспензії та десятикратних розведень».

Біологічні властивості досліджуваних штамів визначали перед ліофілізацією та у відновлених на різних поживних середовищах культур. Дослідження проводили відповідно до ДСТУ ISO 6888-1:2003 [16]. З метою відновлення ліофілізованих бактеріальних культур використовували декілька варіантів культуральних середовищ табл. 2.5.

Таблиця 2.5

Культуральні середовища для бактеріальних культур

Штам	Поживне середовище	Виробник
<i>S. aureus</i>	М'ясо-пептонний бульйон (з додаванням 5 % сироватки крові коня та 0,5 % глюкози)	Фармактив (Україна)
	М'ясо-пептонний бульйон (з додаванням 5% сироватки крові ВРХ та 0,5 % глюкози)	Фармактив (Україна)
	ТСБ (Триптон-соєвий бульйон (Tryptone soya broth)	HiMedia (India)
	СМБ (Серцево-мозковий бульйон (BHI Broth)	HiMedia (India)

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми Excel-2010 з розрахунком середньої арифметичної (M) і похибки середньої арифметичної (m).

Висновки до розділу 2

В нашій роботі використовували загальноприйняті методики досліджень та статистичну обробку результатів.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз поширення стафілококів потенційних патогенів – будників зооантропонозів

Відповідно до прийнятої ВООЗ-МЕБ стратегії «Єдине здоров'я» («One Health»), увага фахівців, які забезпечують охорону здоров'я населення, повинна зосереджуватися і на вивченні біологічних особливостей потенційних патогенів – збудників зооантропонозів з метою запровадження ефективних заходів попередження захворювань.

Стафілококоз - інфекційна хвороба всіх видів домашніх та деяких диких тварин та людини, що уражує органи дихання, шкіру, статеві органи, молочну залозу, (можлива септицемія,); у птиці з гострим або хронічним перебігом - проявляється у вигляді артрити, синовіту, дерматиту, синуситу, клоациту та запалення сережок.

Головним місцем локалізації стафілококів у організмі хазяїна є шкіра, слизові оболонки й кишечник. Стафілококи входять до складу нормальної мікрофлори тіла тварин і людини, знаходяться з нею в симбіозі, однак, за порушення імунного статусу організму, спричиняють захворювання інших органів та тканин. У довкілля стафілококи потрапляють від хворих тварин і людей та клінічно-здорових носіїв вказаних мікроорганізмів. Вони постійно знаходяться у повітрі, воді, ґрунті, на різноманітних предметах вжитку.

При контакті з хворими в окремих осіб може формуватись резидентне стафілококове бактеріоносійство, коли постійним місцем їх проживання стає слизова оболонка носа, звідки вони розповсюджуються з секретами. Таке носійство особливо небезпечне серед медичного персоналу лікарень, оскільки носії можуть стати джерелом внутрішньогоспітальних інфекцій. Найчастіше факторами передачі цієї хвороби являються контаміновані продукти рослинництва, тваринництва (молоко, м'ясо) та риба.

Поширені випадки зараження через ґрунт, воду, від хворих та безсимптомних носіїв збудника (тварин і людей), та під час різних лікарських маніпуляцій. Тобто, захворювання тварин і людини, зумовлених представниками роду *Staphylococcus*, можна віднести до групи емерджентних захворювань.

Стафілококові інфекції привертають до себе увагу дослідників у зв'язку з відносно високим рівнем реєстрації захворювань (в першу чергу серед людей) зумовлених стафілококами, виявленню нових факторів патогенності (формування бактерійної біоплівки, тощо).

Поширеність стафілококів у природі, повідомлення про тенденцію до зростання стійкості стафілококів до антибактеріальних засобів, випадки внутрішньолікарняних спалахів стафілококових інфекцій, тривале безсимптомне стафілококоносійство у людей і тварин з можливим перехресним зараженням, значні економічні збитки від захворюваності, зниження продуктивності, загибелі сільськогосподарських тварин, а також значні витрати на профілактичні заходи та госпіталізацію хворих на стафілококоз людей (лікування, санація бактеріоносіїв, тощо) стало підставою для проведення цих досліджень.

Згідно з «Коротким визначником бактерій Берджі» (Том 2. 1997р.) [19] рід *Staphylococcus* налічує понад 20 видів більшість з яких сапрофіти. Стафілококи це грам-позитивні бактерії сферичної форми, які трапляються у формі скупчень, що нагадують виноград, нерухомі не утворюють спор. Факультативні анаероби. Колонії найчастіше непрозорі, білі або кремові, іноді від жовтого до оранжевого кольору. Добре ростуть на поживних середовищах з додаванням 10 % NaCl, оптимальна температура росту 30 – 37 °C [19].

Найбільше значення мають види *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* - які є патогенними для людей і тварин *S. Intermedius* – патогенний для тварин, а також [10] у деяких випадках беруть участь у

виникненні різних форм захворювання у людини *S. hyicus*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. cohnii*.

S. aureus (серед інших представників роду) має найбільший патогенний потенціал і може бути етіологічним фактором цілої низки хвороб людини і тварин, його патогенність в основному пов'язані з токсиноутворенням, інвазивністю та стійкістю до дії антибіотиків. Європейський орган по безпеці харчових продуктів (European Food Safety Authority) акцентував увагу на необхідності відстеження метицилін-стійких (MRSA) клонів стафілококів у продуктах тваринництва (виявлення і кількісне визначення MRSA в популяціях людей, тварин, продуктах харчування, об'єктах довкілля) [39].

Джерело збудника. Хворі тварини, тварини-бактеріоносії. *Шляхи зараження:* аліментарний, контактний через ушкоджену шкіру, можлива вертикальна передача збудника. *Фактори передачі:* інфіковані їжа, корми (м'ясо, молоко, інші продукти тваринного походження), вода, виділення і екскременти хворих тварин.

Для розвитку захворювання у багатьох випадках необхідні певні умови – сприяючі фактори: імунодефіцитний стан, порушення екологічної рівноваги між співчленами мікробіоценозу тварини, субклінічні або клінічні форми порушення обміну речовин, діагностичні та косметичні маніпуляції, що приводять до порушення цілості шкіряного покриву і слизових оболонок, тощо. Після проникнення збудника через ушкоджену шкіру або слизові оболонки стафілококи з кров'ю потрапляють у внутрішні паренхіматозні органи, розмножуються.

При цьому в навколишнє середовище виділяються значні кількості екзотоксинів, дія яких на організм і обумовлює провідні симптоми захворювання. У ряді випадків стафілококи зумовлюють вторинні захворювання при віспі, грипі, ранових інфекціях, а також післяопераційні сепсиси [15].

Особливо гострою є проблема маститів у ВРХ де стафілококи відіграють провідну роль. У собак стафілококова інфекція проявляється у формі піодермій, отитів, вагінітів та маститів у самок, поститів у самців.

Високочутливі до стафілококів кролі особливо молодняк в яких окрім піодермій та пододерматитів може розвиватися септикопіємія. Стафілококоз домашньої птиці проявляється у гострій та хронічній формах: за гострої форми з'являються дерматити а за хронічної уражуються сухожилкові піхви та суглоби, що призводить до анкілозу останніх.

У свиней ураження стафілококами проявляються рідко в одиничних випадках у молодняку у вигляді артритів, омфалітів, у старшого поголів'я абсцеси виявляють в основному під час забою.

Педан В.А. (2005) вперше в Україні детально описав прояви стафілококозу перепелів, гостру та хронічну форму захворювання [25].

Опубліковані повідомлення [105] про результати скринінгу стафілококів на 14 (203 зразка) молочних фермах в Алжирі: стафілококи виявили у 30 відсотків корів, з них 67,21% - коагулазонегативні, а 32,79% - коагулазопозитивні стафілококи. ES Donkor та ін. [74] повідомляють, що при дослідженні сирого молока в двох містах республіки Гана Ассра та Kumasi окрім йерсіній, клебсієл, протей, та кишкової палички траплялися стафілококи приблизно у 14,6% проб.

При дослідженні сирого молока на фермах в Udi Нігерія виявили 16 ізолятів різних мікроорганізмів (*Bacillus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Rhizopus*, *Fusarium*) з них роду стафілокок -3, що склало 18,75% [37]. Sileshi Shiferaw та Munees Ahmad наводять дані про виділення золотистого стафілокока із 98 зразків (45%) сирого молока від корів Ефіопії, 96% серед виділених були стійкими до одного або кількох антибіотиків [195].

В регіоні Tigray (Ефіопія), в молоці та молочних продуктах було виявлено стафілококи 47% та 28,8% відповідно: 51,6% з них були коагулазонегативні, а 36,13% - *S. epidermidis*, 38,7% - *S. aureus*, крім того, були ізольовані *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S.*

hominis, *S. succinus*, *S. carnosus*, *S. caprae*, *S. devriesei* [79]. А в регіоні Hawassa (Південна Ефіопія) з 160 проб молока було виділено 78 ізолятів *S. aureus*, які були резистентними до Ванкоміцину -38,5%, Оксациліну - 60,3%, Цефтріаксону – 23,1%, Ампіциліну – 70,9%, Амоксациліну-клавуланату - 30,9 [67]. **Помилка! Джерело посилання не знайдено.**].

Аналізуючи опрацьовані джерела можна зробити висновок що актуальною є проблема поширення золотистого та інших стафілококів для країн Африки, що зумовлено низьким технологічним рівнем ведення тваринництва. За таких умов при доїнні власники худоби не дотримуються санітарно-гігієнічних правил і молоко контамінується мікроорганізмами, зокрема - представниками родини *Staphylococcaceae*.

Щодо ситуації у США маються повідомлення стосовно поширення метицилін-резистентного (MRSA) та метицилін-чутливого (MSSA) *S. aureus* в молочних танках на фермах штату Міннесота. Так з 150 об'єднаних проб з молочних танків з 50 ферм зібраних протягом трьох сезонів (весна, літо, осінь 2009 року) було виявлено 93 MSSA і 2 MRSA ізоляти. Також автори наводять дані щодо виявлення 0,6% від 846 ізолятів MRSA у штаті Мічиган, 1,8% із 2132 у Вісконсіні. В той же час у Вермонті та Пенсильванії рівень виявлення MSSA складав виявлено 38% та 67% відповідно [106].

Результати дослідження, опубліковані в журналі American Society of Microbiologists (ASM) з прикладної та екологічної мікробіології у 2016 році свідчать, що патогенні мікроорганізми можуть також долати видовий бар'єр. Автори вказують на те, що зелені мавпи в Гамбії набули золотистий стафілокок від людини: штами золотистого стафілокока виділені з носа здорових мавп за біологічними властивостями були ідентичними штамам, виділених від людей які мешкають в цій місцевості [192].

В країнах Європи, де перевага надається інтенсивним типам ведення тваринництва, контролюється не лише тваринницька продукція на предмет контамінації мікроорганізмами з роду *Staphylococcus*, а також ведеться

нагляд за поширенням модифікованих варіантів стафілококів з стійкістю до антибактеріальних препаратів.

Європейське відомство з безпеки харчових продуктів (EFSA) оприлюднило звіт за 2015 рік в якому наведено дані щодо кількості випадків виявлених *S. aureus* (MRSA) в країнах Європи. Метицилінрезистентні стафілококи (MRSA) – це стафілококи, резистентні до β -лактамних антибіотиків. Ген *mecA*, кодує утворення модифікованого пеніцилінзв'язуючого протеїну і через це перешкоджає вбудовуванню β -лактаму в клітинну стінку.

Резистентність стафілококів до метициліну (оксациліну) представлена відомими нам на даний час трьома основними механізмами: 1) продукція додаткового пеніцилінзв'язуючого білка (ПЗБ) – ПЗБ-2а, який кодується хромосомальним геном *mecA* - це класична резистентність до метициліну; 2) внаслідок інактивації гіперпродукцією β -лактамаз; 3) за рахунок модифікації нормальних ПЗБ. MRSA, названі за місцем першого виділення, з профілем антибіотикорезистентності, згруповані за трьома молекулярно-генетичними групами маркерів – клональним комплексом (CC), клональними лініями (ST) та SPA типу (t) [211].

Різновиди MRSA, що викликають інфекції у людини згідно даних Європейського відомства з безпеки харчових продуктів (EFSA) прийнято розділяти на три основні категорії: перша - це госпітальні штами - healthcare associated (HA-) які циркулюють в медичних закладах, друга це штами які циркулюють в певних суспільних групах - community-associated (CA-) , і третя група це штами які циркулюють серед тварин - livestock-associated (LA-) MRSA.

HA-MRSA і CA-MRSA, включають в себе штами, які переважно впливають на людей, і вони як правило, не пов'язані з продуктивними тваринами. LA-MRSA був виявлений у свиней і птиці, а також інших видів сільськогосподарських тварин у багатьох країнах світу. LA-MRSA також

може передаватися людині, особливо там, де професійний постійний контакт з ураженою худобою та тушами [211].

Можна відзначити значні коливання у рівні виявлення MRSA між країнами Європи. Аналіз свідчить, що у країнах Північної Європи рівень циркуляції MRSA значно нижчий, в порівнянні з країнами Південної і Південно-Східної частини Європи. Останні розробки підкреслюють корисність такого моніторингу, наприклад виявлення *mecC*- MRSA у свиней.

В Данії [211] було виявлено *mec*-MRSA (що в основному належить до спа-типу t843) у свиней і сільськогосподарських робітників на одній фермі, які були тісно пов'язані між собою, висловлено припущення про передачу між людьми і свинями на фермі. Секвенування геному і філогенетичний аналіз показав кластеризацію декількох ізолятів на фермі та виділених ізолятів від фермера, що дало авторам підстави розглядати фермера як джерело стафілококів для тварин [211].

Також у даному звіті надана інформація що у 2015 році Німеччина, Фінляндія Словаччина та Іспанія, а також Швейцарія надали інформацію про наявність MRSA в різних категоріях продуктів харчування. У Фінляндії дослідили 303 порцій свіжого м'яса свиней, серед яких 3,0% дали позитивний результат на MRSA. У Словаччині із харчових продуктів не було виділено MRSA. В Іспанії досліджували свіже м'ясо кроликів і було виявлено п'ять позитивних зразків (8,3%). У Швейцарії досліджували 301 проби свинини, 0,7% дали позитивний результат на MRSA.

У Фінляндії і Швейцарії проводили відповідну спа-типізацію для позитивних результатів. Спа-тип T034 (загальний спа-тип, пов'язаний з CC398) був зареєстрований в Швейцарії та Фінляндії. У Фінляндії встановили, що спа-тип t2741 виявлений в м'ясі свиней, також пов'язаний з CC398.

В 2015 році, Бельгія, Німеччина та Іспанія, а також Норвегія та Швейцарія, представили дані про поширеність MRSA серед продуктивних тварин та навколишньому середовищі. У свиней, поширеність MRSA в

партіях забою тварин оцінювалась на високому рівні 91,4% в Іспанії, в той час як в Німеччині, поширеність MRSA в стадах свиноматок (ділянки селекції) і стада свиней на відгодівлі з одних і тих же підприємств було виявлено 26,3% і 41,3%, відповідно. У Швейцарії поширеність MRSA у свиней при забої склала 25,7%. В стадах великої рогатої худоби в Бельгії реєстрували циркуляцію MRSA серед корів і тварин на відгодівлі на рівні 10,4% і 15,4% відповідно, а серед телят віком менше одного року - 78,9% [211]. Аналіз даних Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (США, 2015 р.) свідчить, що за останні роки (рис.3.1) кількість виділених від людей

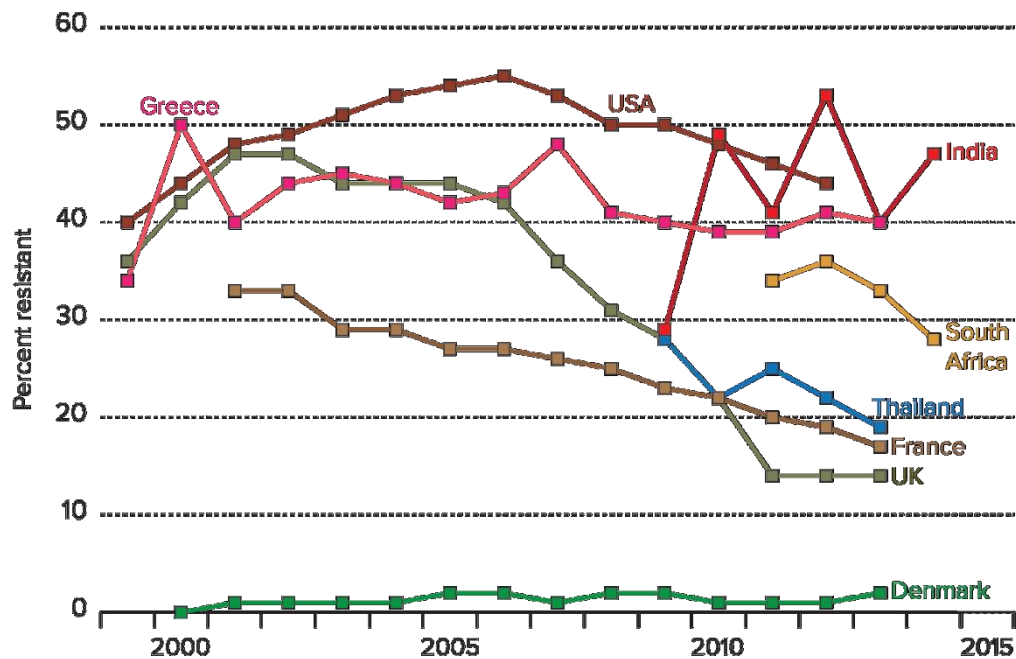


Рис.3.1. Динаміка виявлення MRSA у деяких країнах, 1999-2014 рр. (за даними CDDEP 2015 р.) [212].

метицилін-резистентних *Staphylococcus aureus*, має тенденцію до зниження у країнах Європи (Франція, Велика Британія, Греція), США, Південно-Африканської республіки, на відміну від інших країн Центральної та південної Африки, Індії, Австралії та країнах Латинської Америки, де реєструють значний відсоток MRSA, виділених від людей [212].

Необхідно зазначити, що потужні підприємства по виробництву свинини стають стійкими внутрішніми резервуарами MRSA з потенціалом зоонозної передачі. У Норвегії дослідження 252 ферм, і два національні опитування, проведені в 2011 і 2012 роках показали дуже низьку поширеність LA-MRSA в популяції свиней. Імпорт живих свиней в Норвегію з інших країн є незначним, і це є важливим фактором епідеміологічного і біологічного захисту промислового стада свиней.

Стратегія ліквідації LA-MRSA включає в себе щорічні скринінги популяції свиней, обмеження на торгівлю живими тваринами підозрілими на захворювання, депопуляція свиней в LA-MRSA позитивних підприємствах і ретельне очищення та дезінфекція приміщень до завезення поголів'я свиней з MRSA-негативних стад.

Після заміни поголів'я, зразки відбирають у тварин і з навколишнього середовища для оцінки ефективності ерадикації MRSA. Аналіз результатів впровадження процедури ліквідації LA-MRSA показав її високу ефективність (в першому циклі - 90% ферм оздоровлено [211]). Ця стратегія «знайти і знищити» спрямована на запобігання поширення MRSA.

Інфекції, пов'язані з медичною допомогою залишаються основною проблемою громадського здоров'я та загрозою безпеці пацієнтів у всьому світі [81,94].

Що стосується частоти катетер асоційованих інфекцій то Салманов (2019) у своїй праці констатує, що протягом 36 місяців (січень 2012 – грудень 2014) у відділеннях інтенсивної терапії 4 київських міських лікарень катетер асоційовані інфекції були викликані *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus epidermidis* у 14.6% випадків. З них 59,8% та 6,6% виділених *Staphylococcus aureus* були стійкими до оксациліну та тейкопланіну відповідно [187].

Також Салманов (2019) описує, що з 3753 випадків інфекцій, пов'язаних із медичною допомогою у лікарнях швидкої допомоги в Києві протягом 2014-2016 років *Staphylococcus aureus* викликали у 14.8% випадків а коагулазонегативні стафілококи у 7.5% випадків відповідно [186]. Так

золотистий стафілокок виділяли при пневмонії і хворобах нижніх дихальних шляхів у 12,6% випадків, при захворюваннях з хірургічним втручанням у 18,0% випадків, хворобах сечовивідних шляхів у 1,8% випадків, хворобах кровотоку у 15,9% випадків [186]. Частота виділення патогенних і стійких до антибіотиків стафілококів свідчить про серйозну загрозу цього патогена для тварин і людей.

3.2. Бактеріологічні дослідження виділених культур стафілококів

Для подальших більш детальних мікробіологічних досліджень було обрано 35 штамів виділених з молока наданих нам з «Лабораторії якості молока «Uman Labs» Черкаська область а також 86 культур від свиней, 25 від тварин компаньонів і 19 виділених від пацієнтів лікарень.

3.2.1. Дослідження культурально-морфологічних, ферментативних та біохімічних властивостей бактерій роду *Staphylococcus*, виділених з молока хворих на мастит корів

З використаних у дослідженні 160 проб молока культури стафілококів виділялися у 45 пробах, що становило 28.1%.

В тому числі з 14 проб молока від корів хворих на субклінічний мастит з господарства Хмельницької області мікроорганізми з роду *Staphylococcus spp.* було виявлено у 2-х випадках, що склало 14.29%.

В 16 пробах молока хворих субклінічним маститом корів з господарства Київської області стафілококи також були виявлені у 2-х випадках що становить 12.5%.

Ще в одному господарстві Київської області з відібраних 130-ти проб стафілококи виявили у 41 випадку що становить – 31.5 %.

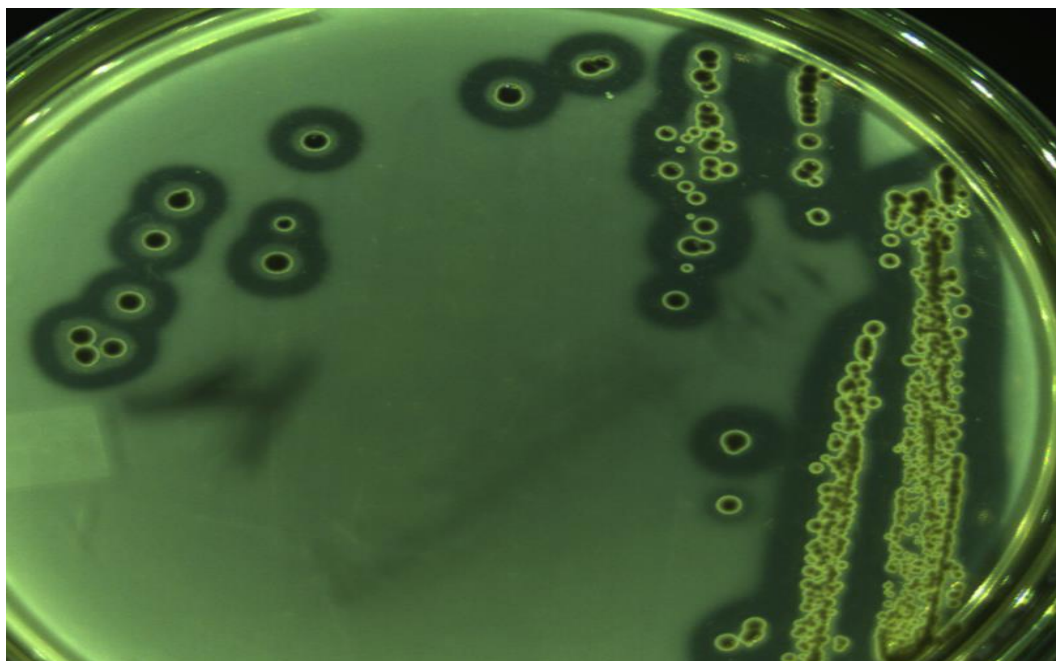


Рис. 3.2. Лецитиназна активність на на середовищі агар Беард-Паркера.

Подальші більш детальні мікробіологічні дослідження нами було акцентовано на 35 штаммах виділених з молока і наданих нам з «Лабораторії якості молока «Uman Labs» Черкаська область.

Після посіву на середовище агар Беард-Паркера виділені культури росли у вигляді типових і не типових колоній. Типові колонії чорні та сірі, блискучі і випуклі 1,0-2,5 мм в діаметрі, оточені чистою зоною. Нетипові колонії були блискучими чорними колоніями з вузьким білим краєм та сірими колоніями, чиста зона була відсутня. При фарбуванні за Грамом виявляли грам-позитивні бактерії сферичної форми у формі скупчень, що нагадували виноград, нерухомі, не утворювали спор. Виділення бульбашок кисню у розчин перекису водню (3%) свідчило про наявність каталази.

Основні характеристики досліджених культуральних та ферментативних властивостей виділених стафілококів наведені у Додатку Б.

Після проведення аналізу біологічних властивостей встановлено що: лецитиназною активністю володіли 13 (37,1%) стафілококів; гемолітичну активність проявляли 6 (17,1%) виділених ізолятів; коагулювали плазму 2 (5,7%) штами. 12 (34,2%) досліджених культур виділених стафілококів

володіли здатністю ферментувати маніт. Росли у вигляді синіх колоній на середовищі агар з лактозою і кристалічним фіолетовим 15 (42,8%) решта 57,2% росли у вигляді білих колоній.

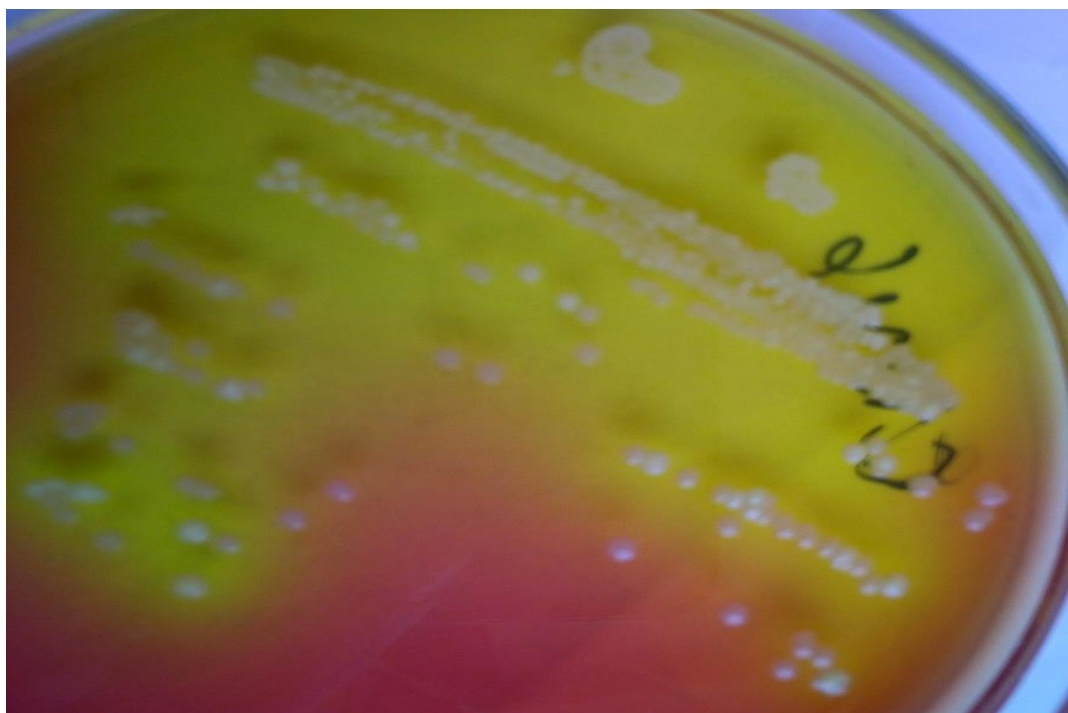


Рис. 3.3 Ферментація маніту на середовищі маніто-сольовий агар.

Одночасно коагулювали плазму, ферментували маніт, проявляли гемоліз, лецитиназну активність та росли у вигляді синіх колоній на середовищі агар з лактозою і кристалічним фіолетовим 2 штами що становить 5,7% виділених з молока штамів.

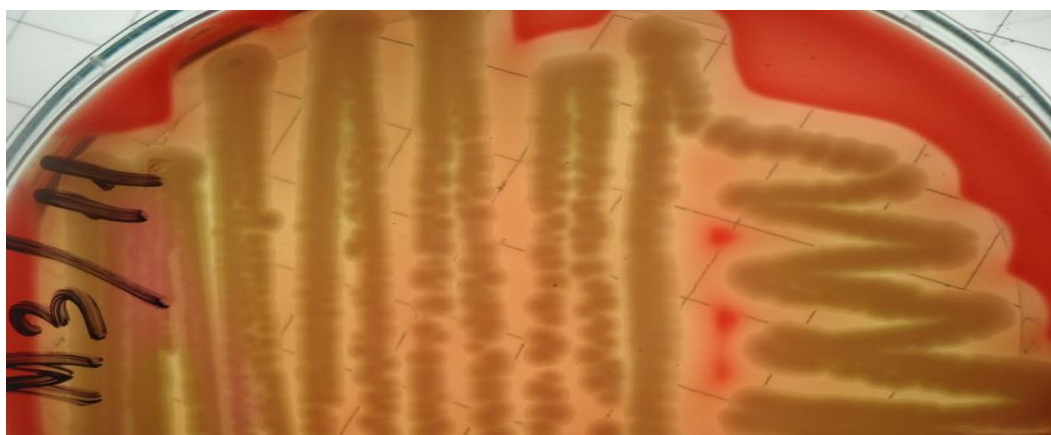


Рис. 3.4 Гемоліз еритроцитів на кров'яному агарі.

Також одночасно ферментували маніт, проявляли гемоліз, лецитиназну активність та росли у вигляді синіх колоній на середовищі агар з лактозою і кристалічним фіолетовим 2 коагулазонегативних штамів, що також склало 5,7% виділених штамів.

В результаті проведення дослідження культуральних та ферментативних властивостей з'ясовано що виділені з молока штамів володіли типовими для представників роду *Staphylococcus* культурально-морфологічними властивостями і проявляли свої специфічні патогенні властивості (коагуляція плазми, гемоліз).

3.2.2. Вивчення особливостей культурально-морфологічних та ферментативних властивостей бактерій стафілококів виділених від свиней

Для дослідження відбирали проби від свиней з двох спеціалізованих свиного господарств: господарства №1 розташованого у Київській області та господарства №2 - що знаходиться у Вінницькій області. Коротка характеристика господарств. Господарство №1 епізоотично благополучне. Кількість поголів'я свиней на момент дослідження знаходилася в межах до 2500 голів. З них основних та ремонтних свинок 210 голів. Гнійних захворювань молодняку, абсцесів та фурункулів зареєстровано не було. Господарство №2 епізоотично благополучне. Кількість поголів'я свиней знаходилася в межах до 3500 голів. З них основних та ремонтних свинок 340 голів. Хвороби що викликаються *Staphylococcus spp* не реєструвалися.

З 77 проб відібраних з носа свиноматок основного стада та ремонтних свинок господарства №1 у 64 випадках (83,1%) були ізольовані *Staphylococcus spp*. На агарі Беард-Паркера виростили типові колонії чорні та сірі, блискучі і випуклі від 1 мм до 1,5 мм в діаметрі після інкубації через 24 год і 1,5-2,5 мм в діаметрі після інкубації через 48 год. 39 ізолятів (60,94)% коагулювали плазму кроля. Здатність гемолізувати еритроцити барана

проявляли 58 (90,6)% штамів. З них 39 коагулазопозитивних штами та 19 коагулазонегативних. Не проявляли гемолітичних властивостей 6 коагулазонегативних культур.

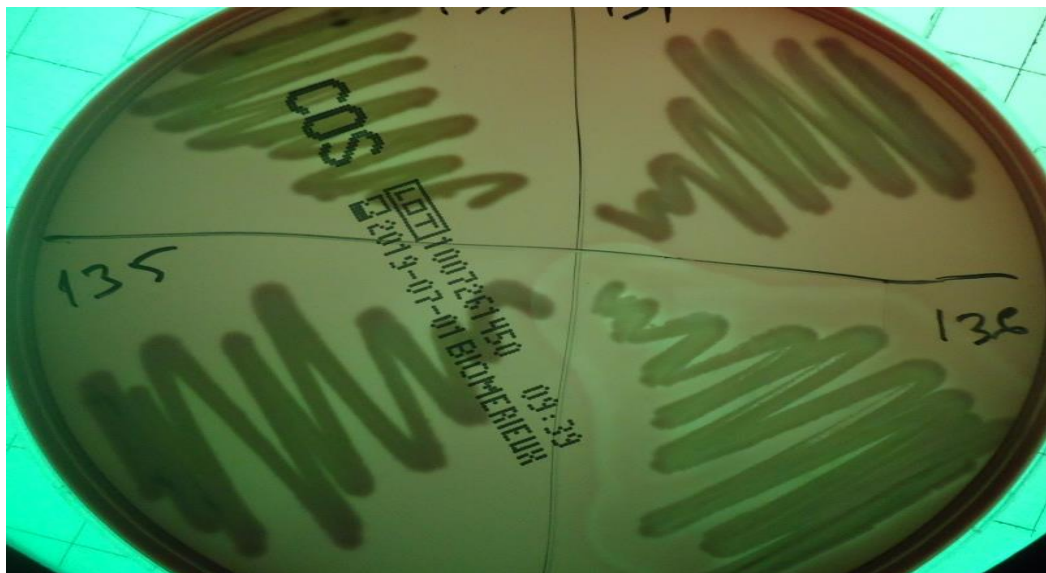


Рис. 3.5. Гемолітична активність на середовищі кров'яний агар.

В 22 пробах (56,4 %) з 39 відібраних у свиноматок основного стада свинокомплексу №2 було виділено ізоляти *Staphylococcus spp.* Ізоляти росли у вигляді блискучих чорних та сірих колоній з вузьким білим краєм. Виділені ізоляти не коагулювали плазму. Гемолітичними властивостями володіли 3 штами (13,6%). Основні характеристики росту на маніто-сольовому агарі та середовищі агар з лактозою та кристалічним фіолетовим стафілококів виділених від свиней не досліджували.

Отримані штами стафілококів від свиней володіли культурально-морфологічними та патогенними властивостями типовими для роду *Staphylococcus*.

Можливість тривалого безсимптомного носійства у свиней без клінічних проявів захворювань і лише при зниженні імунітету тварини можливі спалахи хвороби у молодняку. Так у молодих поросят хвороба проявляється як ексудативний епідерміт (ЕЕ), що викликається штамами *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus chromogenes*,

які виробляють ексфоліативні токсини, але в більшості випадків свині є латентними носіями без будь-яких клінічних проявів [102, 126, 221].

3.2.3. Дослідження культурально-морфологічних властивостей стафілококів одержаних від котів і собак

Клінічний матеріал досліджень було відібрано від 19-ти собак і 25-ти котів пацієнтів ветеринарної клініки різних вікових і статевих груп. Кількісна характеристика відібраних проб по групам захворювань наведена у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Кількісна характеристика відібраних проб по групам захворювань.

Вид	Відібрано проб	Група захворювання				
		Шкіри	Очей	Вух	Травми	Клінічно здорові
Собаки	19	2	4	2	5	6
Коти	25	3	5	3	2	12

В результаті проведених досліджень стафілококи виділено у 44 випадках що становило 54 % з усіх відібраних проб. З 44 проб 14 було виділено від котів і 11 виділено від собак. Наступним етапом було проведення вивчення комплексу культурально-морфологічних та ферментативних властивостей отриманих нами стафілококів.

Після первинного посіву і культивації на середовищі агар Беард-Паркера спостерігали ріст виділених культур стафілококів у вигляді типових колоній чорних та сірих, блискучих і випуклих розміром 1,0-2,5 мм в діаметрі, оточених чистою зоною.

Також було відмічено ріст нетипових колоній які були блискучими чорними з вузьким білим краєм та сірими колоніями, чиста зона була відсутня. При фарбуванні за Грамом виявляли грам-позитивні бактерії

сферичної форми, у формі скупчень, що нагадували виноград, були нерухомі та не утворювали спор.

Для виявлення каталази з агару Беард-Паркера відбирали окрему колонію петлею і вносили її у розчин перекису водню (3%) і спостерігали за виділенням бульбашок кисню, що свідчило про наявність каталази.

Основні характеристики досліджених біологічних властивостей виділених стафілококів наведені у табл. 3.2 та 3.3.

Таблиця 3.2

Культуральні та ферментативні властивості стафілококів виділених від котів

№ ізоляту	Коагуляція плазми	Лецитиназа	Каталаза	Гемоліз	Ферментація маніту	Колір колоній на агарі з кристалічним фіолетовим
17	-	+	+	+	+	Сині
18	-	+	+	-	-	Сині
20	-	+	+	-	-	Сині
22	-	+	+	+	-	Сині
26	-	-	+	+	+	Білі
27	-	-	+	+	-	Білі
28	-	+	+	+	+	Сині
29	-	+	+	-	+	Сині
30	-	+	+	+	-	Білі
31	-	+	+	+	-	Сині
37	-	+	+	+	+	Сині
40	-	+	+	-	+	Сині
41	-	+	+	+	+	Сині
46	-	+	+	+	-	Сині

Примітка: «+» - реакція позитивна, «-» - реакція негативна, «Білі» - колір колоній.

Досліджуючи культуральні та ферментативні властивості стафілококів виділених від котів виявлено що: коагулазопозитивні штами відсутні, здатністю до гемолізу володіли 10 (71,5%) культур. Ферментували маніт 7 (50,0%) штамів. Росли на лактозному агарі з кристалічним фіолетовим у вигляді синіх колоній 11 (78,6%) штамів. Одночасно проявляли лецитиназну

активність, гемоліз, ферментували маніт і росли на лактозному агарі з кристалічним фіолетовим 4 (28,5%) виділених від котів штамів.

Таблиця 3.3

Культуральні та ферментативні властивості стафілококів виділених від собак

№ ізоляту	Коагуляція плазми	Лецитиназа	Каталаза	Гемоліз	Ферментація маніту	Колір колоній на агарі з кристалічним фіолетовим
19	+	+	+	+	+	Сині
21	-	+	+	-	-	Сині
23	-	+	+	-	-	Сині
26	-	-	+	+	+	Сині
33	+	-	+	+	-	Сині
35	-	+	+	+	+	Білі
36	-	+	+	-	+	Сині
38	-	+	+	+	-	Сині
39	-	-	+	+	-	Сині
42	-	+	+	+	+	Сині
43	-	+	+	-	+	Сині

Примітка: «+» - реакція позитивна, «-» - реакція негативна, «Сині» - колір колоній.

Вивчаючи культуральні та ферментативні властивості стафілококів виділених від собак встановлено що: 2 (18,2%) штамів дали позитивну реакцію плазмокоагуляції, решта досліджених штамів були коагулазонегативними. Здатністю до гемолізу володіли 7 (63,7%) виділених від собак штамів. Ферментували маніт 6 (54,6%) штамів. Росли на лактозному агарі з кристалічним фіолетовим у вигляді синіх колоній 10 (91,0%) культур виділених від собак. Одночасно проявляли лецитиназну активність, гемоліз, ферментували маніт і росли на лактозному агарі з кристалічним фіолетовим 3 (27,2%) виділених від собак штамів.

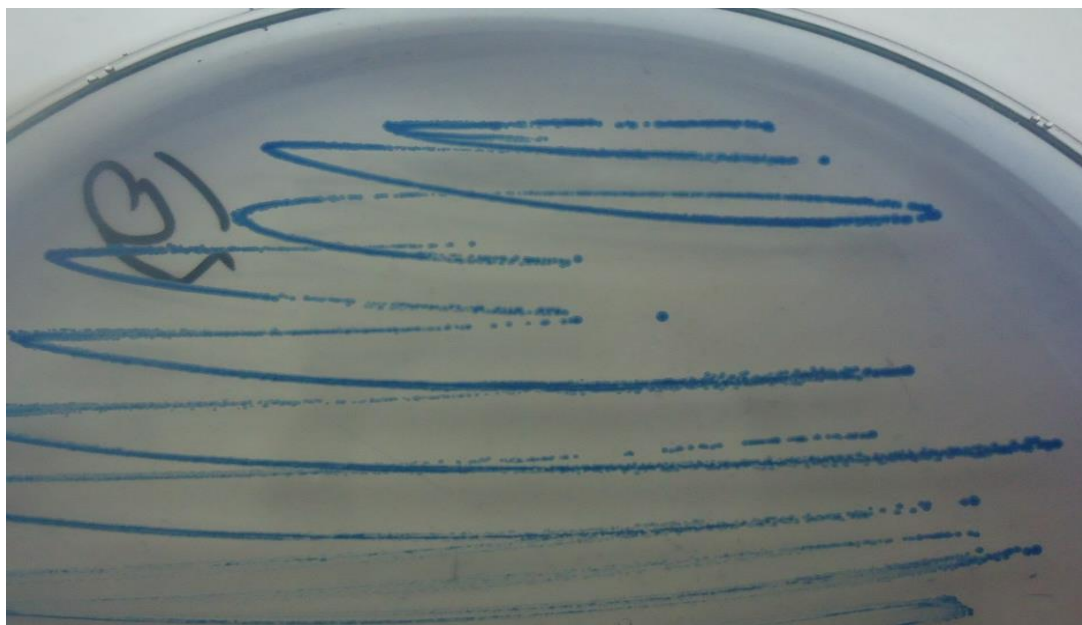


Рис. 3.6. Ріст синіх колоній стафілококів на лактозному агарі з кристалічним фіолетовим.

Так отримані нами в процесі досліджень штами стафілококів виділені від тварин-компаньйонів характеризуються типовими біологічними властивостями що притаманні даному роду мікроорганізмів.

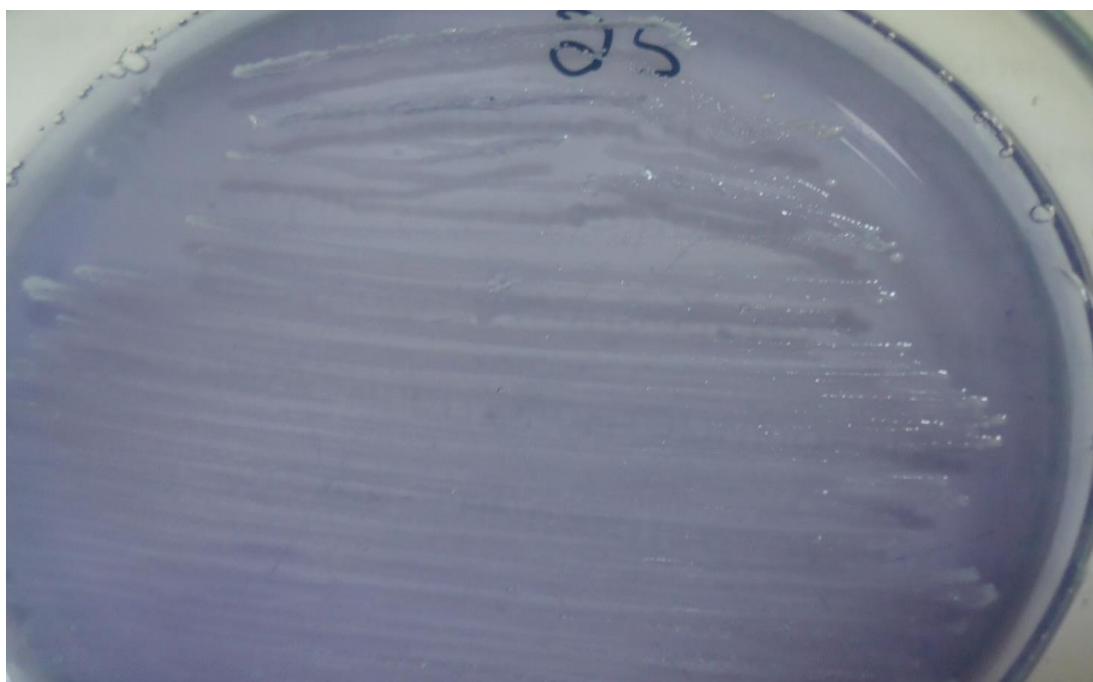


Рис. 3.7. Ріст білих колоній стафілококів на лактозному агарі з кристалічним фіолетовим.

Відсоток стафілококів, які володіли одночасно набором типових біологічних ознак (лецитиназна активність, гемоліз, ферментація маніту і ріст на лактозному агарі з кристалічним фіолетовим) складав 27,2% у собак і 28,5% у котів відповідно.

3.2.4. Особливості культурально-морфологічних властивостей бактерій роду *Staphylococcus*, виділених від людей

Культури стафілококів виділені від пацієнтів з гнійно-запальними процесами люб'язно надані нам Науково дослідною лабораторією Національного університету охорони здоров'я України ім. П.Л. Шупика. Після посіву на середовище агар Беард-Паркера культури росли у вигляді типових і не типових колоній. При фарбуванні за Грамом виявляли грам-позитивні бактерії сферичної форми, які траплялися у формі скупчень, що нагадували виноград, нерухомі, не утворювали спор. Каталазопозитивні. Основні досліджені нами біологічні властивості *Staphylococcus spp.* виділених від людей наведені у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Культуральні та ферментативні властивості стафілококів виділених від людей

№ Штаму	Каталаза	Лецитиназа	Гемоліз	Плазмокоагуляція
1	2	3	4	5
1	Позитивна	Наявна	Присутній	Позитивна
2	Позитивна	Наявна	Присутній	Позитивна
3	Позитивна	Наявна	Присутній	Позитивна
4	Позитивна	Наявна	Присутній	Позитивна
5	Позитивна	Наявна	Присутній	Позитивна
6	Позитивна	Наявна	Присутній	Позитивна
7	Позитивна	Наявна	Присутній	Позитивна

Продовження таблиці 3.4.

1	2	3	4	5
8	Позитивна	Наявна	Присутній	Позитивна
9	Позитивна	Наявна	Присутній	Позитивна
10	Позитивна	Наявна	Присутній	Позитивна
11	Позитивна	Наявна	Присутній	Позитивна
12	Позитивна	Відсутня	Присутній	Негативна-
13	Позитивна	Відсутня	Присутній	Негативна
14	Позитивна	Відсутня	Присутній	Негативна
15	Позитивна	Відсутня	Присутній	Негативна
16	Позитивна	Відсутня	Присутній	Негативна
17	Позитивна	Відсутня	Відсутній	Негативна
18	Позитивна	Відсутня	Відсутній	Негативна
19	Позитивна	Відсутня	Відсутній	Негативна

В результаті досліджень встановлено що 11(57,9%) стафілоkokів проявляли лецитиназну активність; 16 (84,2%) володіли гемолізом; коагулювали цитратну плазму кроля 11(57,9%) виділених штамів. Основні характеристики росту на маніто-сольовому агарі та середовищі агар з лактозою та кристалічним фіолетовим стафілоkokів виділених від людей не досліджували.

Результатом проведення культурально-морфологічних досліджень стафілоkokів виділених від людей стало виявлення того факту що, більше половини 57,9% володіють здатністю до коагуляції плазми та гемолізу. Це в свою чергу свідчить про їх високий патогенний потенціал в можливій комбінації з антибіотикорезистентністю та утворенням біоплівки в етіології гнійно-запальних захворювань у людей і тварин.

3.3. Визначення чутливості до антибактеріальних речовин мікроорганізмів роду *Staphylococcus* виділених з різних об'єктів

3.3.1. Дослідження чутливості до антибіотиків у стафілококів, одержаних з молока

В зв'язку з масовим застосуванням антибіотиків для лікування і профілактики захворювань у ВРХ існує ризик потрапляння антимікробних речовин у секрет молочної залози і до споживача.

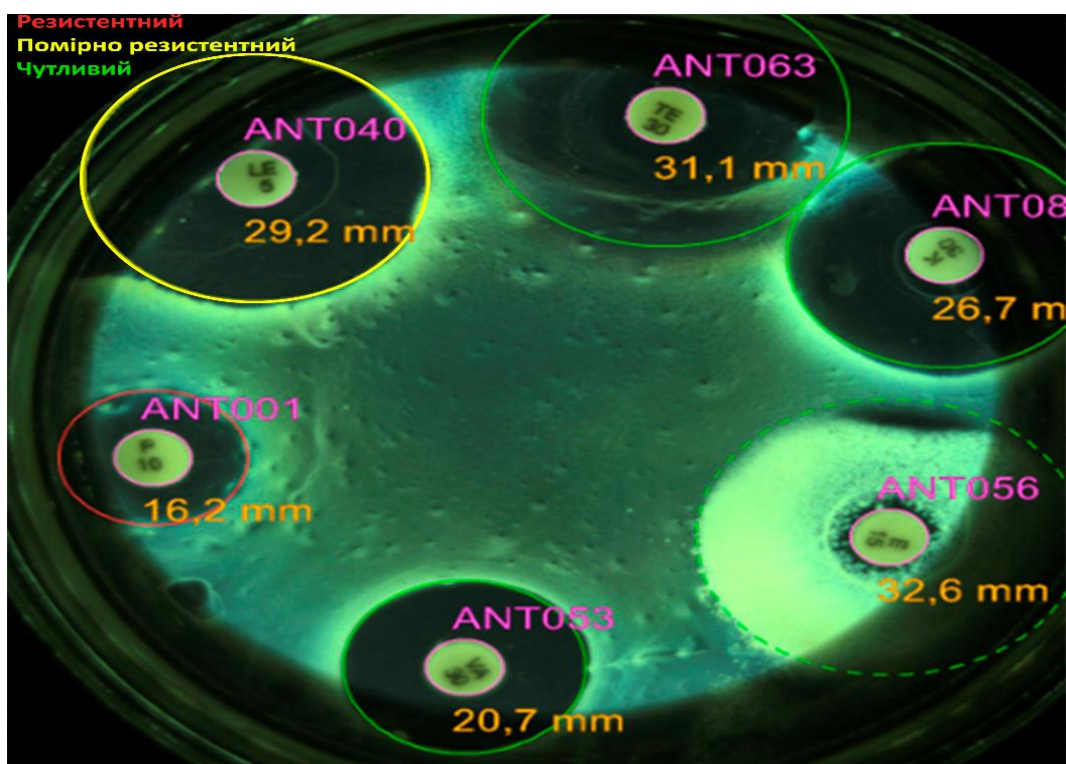


Рис.3.8. Облік результатів зон затримки росту стафілококів за допомогою приладу «Scan® 500».

Широкому застосуванню антибіотиків сприяє не досконалі методи діагностики визначення вмісту і концентрації антимікробних речовин у молоці.

Мікрофлора молочної залози як і сапрофітна мікрофлора організму тварини внаслідок тривалого впливу антибіотиків в субтерапевтичній дозі набуває резистентності до певних речовин.

Коагулазопозитивні стафілококи як збудники маститу та коагулазонегативні як представники природної мікрофлори вимені піддаються впливу антимікробних речовин і здатні формувати власну відповідь у формі стійкості до певних груп антибіотиків.

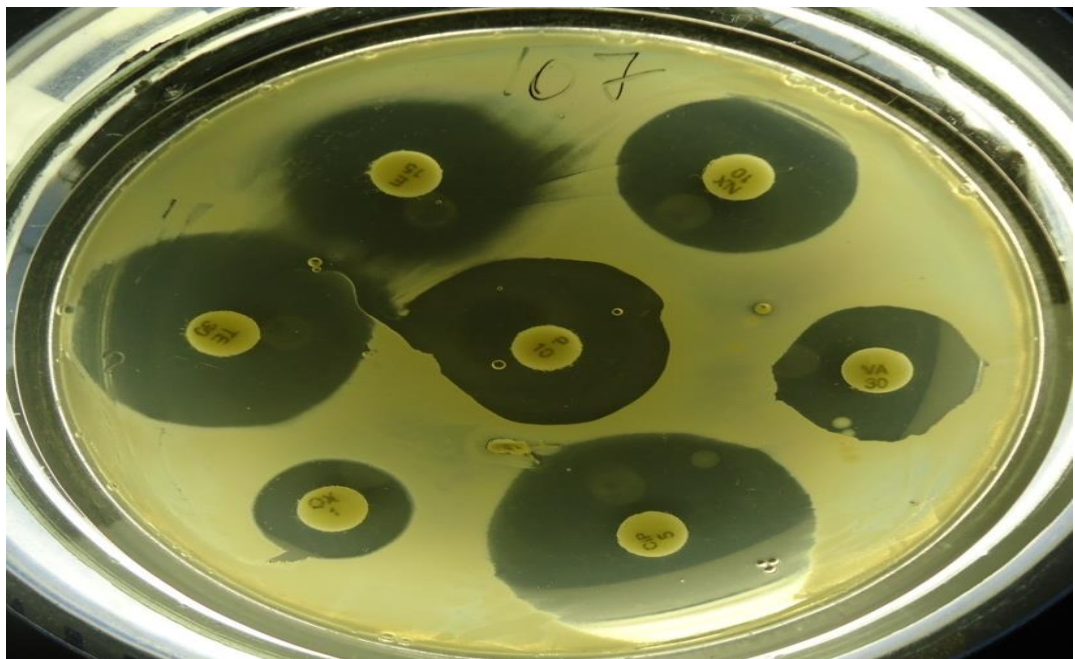


Рис.3.9.Візуалізація зон затримки росту стафілококів. Е -еритроміцин, NX-норфлоксацин, VA- ванкоміцин, CIP- ципрофлоксацин, OX- оксацилін, TE- тетрациклін, P- Бензилпеніцилін.

Розмір зон затримки росту стафілококів виділених з молока наведено у додатку В. При дослідженні стафілококів виділених з молока встановлено, що стійкими до бензилпеніциліну були 2 (5,7%) коагулазопозитивні та 11 (31,4%) коагулазонегативних стафілококи. До оксациліну стійкими були 1 (2,8%) коагулазопозитивний та 8 (22,8%) коагулазонегативних стафілококів. Також до ампіциліну стійкими були 2 (5,7%) коагулазопозитивні і 2 (5,7%) коагулазонегативні стафілококи.

До норфлораксацину стійкі 1 (2,8%) коагулазопозитивний 2 (5,7%) коагулазонегативних. Що до групи фторхінолонів то стійкими до ципрофлораксацину були 1 (2,8%) та 3 (8,5%) коагулазонегативних стафілококи. З групи аміноглікозидів до гентаміцину були стійкі 1 (2,8%) коагулазопозитивний та 8 (22,8%) коагулазонегативних штамів; також до тобраміцину були стійкі 3 (8,5%) коагулазонегативні стафілококи.

До еритроміцину свою стійкість проявляли 8 (22,8%) коагулазонегативних культур. Стійкістю до тетрацикліну володіли 1 (2,8%) коагулазопозитивний та 3 (8,5%) коагулазонегативних штами. До доксицикліну проявляли свою резистентність 1 (2,8%) коагулазопозитивний та 4 (11,4%) коагулазонегативних культури стафілококів.

До хлорамфеніколу стійкість проявляли 3 (8,5%) коагулазонегативних штами. До фузидієвої кислоти стійкими були 2 (5,7%) коагулазопозитивних та 4 (11,4%) коагулазонегативних штамів. Всі культури стафілококів виділені нами з молока були чутливі до ванкоміцину.

В ході аналізу стійкості до антибіотиків встановлено що, коагулазопозитивний штам «133» володів одночасною резистентністю до 9 з 13 досліджених антибіотиків окрім ванкоміцину, хлорамфеніколу, гентаміцину та тобраміцину. Другий коагулазопозитивний штам «136» також був стійким до 5 з 13 досліджуваних антибіотиків окрім оксациліну, ванкоміцину, хлорамфеніколу, тобраміцину, норфлораксацину, ципрофлораксацину, тетрацикліну, доксицикліну.

Коагулазонегативний штам «114» був стійкий до 9 з 13 досліджених антибіотиків а саме до: бензилпеніциліну, оксациліну, еритроміцину, тетрацикліну, доксицикліну, норфлораксацину, ципрофлораксацину, хлорамфеніколу.

Аналіз проведених досліджень чутливості до антибіотиків засвідчив, що серед досліджених культур стафілококів виділених з молока значна частина (34,2 %) припадає на резистентні до двох і більше антибіотиків. Це

вказує на те, що молоко може бути джерелом поширення резистентних до антибіотиків стафілококів.

3.3.2. Вивчення чутливості до антимікробних речовин у культур стафілококів виділених від свиней

Свині як безсимптомні носії MRS і MRSA відіграють важливу роль у процесі передачі стійких стафілококів до людей та інших тварин [102, 126, 221]. Таким чином колонізуючи працівників, що доглядають за свинями, беруть участь у обробці продуктів свинарства, ветеринарних працівників та контамінуючи продукти і відходи свинарства.

Кількість досліджених коагулазопозитивних та коагулазонегативних культур виділених від свиней з господарства №1 та розмір зон затримки росту наведено у додатках Г, Д.

З 39 штамів коагулазопозитивних *Staphylococcus* на чутливість до бензилпеніциліну було досліджено 18 культур. Всі ці штами були стійкими.

На чутливість до оксациліну досліджено 33 коагулазопозитивні штами. Серед них помірно стійким були 3%, стійкими 6% чутливими 91% штамів.

Серед 14 коагулазопозитивних штамів досліджених на стійкість до ампіциліну резистентними були всі 100% ізолятів.

З 14 культур CoPS досліджених на чутливість до аміноглікозидів всі 100% чутливі до тобраміцину та 7,1% штамів стійкі до гентаміцину.

Досліджені на резистентність до еритроміцину 33 штами коагулазопозитивних стафілококів були стійкі у 6% та помірно стійкі у 6% випадків решта 88% культур чутливі.

До тетрацикліну чутливими були 48%, стійкими 52% з 21 дослідженої культури CoPS. До доксицикліну помірно резистентні 28,5% резистентні 28,5% та чутливі 43% штамів з 14 досліджених коагулазопозитивних штамів.

З 13 ізолятів коагулазопозитивних стафілококів до лінкоміцину чутливі 7,8% культур 92% стійкі. З 31 штаму коагулазопозитивних стафілококів

перевіраних на чутливість до кліндаміцину 42% проявляло стійкість а у 58% випадків були чутливими.

27 з 27 досліджених коагулазопозитивних *Staphylococcus* були резистентними до норфлорсацину. 15 з 15 перевіраних на стійкість до ципрофлорсацину коагулазопозитивних стафілококів були резистентними.

До офлорсацину чутливі 4,7% резистентні 95,3% з 21 дослідженої культури. До пефлорсацину 10% резистентні, 60% помірно резистентні та 30% чутливих ізоляти з 10 досліджених CoPS.

З 15 перевіраних на чутливість до ломефлорсацину свою стійкість проявляли 87% культур, помірно стійкими були 6,5% та чутливими 6,5% коагулазопозитивних штамів. Також з 15 коагулазопозитивних штамів 6,7% виділених культур були чутливі до левофлорсацину решта 93,3% були резистентні. До спарфлорсацину резистентні 97% ізолятів та 3% чутливі з 33 перевіраних штамів. До гатіфлорсацину були помірно резистентними 13% та резистентними 87% культур з 15 перевіраних культур. До хлорамфеніколу чутливі всі 100% виділених коагулазопозитивних стафілококів.

Група коагулазонегативних стафілококів складається з 25 штамів.

З 25 коагулазонегативних *Staphylococcus spp* виділених від свиней свиногомплексу №1 до бензилпеніциліну чутливими були 28% стійкими 72% штамів. Всі 25 коагулазонегативних культур були чутливі до оксациліну.

До ампіциліну чутливі 13% стійкі 87% з 23 досліджених культур.

З перевіраних на чутливість до гентаміцину штамів 48% були чутливі, а 52% резистентні. До тобраміцину чутливі 92% та стійкі 8% перевіраних культур. З 25 перевіраних на чутливість до еритроміцину 8% стійкі та 8% помірно стійкі до еритроміцину штами решта всі виділені 84,0% чутливі.

До тетрацикліну чутливі 80,0%, помірно стійкі 12%, стійкі 8,0% з досліджених 25 штамів. З 25 перевіраних на чутливість штамів до доксицикліну 4% помірно стійкі 4% резистентні і 92% чутливі ізоляти.

84% культур чутливі та 16% проявляли свою стійкість з 25 досліджених до лінкоміцину штамів. 4% помірно стійких штамів до кліндаміцину решта 97,0% з 25 досліджених були чутливі.

До норфлуксацину чутливі 4% та помірно стійкі 4% 92% штамів резистентні. До ципрофлуксацину стійкі 80% культур 20% чутливі. До офлуксацину чутливі 28% стійкі 72% ізолятів. До пефлуксацину резистентні 48% помірно резистентні 24% чутливі 28% культур. До ломефлуксацину чутливими були 16% помірно стійкими 8% резистентними 76% ізолятів. До левофлуксацину чутливі 8% культур решта 92% стійкі. До спарфлуксацину чутливими були 44,0% штамів стійкими 54,0%. До гатіфлуксацину чутливі 24% помірно стійкі 8% резистентні 68% культур. До хлорамфеніколу помірно стійкими були 8% культури решта 92% чутливі.

Таблиця 3.5

**Зони затримки росту культур стафілококів від свиней з господарства
№2**

Назва антибіотика	Інтерпретація за EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Значення зон затримки росту									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Бензилпеніцилін	26>s; 26<r	28	25	24	29	26	25	24	28	20	15
Оксацилін	13>s; 10<r 18>s; 17<r	17	12	15	17	14	15	12	17	10	10
Еритроміцин	21>s; 18<r	17	19	22	15	16	14	17	14	16	15
Тетрациклін	22>s; 19<r	18	17	18	16	18	23	16	15	18	18
Кліндаміцин	22>s; 19<r	11	15	12	14	16	17	15	14	13	11
Норфлуксацин	20>s; 20<r 24>s; 24<r	24	20	22	25	20	19	18	24	19	17
Хлорамфенікол	18>s; 18<r	15	17	18	18	19	22	15	12	17	16

Примітка. 15>s; 15<r більше 15 штам чутливий, менше 15 штам стійкий; 6 - мінімальний розмір диску з антибіотиками штам резистентний; * - наявність росту окремих колоній у зоні інгібіції росту, штам резистентний.

З 10 виділених культур від свиней з свиногомплексу №2 10 були резистентними до оксациліну, кліндаміцину. До бензилпеніциліну, норфлуксацину 3 штами були чутливі та 7 стійкими. До тетрацикліну та еритроміцину 1 штама чутливий 9 штамів резистентні. До хлорамфеніколу 4 культури були чутливі, 6 стійкими (табл.3.5).

Існує різниця між кількістю антибіотикостійких коагулазопозитивних та коагулазонегативних *Staphylococcus spp* виділених від свиней господарства №1. Серед коагулазопозитивних стафілококів до пеніцилінового ряду чутливими та помірно стійкими були 46,1% та 1,5% відповідно. Резистентними були 52,4% штамів.

Серед коагулазонегативних культур *Staphylococcus spp.* чутливими до пеніцилінів були 52,1% стійкими 47,9%.

До аміноглікозидів чутливими були 96,4%, резистентними 3,6% виділених культур, а коагулазонегативні штами проявляли свою чутливість у 70,0% та стійкість 30,0% випадків. До макролідів серед коагулазопозитивних штамів чутливими були 87,8% помірно стійкими 6,1% стійкими 6,1% тоді як коагулазонегативні культури були чутливі у 84,0% помірно стійкі 8,0% та резистентні у 8,0% випадків.

До тетрациклінів чутливими були 45,7% помірно стійкими 11,4% та резистентними 42,9% коагулазопозитивних штамів а коагулазонегативні проявляли чутливість у 86,0% помірну стійкість 8,0% та резистентність стійкі у 6,0% випадків. До лінкозамідів чутливими були 43,2% стійкими 56,8% коагулазопозитивних, коагулазонегативні культури чутливі 90,0% резистентними були 10% культур. До фторхінолонів чутливими були 4,6% помірно резистентними 6,0% стійкими 89,4% виділених *Staphylococcus spp.* Серед коагулазонегативних фторхінолінів чутливі 21,5%, помірно резистентні 10,5 % стійкі 78% культур.

Серед коагулазонегативних *Staphylococcus spp* до хлорамфеніколу чутливі 96,0% помірно резистентні 4,0%. Обидві групи повної резистентності до хлорамфеніколу не проявляли.

3.3.3. Дослідження стійкості до протимікробних засобів у штамів стафілококів, виділених від тварин-компаньйонів

Відбувається активна колонізація MRS і MRSA дрібних домашніх тварин (собак, котів) [124, 214]. Що в свою чергу спричинено тісними контактами між собаками, кішками і людиною і призвело до передачі MRS і MRSA між ними. Цьому сприяють тісні постійні контакти між людиною і домашнім улюбленцем. Діаметри інгібіції росту культур наведені у додатку Е.

Так згідно отриманих нами результатів серед штамів виділених від котів резистентними до бензилпеніциліну були 28,5% від собак 54,5%. До Ампіциліну резистентними були 28,5% штамів від котів та 27,2% виділених від собак стафілококів. До Оксациліну були резистентні 28,5% виділені від котів та 45,4,% штамів виділених від собак культур.

Виділені від котів резистентними до Норфлораксацину та Ципрофлораксацину були 14,2% штамів стафілококів. Також стійкими до Норфлораксацину та Ципрофлораксацину були 27,2% виділених від собак культур стафілококів. До Левофлораксацину свою стійкість проявляли 7,1% штамів виділених від котів та 27,2% штамів ізольованих від собак. До Гентаміцину та Тобраміцину резистентних штамів стафілококів було виділено від котів 21,4% та 27,2% від собак. До Еритроміцину резистентні були 42,8% ізольованих від котів та 27,2% виділених від собак штамів стафілококів. Виділені від котів до Тетрацикліну свою резистентність проявляли 28,5% штамів стафілококів. Одночасно 27,2% штамів виділених стафілококів від собак були резистентними та 9,0% помірно резистентними до Тетрацикліну. До Доксидикліну проявляли свою помірну стійкість 14,2% штамів виділених від котів. Резистентними до Доксидикліну було 18,1% стафілококів виділених від собак.

До хлорамфеніколу стійкими були 14,2% виділених штамів від котів та 36,3% штамів виділених від собак стафілококів. Резистентність до

фузидієвої кислоти проявляли 21,4% виділених від котів та 36,3% виділених від собак культур стафілококів.

Виділені штами від котів і собак володіли множинною резистентністю до двох і більше груп антибіотиків. Так виділено від котів коагулазонегативний штам «17» який був резистентним до 10 з 13 досліджуваних антибіотиків окрім левофлоксацину, фузидієвої кислоти та був помірно резистентним до доксициліну. Також від котів виділено резистентний до 9 з 13 досліджуваних антибіотиків окрім хлорамфеніколу та групи фторхінолонів штам «30». 35,7% виділених від котів штамів були чутливими до всіх досліджуваних груп антибіотиків. Два виділені від собак коагулазопозитивні штами проявляли різну резистентність. Так штам «19» був чутливий до бензилпеніциліну, ампіциліну, оксациліну еритроміцину та водночас резистентний до 9 інших антибіотиків. Інший коагулазопозитивний штам «33» був резистентний до бензилпеніциліну, гентаміцину, тобраміцину та фузидієвої кислоти і водночас чутливий до решти 9 антибіотиків. Серед коагулазонегативних штамів виділених від собак один штам «38» був резистентний до 12 досліджуваних антибіотиків окрім доксицикліну. Виділено також один штам «25» резистентний до групи пеніцилінів та еритроміцину і два штами «23» «36» резистентні до групи пеніцилінів. Чутливих до всіх груп досліджених антибіотиків було 27,2% штамів стафілококів.

3.3.4. Дослідження чутливості до антибактеріальних препаратів у культур стафілококів, одержаних від людей

Діаметри інгібіції росту культур наведені у додатку Є.

Під час дослідження стафілококів виділених від людей встановлено, що до бензилпеніциліну стійкими були 72,7% (8 з 11) коагулазопозитивних та 8 (100,0%) коагулазонегативних стафілококів. До оксациліну стійкими були 1 (9,0%) коагулазопозитивний та 3 (37,5%) коагулазонегативних стафілококи. До ампіциліну свою стійкість проявляли 3 (27,2%)

коагулазопозитивних і 5 (62,5%) коагулазонегативних стафілококів. До норфлуксацину стійкими були 5 (62,5%) коагулазонегативних стафілококів. До ципрофлоксацину стійкість проявляли 4 (50,0%) коагулазонегативних стафілококів. До гентаміцину резистентними були 2 коагулазопозитивні та 5 (62,5%) коагулазонегативних стафілококів. До тобраміцину свою стійкість проявляли 2 (18,1%) коагулазопозитивних та 3 (37,5%) коагулазонегативних стафілококів. До еритроміцину стійкими були 3 (27,2%) коагулазопозитивні стафілококи. До Лінкоміцину свою стійкість проявляли 1 (5,2%) коагулазопозитивний та 2 (25,0%) коагулазонегативних стафілококи.

До тетрацикліну та доксицикліну резистентними були 1 (5,2%) коагулазопозитивний та 3 (37,5%) коагулазонегативних штами. Свою стійкість до хлорамфеніколу проявляв 1 (12,5%) коагулазонегативний стафілокок. До фузидієвої кислоти стійкими були 3 (27,2%) коагулазопозитивні та 3 (37,5%) коагулазонегативні штами стафілококів. Всі штами стафілококів виділених від людей були чутливими до ванкоміцину.

Коагулазопозитивний штам «2» проявляв одночасну стійкість до антибіотиків групи пеніцилінів, макролідів та фузидієвої кислоти. Коагулазонегативні стафілококи «14» «19» були резистентними до 12 досліджуваних антибіотиків окрім ванкоміцину та хлорамфеніколу, а штам «17» був резистентними до 11 досліджуваних антибіотиків окрім доксицикліну, ванкоміцину та хлорамфеніколу.

Отримані дані свідчать про високий рівень стійкості даних стафілококів до досліджуваних антимікробних речовин.

3.4. Вивчення здатності до біоплівкоутворення у *Staphylococcus spp.* виділених з різних об'єктів

Важливою властивістю мікроорганізмів є здатність до формування біоплівки, спроможності до біоплівкоутворення пов'язують з рівнем вірулентності бактерій. За даними низки авторів, здатністю до утворення біоплівок володіють стафілококи виділені з різних джерел: продуктів

харчування [54], молочної залози тварин і молока[71,131], молокопроводів і обладнання на молокопереробних підприємствах [106], від свиней [50], від тварин-компаньонів [198], від пацієнтів лікарських стаціонарів[160], тощо. Спроможність до утворення біоплівки притаманна як коагулазопозитивним (патогенним) так і коагулазонегативним (сапрофітним) популяціям стафілококів.

Для проведення дослідження здатності стафілококів формувати біоплівку було відібрано по декілька представників кожної групи.

Щільність утвореної біоплівки визначається шляхом вимірювання рівня адсорбції барвника з етанолом, виміряного в одиницях оптичної густини (ОД) за допомогою спектрофотометра за довжини хвилі 570 нм. У випадку значення оптичної щільності менше 0,1, вважають, що штами не утворюють біоплівки, від 0,1 до 0,49 - здатність утворювати плівку вважають низькою. При значенні оптичної щільності від 0,5 до 1,0 - середня щільність біоплівки та здатність її формувати. При значеннях вище 1,0 - висока здатність утворювати біоплівку та її висока щільність [20].

У табл. 3.6. наведена загальна кількість культур стафілококів з різних груп та їх здатність до формування біоплівки.

Таблиця 3.6

Чисельність стафілококів і % їх здатності до формування біоплівки

Об'єкт	Всього досліджено	Щільність біоплівки			
		Висока щільність	Середня щільність	Низька щільність	Не утворювали
Молоко	35	7 (20,0%)	12 (34,3%)	10 (28,5%)	6 (17,2%)
Свині	10	1 (10,0%)	9 (90%)	0	0
Тварини-компаньйони	25	22 (88,0%)	3 (12,0%)	0	0
Люди	19	13 (68,4%)	6 (31,6%)	0	0

Наведені в таблиці 3.6 данні вказують на те, що бактеріологічними дослідженнями спроможність до утворення біоплівку виявлено в усіх культур підданих дослідженню. Необхідно відзначити, що серед досліджених 88,7% досліджених культур утворювали біоплівку високої (48,3%) і середньої (33,5%) та низької (20,2%) щільності.

У таблиці 3.7 наведено результати визначення оптичної густини біоплівок, що утворювали культури стафілококів виділених з молока.

Таблиця 3.7

Значення оптичної густини біоплівок при 570 нм та здатність до формування біоплівки у штамів стафілококів отриманих з молока ($M \pm m$, $n = 3$)

№ з/п	№ культури	Значення оптичної густини біоплівок	Щільність біоплівки
1	2	3	4
1	101	0,015 \pm 0,001	Неутворювали
2	103	0,021 \pm 0,001	Неутворювали
3	104	0,321 \pm 0,015	Низька
4	106	1,552 \pm 0,084	Висока
5	107	0,156 \pm 0,009	Низька
6	108	0,228 \pm 0,013	Низька
7	110	0,051 \pm 0,002	Неутворювали
8	111	0,178 \pm 0,009	Низька
9	112	0,409 \pm 0,021	Середня
10	113	0,313 \pm 0,018	Середня
11	114	0,216 \pm 0,012	Низька
12	115	0,018 \pm 0,001	Неутворювали
13	116	0,056 \pm 0,004	Неутворювали
14	117	0,177 \pm 0,008	Низька

Продовження таблиці 3.7

15	118	0,813 \pm 0,050	Середня
16	119	0,697 \pm 0,044	Середня
17	120	0,859 \pm 0,052	Середня
18	121	1,573 \pm 0,078	Висока
19	122	0,762 \pm 0,047	Середня
20	123	1,293 \pm 0,072	Висока
21	124	0,801 \pm 0,051	Середня
22	125	0,065 \pm 0,005	Неутворювали
23	127	0,226 \pm 0,012	Низька
24	128	0,246 \pm 0,014	Низька
25	129	0,074 \pm 0,006	Неутворювали
26	130	0,368 \pm 0,017	Низька
27	131	0,872 \pm 0,049	Середня
28	132	1,698 \pm 0,086	Висока
29	133	1,464 \pm 0,077	Висока
30	134	0,746 \pm 0,033	Середня
31	135	0,618 \pm 0,031	Середня
32	136	1,533 \pm 0,075	Висока
33	137	0,863 \pm 0,035	Середня
34	138	0,623 \pm 0,030	Середня
35	139	1,985 \pm 0,082	Висока

Результати вимірів оптичної щільності показують що стафілококи виділені з молока утворювали біоплівку високої (20,0%), середньої (34,3%) та низької (28,5%) щільності. Водночас (17,2%) не утворювали біоплівки взагалі.

У таблиці 3.8. наведено результати визначення оптичної густини біоплівок, що утворювали культури стафілококів виділених від свиней.

Таблиця 3.8

**Оптична густина біоплівки при 570 нм та щільність біоплівки у штамів
ізолюваних від свиней ($M \pm m$, $n = 3$)**

№ культури	Значення оптичної густини біоплівки	Щільність біоплівки
1	0,787 \pm 0,038	Середня
2	0,626 \pm 0,035	Середня
3	0,887 \pm 0,040	Середня
4	0,605 \pm 0,033	Середня
5	0,890 \pm 0,041	Середня
6	0,596 \pm 0,028	Середня
7	0,644 \pm 0,036	Середня
8	0,773 \pm 0,040	Середня
9	0,626 \pm 0,034	Середня
10	1,123 \pm 0,065	Висока

У 100% випадків стафілококи виділені від свиней виявили спроможність до біоплівкоутворення. Зокрема біоплівку високої щільності утворювали 10%, а 90% стафілококів утворювали біоплівку середньої щільності.

Серед 9 культур стафілококів виділених від свиней, які утворювали **біоплівки середньої** щільності (0,596 - 0,890), п'ять досліджених культур утворювали біоплівку з оптичною густиною 0,644 - 0,890, тобто за показником щільності знаходяться ближче до показників високої щільності. Цей факт може вказувати те, що серед свиней можуть циркулювати штами стафілококів з високим потенціалом патогенності.

У таблиці 3.9. наведено результати визначення оптичної густини біоплівки, що утворювали культури стафілококів виділених від котів-пацієнтів ветеринарної клініки.

Таблиця 3.9.

Значення оптичної густини біоплівки при 570 нм та здатність до формування біоплівки у штамів стафілококів виділених від котів ($M \pm m, n = 3$)

№ з/п	№ штаму	Значення оптичної густини	Здатність штамів формувати біоплівку
1	17	$3,184 \pm 0,095$	Висока
2	18	$0,909 \pm 0,030$	Середня
3	20	$1,651 \pm 0,060$	Висока
4	22	$1,243 \pm 0,037$	Висока
5	26	$0,908 \pm 0,033$	Середня
6	27	$1,912 \pm 0,080$	Висока
7	28	$0,918 \pm 0,044$	Середня
8	29	$1,721 \pm 0,076$	Висока
9	30	$1,874 \pm 0,075$	Висока
10	31	$1,415 \pm 0,053$	Висока
11	37	$1,319 \pm 0,041$	Висока
12	40	$2,824 \pm 0,096$	Висока
13	41	$1,111 \pm 0,052$	Висока
14	46	$4,721 \pm 0,132$	Висока

Серед культур виділених від котів, що утворювали біоплівки високої щільності, 63,6% культур утворювали біоплівки з оптичною густиною 1,651-4,721, тобто з високим потенціалом патогенності.

У таблиці 3.10 наведено результати визначення оптичної густини біоплівки, що утворювали культури стафілококів виділених від собак-пацієнтів ветеринарної клініки.

Таблиця 3.10

Оптична щільність біоплівки при 570 нм та здатність до формування біоплівки у штамів стафілококів виділених від собак ($M \pm m$, $n = 3$)

№ з/п	№ штаму	Значення оптичної густини	Здатність штамів формувати біоплівку
1	19	$4,744 \pm 0,188$	Висока
2	21	$3,440 \pm 0,134$	Висока
3	23	$1,896 \pm 0,065$	Висока
4	25	$2,138 \pm 0,088$	Висока
5	33	$2,483 \pm 0,092$	Висока
6	35	$3,221 \pm 0,125$	Висока
7	36	$2,981 \pm 0,106$	Висока
8	38	$1,945 \pm 0,081$	Висока
9	39	$1,719 \pm 0,077$	Висока
10	42	$2,234 \pm 0,111$	Висока
11	43	$1,805 \pm 0,080$	Висока

Стафілококи виділені від тварин компаньйонів здатність утворювати біоплівку високої щільності проявляли 88% досліджених штамів, решта 12% - формували біоплівки середньої щільності

Одержані дані свідчать про те, що 63,6% культур, виділених від собак, утворювали біоплівку з високою оптичною густиною 2,138-4,744. Тобто, серед тварин компаньйонів циркулюють штами стафілококів з високим потенціалом патогенності, потенційно небезпечні для людини.

У таблиці 3.11 наведено результати визначення оптичної густини біоплівок, що утворювали культури стафілококів виділених від людей.

Таблиця 3.11

Оптична густина біоплівки при 570 нм та здатність до формування біоплівки у штамів стафілококів виділених від людей ($M \pm m$, $n = 3$)

№ штаму	Значення оптичної густини	Здатність штамів формувати біоплівку
1	$1,181 \pm 0,049$	Висока
2	$0,614 \pm 0,034$	Середня
3	$1,516 \pm 0,053$	Висока
4	$1,342 \pm 0,050$	Висока
5	$0,809 \pm 0,045$	Середня
6	$1,123 \pm 0,048$	Висока
7	$0,891 \pm 0,036$	Середня
8	$1,127 \pm 0,047$	Висока
9	$1,478 \pm 0,050$	Висока
10	$1,154 \pm 0,035$	Висока
11	$1,913 \pm 0,075$	Висока
12	$1,248 \pm 0,043$	Висока
13	$1,210 \pm 0,042$	Висока
14	$1,127 \pm 0,037$	Висока
15	$1,372 \pm 0,055$	Висока
16	$1,546 \pm 0,061$	Висока
17	$0,695 \pm 0,033$	Середня
18	$0,371 \pm 0,018$	Середня
19	$0,214 \pm 0,012$	Середня

Дані таблиці 3.11 вказують, що серед групи штамів виділених від людей біоплівки високої щільності були спроможні утворювати 68,4%, а біоплівки середньої щільності - 31,6%.

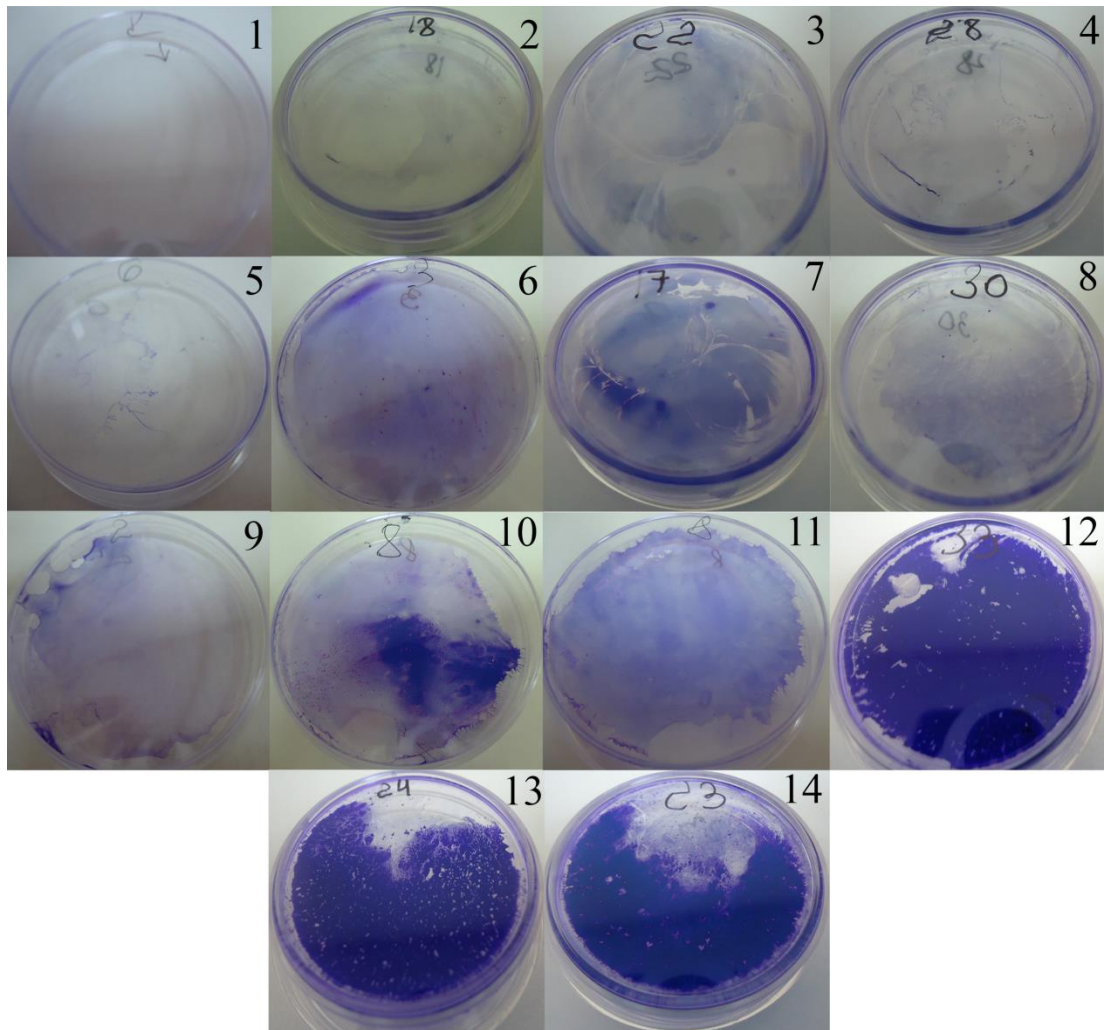


Рис. 3.10. Щільність сформованих біоплівок. 1 - контроль, 2, 4, 5 - біоплівка не формувалась, 3,8,9 - біоплівка слабкої щільності, 6, 7, 10, 11 - біоплівка середньої щільності, 12, 13, 14 - біоплівка високої щільності.

Аналіз одержаних результатів дослідження фенотипового (тобто за використанням бактеріологічного способу визначення) прояву біоплівкоутворення можна зробити висновок, що виділені і досліджені стафілококи з різних об'єктів володіють різними рівнями щільності формування біоплівки. В даному випадку найбільшим відсотком здатності до формування щільної біоплівки володіють стафілококи виділені від свиней, тварин-компаньйонів та від людей.

3.5. Молекулярно-генетичні дослідження бактерій роду *Staphylococcus* виділених з різних об'єктів

Для молекулярно-генетичних досліджень відбирали культури у яких було виявлено ознаки стійкості до антибіотиків і біоплівкоутворення бактеріологічним методом.

З усіх виділених нами стафілококів для молекулярно-генетичних досліджень враховуючи їх фенотипові властивості було відібрано 89 культур.

Досліджено за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції 89 культур стафілококів. Кількість стафілококів досліджених на наявність дослідних генів виділених з різних об'єктів (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Кількість стафілококів досліджених на наявність дослідних генів виділених з різних об'єктів

Об'єкт	Всього штамів	Кількість досліджених штамів за типами генів				
		<i>mec A</i>	<i>fem B</i>	<i>ica A</i>	<i>ica D</i>	<i>ica AB</i>
Молоко	35	35	35	35	35	33
Свині	10	10	10	10	10	7
Тварини-компаньйони	25	25	25	25	25	23
Люди	19	11	11	11	11	8

3.5.1 Підбір праймерів для виявлення детермінант патогенності – генів, що викликають стійкість до метициліну та утворення біоплівок

З даних спеціальної літератури встановлено, що різні фактори патогенності у стафілококів кодують різні гени. Нами було визначено, праймери, які можливо використовувати для виявлення потенційно патогенних клонів (табл. 3.19). В нашій роботі ми використовували наступні праймери: *mec A*, *fem B*, *ica A*, *ica D*, *ica AB*.

Таблиця 3.13

Характеристики праймерів, які були використані в дослідженні

№	Дослідний ген	Властивості	Джерела
1	<i>tes A</i>	Кодує додатковий пеніцилінзв'язувальний білок(ПЗБ2а), який відповідає за стійкість до метициліну та інших β -лактамних антибіотиків у мікроорганізмів з роду <i>Staphylococcus</i>	[123]
2	<i>fem B</i>	Кодує фермент, який зшиває білки пептидоглікани мікробної стінки у мікроорганізмів з роду <i>Staphylococcus</i> таким чином підвищує стійкість до антибіотиків.	[123]
3	<i>ica A</i>	Кодує утворення біоплівки у стафілококів. Разом з генами <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>icaB</i> та <i>icaC</i> входить до локусу гена <i>ica</i> (intercellular adhesion) (міжклітинної адгезії), <i>IcaA</i> - це N-ацетилглюкозамін трансфераза, яка спільно з <i>IcaD</i> виробляє олігомер N-ацетилглюкозамін	[209]
4	<i>ica D</i>	Кодує утворення біоплівки у стафілококів Разом з генами <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>icaB</i> та <i>icaC</i> входить до локусу гена <i>ica</i> (intercellular adhesion) (міжклітинної адгезії), спільно з <i>IcaA</i> виробляє олігомер N-ацетилглюкозамін	[209]
5	<i>ica AB</i>	Кодує утворення біоплівки у стафілококів. Разом з генами <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>icaB</i> та <i>icaC</i> входить до локусу гена <i>ica</i> (intercellular adhesion) міжклітинної адгезії.	[92]

3.5.2. Результати виявлення генів *tes A* та *fem B* у культур стафілококів за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції

Зокрема у 1 (2,8%) штаму коагулазопозитивного стафілококу виділеного з молока було встановлено одночасну фенотипову стійкість до оксациліну та бензилпеніциліну і виявлено наявність генів *tes A* і *fem B*, що було підтверджено шляхом полімеразно-ланцюгової реакції.

Серед стафілококів виділених від свиней, було виявлено наявність генів *tes A* і *fem B* у 1 (10%) коагулазопозитивного стафілококу. Ген *tes A* також був присутній у одного коагулазонегативного стафілокока виділеного від свиней.

Стафілококи отримані від тварин-компаньйонів, що проявляли фенотипову стійкість до бензилпеніциліну та оксациліну, не містили у собі структурних генів *tes A* та *fem B*.

Під час дослідження стафілококів виділених від людей встановлено, що 3 (15,7%) коагулазонегативні та 1 коагулазопозитивний (5,2%) штами володіли структурним геном *tes A*. Також 1 коагулазопозитивний (5,2%) штама володів одночасно структурними генами *tes A* і *fem B* (5,2%).

На рис 3.8 зображено продукти плр-реакції довжиною 310 п.н., що характеризують наявність гену *tes A* у стафілококів виділених з різних об'єктів: 5 - стафілокок виділений з молока, 10,11- стафілококи виділені від свиней, 13,14,17 - стафілококи виділені від людей.

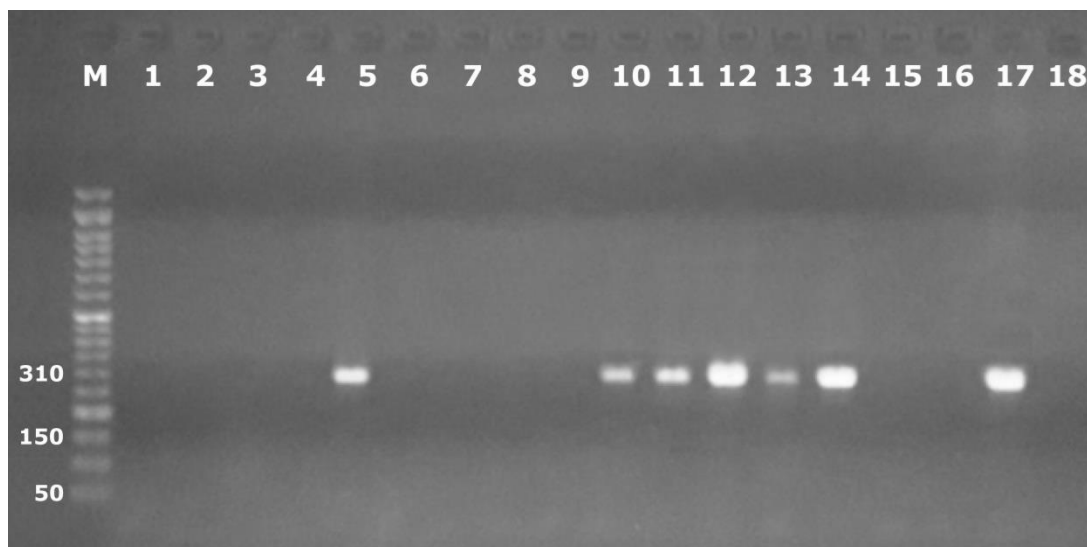


Рис 3.11. Наявність гену *tes A*. у стафілококів виділених з різних об'єктів. М - маркер молекулярних мас, 5 - стафілокок виділений з молока, 10, 11- стафілококи виділені від свиней, 13, 14, 17 - стафілококи виділені від людей, 18 - негативний контроль.

3.5.3. Результати виявлення генів *ica D*, *ica A* та *ica AB* у культур стафілококів за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції

Штами стафілококів виділені з молока утворювали біоплівку високої (20,0%), середньої (34,3%) та низької (28,5%) щільності. Водночас (17,2%) не утворювали біоплівки взагалі.

Гени які зумовлюють утворення біоплівки виявлено у 7 досліджуваних штамів. Зокрема, *ica D* та *ica A* - виявлено одночасно у 2 коагулазопозитивних штамів; також ген *ica D* було виявлено у 3 коагулазонегативних штамів виділених з молока. Ген *ica AB*, що також бере участь у формуванні біоплівок у *S. epidermidis* [92], було виділено у 2 коагулазонегативних штамів.

У 100% випадків стафілококки виділені від свиней проявляли здатність до біоплівкоутворення. Зокрема біоплівку високої щільності утворювали 10%, а 90% стафілококів утворювали біоплівку середньої щільності. В той же час, наявність генів, що відповідають за утворення біоплівки - *ica D* і *ica A* - виявлено лише у 1 (10%) коагулазопозитивного стафілокока.

Стафілококи виділені від тварин-компаньйонів здатність утворювати біоплівку високої щільності проявляли 88% досліджених штамів, решта 12% - формували біоплівки середньої щільності. Ген утворення біоплівки *ica D* виявлено у 3 (12,0%) коагулазонегативних стафілококів, а ген утворення біоплівки *ica A* виділено у 1 (4%) коагулазопозитивного стафілокока.

Серед цієї групи штамів стафілококів виділених від людей біоплівки високої щільності були спроможні утворювати 68,4%, а біоплівки середньої щільності - 31,6%. Одночасно 6 коагулазопозитивних стафілоків містили у своєму складі гени утворення біоплівки *ica D* та *ica A*. Гени *ica D* були в наявності у 2 коагулазопозитивних та 4 (21,0%) коагулазонегативних стафілококів. Ген біоплівкоутворення *ica AB* було виділено у 3 (15,7%) коагулазонегативних штамів стафілококів виділені від людей.

На рис 3.9 зображено продукти плр-реакції довжиною 188 п.н., що характеризують наявність гену *ica A*. у стафілококів виділених з

різних об'єктів: 1, 2 - стафілокок виділений з молока, 3- стафілокок виділений від свиней, 4 - стафілокок виділений від тварин-компаньйонів, 8, 9, 16, 17, 18, стафілокок виділений від людей.

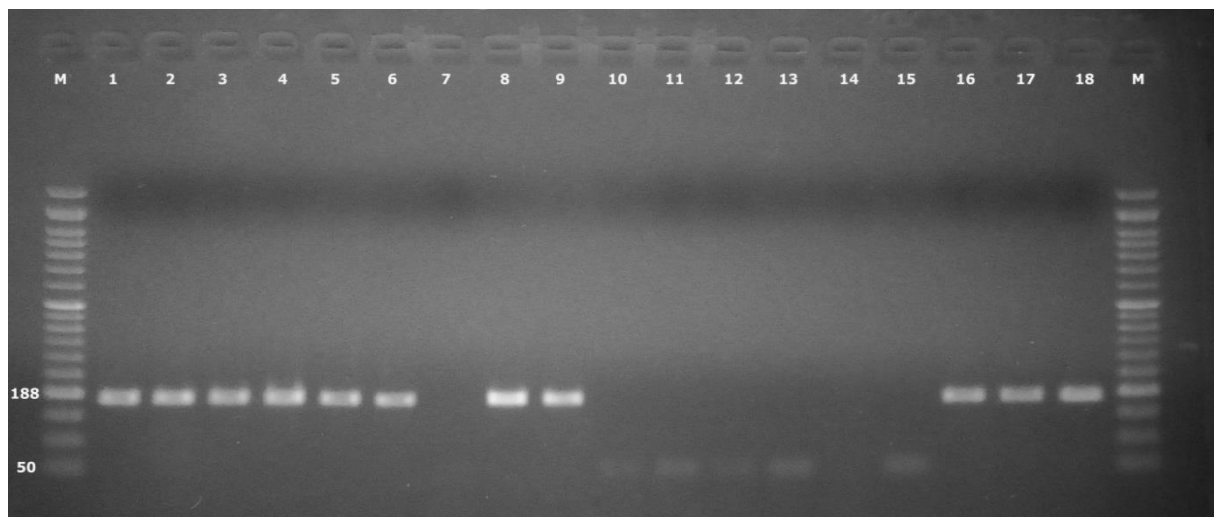


Рис 3.12. Наявність гену *isa A* у стафілококів виділених з різних об'єктів. М - маркер молекулярних мас, 1, 2 - стафілокок виділений з молока, 3- стафілокок виділений від свиней, 4 - стафілокок виділений від тварин-компаньйонів, 5, 6, 8, 9, 16, 17, 18, стафілокок виділений від людей.

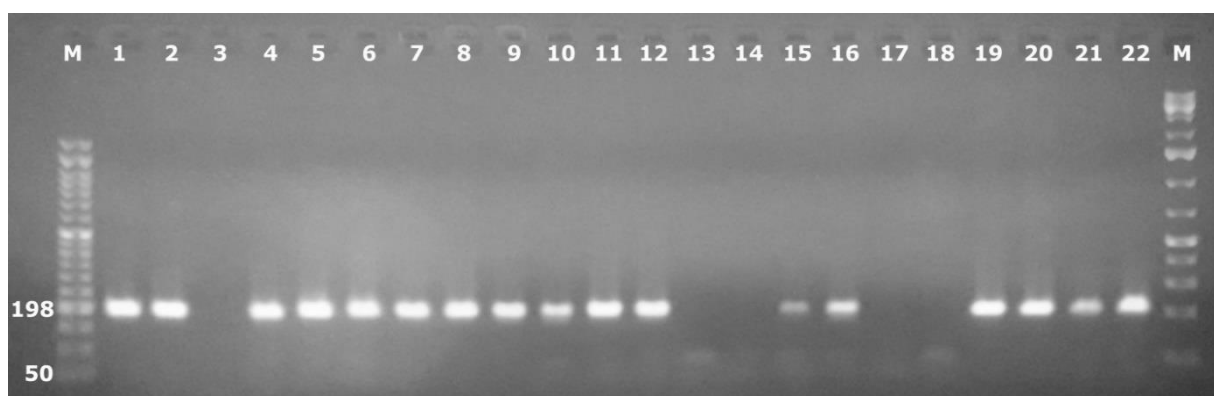


Рис 3.13. Наявність гену *isa D* у стафілококів виділених з різних об'єктів. М - маркер молекулярних мас, 1, 2, 4 - 6 - стафілококи виділені з молока, 7 - стафілокок виділений від свиней, 8 - 10 - стафілококи виділені від тварин-компаньйонів, 11, 12, 15, 16, 19 - 22 - стафілококи виділені від людей.

На рис 3.10 зображено продукти плр-реакції довжиною 198 п.н., що характеризують наявність гену *ica D* у стафілококів виділених з різних об'єктів: 1, 2, 4 - 6 - стафілококи виділені з молока, 7 - стафілокок виділений від свиней, 8 - 10 - стафілококи виділені від тварин-компаньйонів, 11, 12, 15, 16, 19 - 22 - стафілококи виділені від людей.

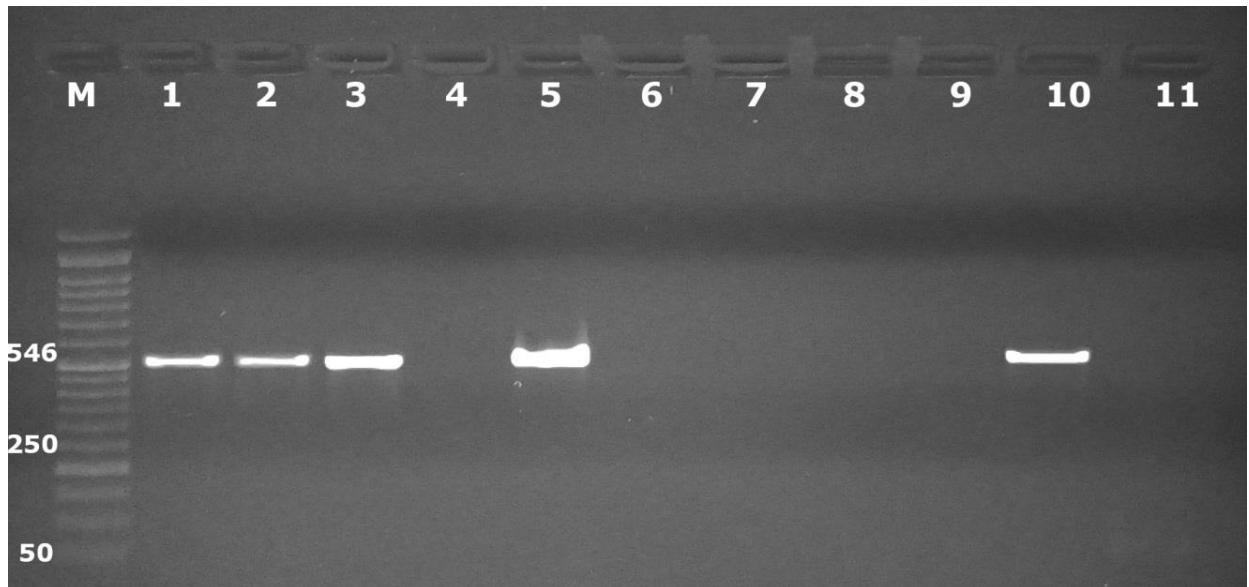


Рис 3.14. Наявність гену *ica AB* у стафілококів виділених з різних об'єктів. М - маркер молекулярних мас, 1, 2 - стафілококи виділені з молока, 3, 5, 10 - стафілококи виділені від людей. На рис 3.11 зображено продукти плр-реакції довжиною 546 п.н., що характеризують наявність гену *ica AB* у стафілококів виділених з різних об'єктів: 1, 2 - стафілококи виділені з молока, 3, 5, 10 - стафілококи виділені від людей.

Отримані нами результати свідчать про різну кількість наявності дослідних генів серед різних стафілококів виділених з досліджуваних об'єктів. Найбільшою наявністю дослідних генів володіли стафілококи виділені від людей потім стафілококи виділені від корів і тварин компаньйонів.

3.6. Дослідження ефективності культуральних середовищ для відновлення ліофілізованих стафілококів та накопичення їх біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів

З метою зберігання активності штамів мікроорганізмів застосовують кілька основних способів: ліофілізацію, кріоконсервування, заморожування при -70°C вирощених на агаризованих середовищах бактеріальних культур, періодичні пересіви на поживних середовищах, культивування у відповідних біологічних системах (курячі ембріони, культура клітин, тощо) [2, 5, 12, 24, 31].

На сьогодні найбільш доцільним способом довготривалого зберігання більшості штамів мікроорганізмів у колекціях є їх ліофілізація [5, 30].

Для кріоконсервації і подальшого сублімаційного висушування рекомендовано використовувати клітини в стаціонарній фазі росту, коли досягається найбільший рівень накопичення бактерій, знижується інтенсивність обмінних процесів, спостерігається підвищення стійкості клітин до заморожування і висушування [28, 30].

Важливе значення для ефективної ліофілізації має вибір захисного суспензійного середовища. З цією метою застосовують колоїдні розчини. До компонентів суспензійних захисних середовищ, як правило, вводять речовини, які знижують точку кристалізації води; це подовжує термін охолодження клітин і створює умови для мінімізації негативної дії кристалів льоду, а також певним чином забезпечує захисну дію при сублімаційному висушуванні [11, 13, 14, 18, 29]. Для бактерій кріоконсервація і подальше сублімаційне висушування під вакуумом є стресовими факторами, що діють на клітину через підвищення осмотичного тиску, температурний шок, зміну внутрішньоклітинного рН, високу концентрацію солей. Вони призводять до накопичення нелетальних та летальних пошкоджень структур (клітин) біологічного об'єкта [2, 5, 11, 12, 30].

Нелетальні пошкодження та викликані ними зміни у властивостях бактеріальних культур, як правило, зворотні та відновлюються до норми при відповідних умовах і при застосуванні певних способів. Швидкість та якість відновлення біологічних властивостей ліофілізованих бактеріальних культур багато залежить від якості культуральних середовищ, що використовують з цією метою. Деякі автори рекомендують до компонентів культуральних середовищ, призначених для культивування та відновлення певних видів мікроорганізмів додавати специфічні компоненти [18, 30].

Таблиця 3.14

Досліджувані показники культур *S. aureus* (матрова розплідка)

Показник, що визначався, (n=5)	<i>S. aureus</i>
Концентрація життєздатних бактерій бульонних культур (МПБ), КУО/см ³	6,6×10 ⁹
Концентрація життєздатних клітин (бульйонна культура + захисне середовище, 1:1), КУО/см ³ ,	3,3×10 ⁹
Типовість росту на твердих поживних середовищах	Типові для виду
Однорідність популяції мікроорганізмів	Однорідні грам-позитивні коки, розміром 1,0-1х1,5-2,0 мкм
Біохімічні властивості	Типові для виду

Визначають ефективність використаних культуральних середовищ шляхом порівняння біологічних властивостей бактеріальних культур на етапі закладання на тривале зберігання, після ліофілізації культури та після її відновлення на відповідному культуральному середовищі [11, 18].

Досліджувані культури характеризувалися однорідністю популяції та відповідною типовістю морфологічних, культуральних, біохімічних

властивостей. Культура *S. aureus* на середовищі Baird Parker Agar (HiMedia, India) утворювала колонії *S-форми*, діаметром 1-2 мм, чорного кольору, блискучі, оточені зоною просвітлення (лецитиназна активність); коагулювала плазму кроля, ферментувала з утворенням кислоти маніт, глюкозу. Досліджена культура була піддана ліофілізації. В ліофілізованій культурі визначали життєздатність: перевіряли однорідність популяції, типовість росту на твердих поживних середовищах та концентрацію життєздатних клітин. Результати досліджень відображені в табл.3.14. і 3.15.

Таблиця 3.15

Життєздатність ліофілізованих дослідних культур *S. aureus*

Показник, що визначався, (n=5)	<i>S. aureus</i>
Концентрація життєздатних клітин після ліофілізації, КУО/см ³	1,7×10 ⁶
Однорідність популяції мікроорганізмів	Дрібні грам-позитивні коки, овоїди
Типовість росту на твердих поживних середовищах	Типові для виду

Було встановлено, що піддані ліофілізації культури мали змінену морфологію: в мазках з регідратованих ліофілізатів культур *S. aureus* - дрібні грам-позитивні коки, овоїди. На твердих поживних середовищах після відповідного терміну інкубації регідратовані культури утворювали типові для відповідних видів мікроорганізмів колонії. Реєстрували істотне зниження концентрації життєздатних мікробних клітин у культур після ліофілізації. Так концентрація життєздатних мікробних у клітин ліофілізованої культури *S. aureus* становила 1,7×10⁶ КУО/см³, що становить 0,05 % відповідно від вихідного рівня.

Регідратовані культури були інокульовані у відповідні культуральні середовища (табл. 3.15). Після 24 год. інкубації у досліджуваних культур

визначали однорідність популяції мікроорганізмів, концентрацію життєздатних клітин. З добових бульйонних культур робили висіви на відповідні тверді поживні середовища. Після відповідного терміну інкубації визначали типовість росту інокульованих культур. Досліджувані популяції культур мали однорідну морфологію клітин, під час інкубації на твердих поживних середовищах утворювали типові для видів колонії. Результати визначення концентрації життєздатних клітин у популяціях мікроорганізмів на різних культуральних середовищах відображені у табл. 3.16.

Таблиця 3.16

Концентрація життєздатних клітин у відновлених культур

Культуральне середовище	Концентрація життєздатних клітин, КУО/см ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	
МПБ з додаванням 5 % сироватки крові коня та 0,5 % глюкози	$2,3 \times 10^9$
МПБ з додаванням 5% сироватки крові ВРХ та 0,5 % глюкози	$2,0 \times 10^9$
СМБ	$6,4 \times 10^9$
ТСБ	$4,1 \times 10^9$

Отримані результати вказують на те, що за однократного пересіву на різних культуральних середовищах було отримано біомаси досліджуваних культур у вихідному титрі $x \times 10^9$. Найбільш високу продуктивність у відновлених культур було отримано за застосування Серцево-мозкового бульйону VHI Broth, (HiMedia, India) (концентрацію живих мікробних клітин у дослідних культур реєстрували $6,4 \times 10^9$ КУО/см³). Продуктивність культури *Staphylococcus aureus* за застосування МПБ з 5 % сироватки крові коня та 0,5

% глюкози, МПБ з 5% сироватки крові ВРХ та 0,5 % глюкози, ТСБ була нижчою на 64 %, 69 % та 36 % відповідно.

1. Встановлено, що в процесі сублімації та кріоконсервації культур *Staphylococcus aureus* втрати життєздатних мікробних клітин становили 99,98%.
2. Концентрацію життєздатних мікробних клітин в ліофілізованих культур *Staphylococcus aureus* реєстрували $1,7 \times 10^6$ КУО/см³.
3. За однократного пасажування на різних культуральних середовищах було отримано біомаси досліджуваних культур у вихідному титрі $x \times 10^9$.
4. Найбільш високу продуктивність у відновлених культур було отримано за застосування Серцево-мозкового бульйону ВНІ Broth виробництва компанії (HiMedia, India) (концентрацію живих мікробних клітин у дослідних культур реєстрували $6,4 \times 10^9$ КУО/см³).

3.7. Депонування штаму *Staphylococcus aureus* St-2017/1 у Національному центрі штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ, підготовка матеріалів для подачі заявки на патент на корисну модель (на штам, виділений і вивчений в результаті виконаних досліджень)

Для здійснення депонування необхідно було пройти комісійну перевірку паспортних даних штаму *Staphylococcus aureus* St-2017/1 за такими показниками: культурально-морфологічні, антибіотико-резистентність, а також відсутність контамінації сторонньою бактеріальною і грибною мікрофлорою. Цей штам депонувався з метою його використання як перспективної тест-культури при визначенні антибіотикорезистентності мікроорганізмів (Додаток Ж).

Завданням винаходу, що заявлявся є новий штам *Staphylococcus aureus* St-2017/1 який має однорідний склад популяції та володіє набутою резистентністю до природних пеніцилінів (бензилпеніциліну) хінолонів

(норфлорсацину, спарфлорсацину), помірно резистентний до макролідів (еритроміцину), лінкозамідів (кліндаміцину).

Штам *Staphylococcus aureus* St-2017/1 виділений зі змивів з носових ходів свиноматки з приватного господарства Київської області. Ідентифікований нами штам у науково-дослідному відділі мікробіологічних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Штам *Staphylococcus aureus* St-2017/1 для використання у ветеринарній біотехнології та мікробіології характеризується наступними ознаками та властивостями.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму:

Морфологічні властивості: грам позитивні коки розміром 0,5-1,5 мкм, не утворюють спор і капсул нерухомі. В мазках розташовані у вигляді виноградного грона.

Культуральні властивості: факультативні анаероби; на м'ясопептонному бульйоні 18-24-годинні культури утворюють рівномірну каламуть з невеликою кількістю білого аморфного осаду, що легко розбивався при струшуванні; на м'ясопептонному агарі 18-24-годинні культури утворюють колонії S-форми, округлі, випуклі, з рівним чітким краєм, 1-1,5–2,5 мм в діаметрі, непрозорі, білі або кремові, іноді від жовтого до оранжевого кольору. МПА – жовто-білі випуклі колонії; ЖСА – жовто-білі колонії, оточені райдужною оболонкою; На агарі Беард-Паркера чорні чи сірі блискучі і випуклі оточені райдужною оболонкою; Вісмут-сульфіт агар - ріст відсутній; Ендо – ріст відсутній;

Біохімічні властивості: коагулює плазму, гемоліз. Ферментує з утворенням кислоти глюкозу, маніт, мальтозу, сахарозу, трегалозу, лактозу, галактозу, фруктозу; не ферментує ксилону, арабінозу, целобіозу, рафінозу.

Чутливість до антибіотиків: резистентний до природних пеніцилінів (бензилпеніциліну), хінолінів I-IV поколінь (норфлорсацину,

спарфлоксацину). Помірно резистентний до макролідів (еритроміцину), лінкозамідів (кліндаміцину).

Штам зберігається в ліофільному стані та на скошеному м'ясо-пептонному агарі в колекції біологічного матеріалу Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України. Номер депозиту в ДНКІБШМ 767(Додаток 3).

В результаті депонування та отримання заявки про винахід на корисну модель нами було прийнято рішення про розробку нормативних документів для реєстрації «Набору діагностичного «STAPHYLOCOCCUS AUREUS-ПЛР», для виявлення здатності до утворення біоплівки та стійкості до метициліну бактерій виду *Staphylococcus aureus* методом полімеразної ланцюгової реакції» (2020 р.), та розробку методичних рекомендацій «Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів».

3.8. Розробка нормативних документів для реєстрації «Набору діагностичного «STAPHYLOCOCCUS AUREUS-ПЛР», для виявлення здатності до утворення біоплівки та стійкості до метициліну бактерій виду *Staphylococcus aureus* методом полімеразної ланцюгової реакції» (2020 р.), та методичних рекомендацій «Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів»

В межах запланованих досліджень було проведено аналіз вимог до складання пакетів нормативних документів, які подаються до регуляторних органів з метою реєстрації засобів діагностики для використання у ветеринарній медицині.

На підставі одержаних аналітичних даних було підготовано реєстраційне досьє для реєстрації «Набір діагностичний *Staphylococcus aureus*-Плр», для виявлення здатності до утворення біоплівки та стійкості до

метициліну бактерій виду *Staphylococcus aureus* методом полімеразної ланцюгової реакції»»

За допомогою цього набору можливо визначати у стафілококів, виділених з різних об'єктів ветеринарно-санітарного нагляду наступні гени, що детермінують біоплівкоутворення і стійкість до метициліну, тобто актуальні фактори патогенності стафілококів.

Реєстраційні матеріали складаються з наступних структурних компонентів (Додаток І).

Частина І. Загальна характеристика.

Розділ А. Адміністративні дані.

Розділ В. Коротка характеристика ВІП, Листівка – вкладка (настанова по застосуванню), Вторинне пакування та маркування, Первинне пакування та маркування.

Розділ С. Експертні висновки, Акт міжлабораторних випробувань.

Частина ІІ. Аналітичні (фізико-хімічні, біологічні або мікробіологічні) методи дослідження ВІП.

Розділ А. Якісний та кількісний склад.

Розділ В. Виробництво - Інструкція з виготовлення та контролю тест - системи.

Розділ С. Виробництво і контроль вхідних матеріалів.

Розділ D. Спеціальні заходи щодо запобігання трансмісивній губчастій енцефалопатії.

Розділ Е. Методи дослідження в процесі виробництва.

Розділ F. Методи дослідження кінцевого продукту.

Протоколи досліджень.

Розділ G. Стабільність.

Частина ІІІ. Дослідження нешкідливості.

Розділ А. Лабораторні дослідження.

Розділ В. Польові дослідження.

Розділ С. Екотоксичність.

Частина IV. Дослідження ефективності.

Розділ А. Лабораторні дослідження.

Додаток 1 Коротка характеристика препарату.

Додаток 2 Листівка вкладки (настанова по застосуванню).

Додаток 3 Маркування.

Додаток 4 Технічні умови.

Розробка методичних рекомендацій «Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів»

В попередні роки розроблено способи діагностики з використанням методів ПЛР. Одним із чинників, що стримують запровадження ПЛР діагностиків з метою скринінгу поширення збудників харчових зоонозів є відсутність біологічних стандартів – а саме антигенів відповідних збудників, що призначені для використання в якості позитивних зразків (контролей) при постановці ПЛР. Відсутність позитивного контролю не забезпечує об'єктивної оцінки результатів досліджень.

З цією метою було розроблено методичні рекомендації «Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів».

Методичні рекомендації вміщують в собі окрім загальної інформації методику виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів: загальні принципи методу; підбір штамів мікроорганізмів, що можуть бути використані в якості позитивних та негативних контрольних зразків; накопичення біомаси мікроорганізмів; кріоконсервування та сублімація біологічного матеріалу; виділення ДНК *Staphylococcus* та інших мікроорганізмів для постановки ПЛР у реальному часі а також результати практичної апробації методики.

В рекомендаціях викладено загальні принципи виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів, придатних для використання в ПЛР у якості позитивних контролів.

Зокрема, з метою виготовлення антигенів *Staphylococcus*, керувалися розробленим нами порядком виготовлення антигену, що складається з чотирьох етапів:

1. Підбір штамів що можуть бути використані в якості позитивних та контрольних зразків;
2. Накопичення біомаси бактеріальних культур;
3. Кріоконсервування та сублімація біологічного матеріалу;
4. Виділення ДНК *Staphylococcus*,

Відбір штамів. Штами, що будуть використані в якості позитивних та негативних контрольних зразків повинні мати типові для виду біологічні властивості, відповідно до чинної нормативно технічної документації: ДСТУ ISO 6888-1:2003 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахування коагулазопозитивних стафілококів. Частина 1. Метод з використанням агарового середовища Беард-Паркера (ISO 6888-1:1999, IDT).

Накопичення біомаси бактеріальних культур. Штами *Staphylococcus aureus* – на рідкому середовищі (МПБ, ГРМ-бульйон, бульйон Хотінгера, Серцево-мозковий бульйон, Триптон-соевий бульйон) впродовж 24-48 годин за температури 37 °С. Потім з бульйонної культури готують мазки та фарбують їх за Грамом. Відсутність контамінації вирощених культур сторонньою мікрофлорою визначають шляхом мікроскопії. Після цього культури мікроорганізмів відповідних штамів пересівають на відповідне поживне середовище для накопичення біомаси. Через 18-24 години визначають концентрацію мікроорганізмів та однорідність популяції. В подальшому використовують біомасу відповідних штамів з концентрацією не нижче 1×10^9 КУО/см³.

Кріоконсервування та сублімація біологічного матеріалу. Сублімація біоматеріалу. Культури фасують у скляні флакони об'ємом 5 см³ по 1,0 см³. В кожен флакон вносять бактеріальну суспензію с кріопротекторним середовищем (збагачене захисне середовище Файбіча) у співвідношенні 1:1 в

об'ємі 1,0 см³. Флакони з культурами поміщають у низкотемпературну морозильну камеру з температурним режимом – 70 °С на 24 години.

Сублімаційне висушування проводили в апараті LP-3 фірми TelStar (Іспанія) з глибоким вакуумом 0,17 mB і температурою конденсора 45–50 °С. Після ліофілізації проводили перевірку на відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою мікробіологічними методами; також визначають концентрацію життєздатних мікробних клітин (КУО/см³) у дослідних зразках методом десятикратних розведень. Концентрація живих мікроорганізмів після ліофілізації повинна бути не нижче, ніж 10⁷ КУО/см³. Флакони з ліофілізованими штамами мікроорганізмів зберігають у холодильнику за температурі 2-4 °С.

Екстракція ДНК: 1 мл збагаченого зразку центрифугували при 13,5 тис/об упродовж 2 хв і видаляли супернатант. Додавали по 200 мкл ТЕ-буферу та інкубували у термостаті при температурі 95 °С упродовж 5 хв. Центрифугують при 5,0 тис/об упродовж 2 хв і відбирають по 180–190 мкл супернатанту.

Також дані науково-методичні рекомендації можна використовувати у наукових установах при розробці та впровадженні/випробуванні засобів для виявлення ДНК збудників зоонозів та вищих навчальних закладах при викладанні дисципліни мікробіологія.

Висновки до розділу 3

Результати проведених досліджень вказують на значний відсоток виділення стафілококів з досліджених зразків біологічного матеріалу від свійських тварин та людини.

Стафілококи представлені типовими культурально-морфологічними, ферментативними та біохімічними властивості для бактерій роду *Staphylococcus*. При вивченні біологічних властивості ізолятів *Staphylococcus* виділених з молока хворих на мастит корів (35), від свиней (86), тварин-

компаньйонів (25) та людей (19) встановлено, що 32,7% утворювали фермент коагулазу і 64,8 % мали гемолітичні властивості.

Коагулазопозитивні стафілококи переважали серед ізолятів виділених від свиней (45,3%) і людей (57,9%), а коагулазонегативні – виділені з молока (94,2%) та від тварин-компаньйонів (92,0%); частіше спроможність до гемолізу еритроцитів виявлено у *Staphylococcus* виділених від свиней (71,0%), тварин-компаньйонів (84,0%) та людей (100%).

Встановлено що стійкі до антибіотиків ізоляти *Staphylococcus* доволі поширені в різних екологічних нішах. Так, серед ізолятів виділених з молока стійкими до 2 і більше груп антибіотиків було 34,2%, від свиней - понад 50,0%, тварин-компаньйонів - 32% та людей 21,0% .

Серед досліджених ізолятів стафілококів у 100% виявлено спроможність до утворення біоплівки встановлено, причому частіше біоплівки високої щільності утворювали стафілококи виділені від тварин компаньйонів (88,0%) та від хворих людей (68,4%), спроможність утворення біоплівки низької щільності було зафіксовано у 28,5% ізолятів, виділених з молока.

Встановлено, що незалежно від джерела виділення представники як коагулазопозитивних так і коагулазонегативних стафілококів, є носіями генетичних детермінант патогенності, зокрема генів, носія стійкості до метициліну та інших β -лактамних антибіотиків *tes A* та гену *fem B* що сприяє підвищенню стійкості. та генів утворення біоплівки (*ica A*, *ica D* *ica AB*).

Експериментально обґрунтовано застосування культуральних середовищ серцево-мозковий бульйон та триптон-соєвий бульйон для відновлення ліофілізованих стафілококів та накопичення бактеріальної біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів.

В процесі досліджень виділено штам *Staphylococcus aureus* St-2017/1 що володіє набутою резистентністю до природних пеніцилінів (бензилпеніциліну) хінолонів (норфлуксацину, спарфлуксацину), помірно

резистентний до макролідів (еритроміцину), лінкозамідів (кліндаміцину) та здатністю до утворення біоплівки задепоновано в НЦШМ ДНКІБШМ. Свідомство про первинне депонування штаму мікроорганізму № 767.

Результати досліджень стали науковим підґрунтям для розробки проєкту нормативних документів (реєстраційного досьє) для реєстрації в Україні «Набору діагностичного «STAPHYLOCOCCUS AUREUS-ПЛР», для виявлення здатності до утворення біоплівки та стійкості до метициліну бактерій виду *Staphylococcus aureus* методом полімеразної ланцюгової реакції».

Аналіз одержаних даних дає підстави для проведення комплексних досліджень із застосуванням мікробіологічних та молекулярно-генетичних методів для виявлення циркуляції потенційно небезпечних культур стафілококів та визначення генетичних маркерів патогенності.

Результати досліджень опубліковані у наукових працях [3,4,6,7,8,9,217,218,225,226,227,228,229].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Відповідно до прийнятої ВООЗ-МЕБ стратегії «Єдине здоров'я» («One Health»), увага фахівців, які забезпечують охорону здоров'я населення, повинна зосереджуватися і на вивченні біологічних особливостей потенційних патогенів – збудників зооантропонозів з метою запровадження ефективних заходів попередження захворювань.

Стафілококоз - інфекційна хвороба всіх видів домашніх та деяких диких тварин та людини, що уражує органи дихання, шкіру, статеві органи, молочну залозу, (можлива септицемія,); у птиці з гострим або хронічним перебігом - проявляється у вигляді артриту, синовіту, дерматиту, синуситу, клоациту та запалення сережок.

Головним місцем локалізації стафілококів у організмі хазяїна є шкіра, слизові оболонки й кишечник. Стафілококи входять до складу нормальної мікрофлори тіла тварин і людини, знаходяться з нею в симбіозі, однак, за порушення імунного статусу організму, спричиняють захворювання інших органів та тканин. У довкілля стафілококи потрапляють від хворих тварин і людей та клінічно-здорових носіїв вказаних мікроорганізмів.

При контакті з хворими в окремих осіб може формуватись резидентне стафілококове бактеріоносійство, коли постійним місцем їх проживання стає слизова оболонка носа, звідки вони розповсюджуються з секретами. Таке носійство особливо небезпечне серед медичного персоналу лікарень, оскільки носії можуть стати джерелом внутрішньогоспітальних інфекцій.

У природі стафілококи поширені повсюдно і здатні швидко набувати резистентність до нових протимікробних препаратів (антибіотиків, дезінфектантів) за рахунок здатності адаптуватися до дії несприятливих чинників зовнішнього середовища.

Коагулазопозитивні і коагулазонегативні стафілококи які виділяються від свійських тварин (собаки, коти, кролі, коні, свині, птиця), а також від

диких тварини(миші, щурі, зайці) володіють феноменом полірезистентності до антибіотиків різних груп [60, 72, 75, 77, 227, 229].

Культури стафілококів, резистентні до різних груп антибіотиків володіють здатністю колонізувати слизові оболонки та шкіру багатьох видів диких і домашніх тварин. В результаті чого існує також можливість передачі полірезистентних стафілококів до людини та інших тварин [35, 99, 124, 137, 173]. За даними Kozytska (2019) в Україні тільки за 2017 рік було виявлено 80 ізолятів метицилінрезистентних стафілококів. З них виділених від домашніх тварин – 77,5%, від птиці – 11,3%, від великої рогатої худоби – 6,3%, та від свиней – 5% [129].

Стафілококова інфекція поширене явище серед захворювань людини. Центр по контролю і профілактиці захворювань США (CDC), наводить дані своїх досліджень щодо випадків зареєстрованих стафілококових інфекцій. Так за їхніми даними у США у 2017 році у пацієнтів лікарень було зареєстровано 323700 випадків стафілококової інфекції та близько 10600 летальних випадків [52].

HA-MRSA – health care associated MRSA ціла група стафілококових інфекцій спричинених метицилінрезистентними золотистими стафілококами що циркулюють у закладах охорони здоров'я по всьому світу. Під час надходження в лікарняний стаціонар пацієнти заражаються стійкими до антибіотиків коагулазопозитивними і коагулазонегативними стафілококами що ускладнюють перебіг основної хвороби. Інфекції, пов'язані з медичною допомогою залишаються основною проблемою громадського здоров'я та загрозою безпеці пацієнтів у всьому світі [81, 94]. В цю групу входять катетер асоційовані інфекції пов'язані з катетеризацією сечового міхура, кровоносних судин, трахеї. наводить дані що стосуються частоти катетер асоційованих інфекцій. Так він констатує, що протягом 36 місяців (січень 2012 – грудень 2014) у відділеннях інтенсивної терапії 4 київських міських лікарень катетер асоційовані інфекції були викликані *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus epidermidis* у 14.6% випадків. З них 59,8% та 6,6%

виділених *Staphylococcus aureus* були стійкими до оксациліну та тейкопланіну відповідно [187].

Також Salmanov (2019) у своїй праці описує, що з 3753 випадків інфекцій, пов'язаних із медичною допомогою у лікарнях швидкої допомоги в Києві протягом 2014-2016 років *Staphylococcus aureus* викликали у 14,8% випадків а коагулазонегативні стафілококи у 7,5% випадків відповідно [186]. Так золотистий стафілокок виділяли при пневмонії і хворобах нижніх дихальних шляхів у 12,6% випадків, при захворюваннях з хірургічним втручанням у 18,0% випадків, хворобах сечовивідних шляхів у 1,8% випадків, хворобах кровотоку у 15,9% випадків [186].

Досліджуючи стійкість до антимікробних речовин у стафілококів постає питання профілю їх резистентності. У медичній літературі використовується багато різних визначень для мультирезистентних (MDR), широко стійких до ліків (XDR) і панрезистентних (PDR) бактерій, щоб охарактеризувати різні форми резистентності бактерій, які пов'язані з медичною допомогою та стійкі до антимікробних препаратів. Група міжнародних експертів об'єдналася завдяки спільній ініціативі Європейського центру профілактики та контролю захворювань (ECDC) і Центрів контролю та профілактики захворювань (CDC), щоб створити стандартизовану міжнародну термінологію для опису профілів набутої резистентності у золотистого стафілококу.[140]

Згідно цієї класифікації

-Множинна лікарська стійкість (multidrug-resistant)(MDR) визначалася як набута несприйнятливість принаймні до одного антибіотику в трьох або більше категоріях протимікробних засобів.

-Широка лікарська стійкість (extensively drug-resistant) (XDR) визначалася як несприйнятливість принаймні до одного антибіотику у всіх категоріях антимікробних препаратів, крім двох або менше (тобто ізоляти бактерій залишаються чутливими лише до однієї або двох категорій антимікробних засобів).

-Пан-резистентність (pandrug-resistant) (PDR) визначалася як несприйнятливість до всіх антибіотиків усіх категорій протимікробних засобів.

Золотистий стафілокок що фенотипово стійкий до Оксациліну або Цефоксітіну або має ген носій стійкості до метициліну *mec A* вважається мультирезистентним (MDR) [140].

LA-MRSA – livestock associated MRSA група метицилінрезистентних золотистих стафілококів виділених від домашніх тварин. LA-MRS - сюди входять коагулазонегативні метицилінрезистентні стафілококи.

Провівши аналіз стійкості виділених стафілококів з молока до різних антимікробних речовин встановлено що серед досліджених культур значна частина (34,2 %) припадає на резистентні до двох і більше антибіотиків. Цей факт вказує на те, що молоко може бути джерелом поширення резистентних до антибіотиків стафілококів.

Зокрема встановлено, що коагулазопозитивний штам «133» володів одночасною резистентністю до 9 з 13 досліджених антибіотиків за виключенням ванкоміцину, хлорамфеніколу, гентаміцину та тобраміцину. Інший коагулазопозитивний штам «136» був стійким до 5 з 13 досліджуваних антибіотиків за виключенням оксациліну, ванкоміцину, хлорамфеніколу, тобраміцину, норфлораксацину, ципрофлораксацину, тетрацикліну, доксицикліну.

Коагулазонегативний штам «114» був стійкий до 9 з 13 досліджених антибіотиків а саме до: бензилпеніциліну, оксациліну, ампіциліну, еритроміцину, тетрацикліну, доксицикліну, норфлораксацину, ципрофлораксацину, хлорамфеніколу.

Отримані нами дослідження щодо відсотку виявлення стафілококів в пробах молока відібраного від хворих на мастит корів та аналіз їх стійкості до протимікробних засобів співпадають з дослідженнями інших авторів щодо частоти виділення стафілококів з молока та молочних продуктів виготовлених в домашніх умовах та в умовах ферм [131], а також щодо

участі стафілококів у етіології маститу корів [114] та про поширення стафілококового маститу викликаного стійкими до різних груп антибіотиками по всіх континентах. [32, 105, 106, 113, 195].

Інтенсивний шлях розвитку свинарства дозволив застосувати технології для групового утримання великої кількості поголів'я свиней в обмеженому просторі. Що в свою чергу спричинило до збільшення використання антибіотиків для профілактики і лікування свиноматок і відлучених поросят та свиней на відгодівлі. Це застосування антимікробних речовин призвело до формування стійкості у нормальної і умовно-патогенної мікрофлори свиней.

Досліджені проби від свиней з двох господарств - 77 і 39 проб відповідно в яких стафілококи ізолювано з 83,1% і 56,4 % досліджених зразків причому ізоляти, спроможні до коагуляції плазми кроля виявлено у 60,9% випадках в лише в першому господарстві.

Необхідно відзначити, що серед досліджених 18 коагулазопозитивних *Staphylococcus spp.* резистентними до бензилпеніциліну, ампіциліну, норфлуксацину та ципрофлуксацину були 100% культур; до спарфлуксацину - 97%, до офлуксацину - 95,3%, до левофлуксацину - 93,3%, до лінкоміцину - 92%, до гатіфлуксацину - 87% культур, ломефлуксацину - 87% культур, до пефлуксацину 70% помірно резистентних та резистентних культур, до тетрацикліну 52%, до доксицикліну - 28,5%, до кліндаміцину - 42%, до оксациліну помірно стійкими і стійкими 9%. Аналогічна ситуація щодо поширення резистентних ізолятів відмічалась і серед групи коагулазонегативних *Staphylococcus spp.*

Свині як безсимптомні носії MRS і MRSA відіграють важливу роль у процесі передачі стійких стафілококів до людей та інших тварин [118, 126, 201].

Таким чином колонізуючи слизову оболонку і шкіру працівників, що доглядають за свинями, беруть участь у обробці продуктів свинарства, ветеринарних працівників та контамінуючи продукти і відходи свинарства.

Метицилінрезистентні коагулазопозитивні і коагулазонегативні стафілококи активно заселяють слизові оболонки і шкіру тварин-компаньйонів (собак, котів) [124, 214]. Через тісні контакти між домашніми собаками, кішками і людиною, ветеринарними працівниками, існує загроза передачі стійких стафілококів від тварин до людини і навпаки, .

Провівши дослідження клінічного матеріалу від 44 тварин-компаньйонів різних статеві-вікових груп в 54 % зразків були виявлені *Staphylococcus spp.* Серед 25 досліджених (14 виділених від котів і 11 від собак), виявлено 8,0% коагулозопозитивних культур; виділені штами від котів і собак володіли множинною резистентністю до двох і більше груп антибіотиків. Так виділено від котів коагулазонегативний штам «17» який був резистентним до 10 з 13 досліджуваних антибіотиків за виключенням левофлораксацину, фузідієвої кислоти та був помірно резистентним до доксициліну. Також від котів виділено резистентний до 9 з 13 досліджуваних антибіотиків окрім хлорамфеніколу та групи фторхінолонів штам «30». 35,7% виділених від котів штамів були чутливими до всіх досліджуваних груп антибіотиків.

Два виділені від собак коагулазопозитивні штами проявляли різну резистентність. Так, штам «19» був чутливий до бензилпеніциліну, ампіциліну, оксациліну еритроміцину та водночас стійкий до 9 інших антибіотиків; штам «33» був резистентний до бензилпеніциліну, гентаміцину, тобраміцину та фузідієвої кислоти і водночас чутливий до решти 9 антибіотиків. Серед коагулазонегативних штамів виділених від собак один штам «38» був резистентний до 12 досліджуваних антибіотиків окрім за виключенням доксицикліну. Виділено також один штам «25» резистентний до групи пеніцилінів та еритроміцину і два штами «23» «36» резистентні до групи пеніцилінів. Лише 27,2% досліджених ізолятів стафілококів були чутливими до антибіотиків із всіх груп.

Проблема циркуляції полірезистентних стафілококів серед тварин-компаньйонів отримала значне поширення по всіх континентах, не залежить

від соціального розвитку і становища в тій чи іншій країні і залишається актуальною і в наш час [49, 60, 136, 143, 170, 235].

Що стосується розповсюдження стафілококів серед людей і тварин то у довкілля стафілококи потрапляють від хворих тварин і людей та клінічно-здорових носіїв вказаних мікроорганізмів. Важливим є факт що, при контакті з хворими в окремих осіб може формуватись резидентне стафілококове бактеріоносійство, коли постійним місцем їх проживання стає слизова оболонка носа, звідки вони розповсюджуються з секретами. Таке носійство особливо небезпечне серед медичного та ветеринарного персоналу лікарень, оскільки носії можуть стати джерелом внутрішньогоспітальних інфекцій [26, 164, 184, 193, 233].

Піддані нами дослідженню 19 штамів стафілококів виділених від пацієнтів однієї з лікарень з ознаками нозокоміальних бактеріальних інфекцій у 57,9% - коагулювали цитратну плазму кроля. Провівши дослідження результатів вивчення стійкості до антибактеріальних препаратів з'ясовано що, до бензилпеніциліну стійкими були 72,7% (8 з 11) коагулазопозитивних та 100% коагулазонегативних (8) культур стафілококів.

До оксациліну стійкими було 21,1% досліджених штамів (1 - коагулазопозитивний та 3 коагулазонегативних). Коагулазопозитивний штам «2» проявляв одночасну стійкість до антибіотиків групи пеніцилінів, макролідів та фузидієвої кислоти. Коагулазонегативні стафілококи «14» «19» були резистентними до 12 досліджуваних антибіотиків за виключенням ванкоміцину та хлорамфеніколу, а штам «17» - був резистентними до 11 досліджуваних антибіотиків окрім доксицикліну, ванкоміцину та хлорамфеніколу.

Здатність *Staphylococcus* виділених з молока хворих на мастит корів, фенотипово утворювати біоплівку високої (20,0%), середньої (34,3%) та низької (28,5%) щільності підтверджуються наведеними літературними даними. [20, 21]. Водночас (17,2%) стафілококів не утворювали біоплівки взагалі.

Виділені від свиней і обрані для подальших досліджень 10 стафілококів у 100% випадків виявили фенотипову спроможність до біоплівкоутворення, зокрема біоплівку високої щільності утворювали 10,0%, а 90,0% стафілококів утворювали біоплівку середньої щільності.

Що стосується фенотипової здатності до утворення біоплівок то у 100% досліджених нами ізолятів стафілококів виділених від тварин-компаньйонів виявлено спроможність до утворення біоплівок, частіше - високої щільності 88,0%, решта 12,0% - формували біоплівки середньої щільності.

Під час дослідження стафілококів отриманих від людей на виявлення фенотипової здатності до формування біоплівок встановлено що серед цієї групи штамів біоплівки високої щільності були спроможні утворювати 68,4%, а біоплівки середньої щільності - 31,6%.

Під час молекулярно-біологічного виявлення генів, носія стійкості до метициліну та інших β -лактамних антибіотиків *tes A* та гену *fet B* що сприяє підвищенню стійкості. та виявлення наявності генів, що забезпечують утворення біоплівок *ica A*, *ica D* та *ica AB*. було встановлено, що у штаму «133» коагулазопозитивного стафілококу виділеного з молока з проявом фенотипових ознак стійкості до оксациліну та бензилпеніциліну виявлено за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції присутність генів носія стійкості до метициліну *tes A* та гену *fet B* що сприяє підвищенню стійкості. .

Гени, які зумовлюють утворення біоплівки, виявлено у 7 досліджуваних штамів. Зокрема, *ica D* та *ica A* - виявлено одночасно у двох коагулазопозитивних штамів («133», «136»); також ген *ica D* було виявлено у трьох коагулазонегативних штамів («106» «121» «123»). Ген *ica AB*, що також бере участь у формуванні біоплівок у *S. epidermidis*, було виділено двох коагулазонегативних штамів «121» «134».

В результаті молекулярно-генетичних досліджень серед стафілококів виділених від свиней, наявність генів носія стійкості до метициліну та інших β -лактамних антибіотиків *tes A* та гену *fet B* що сприяє підвищенню

стійкості було виявлено у одного штаму коагулазопозитивного стафілококу. Ген *tes A* також був присутній у одного штаму коагулазонегативного стафілокока. В той же час, наявність генів, що відповідають за утворення біоплівки - *ica D* і *ica A* - виявлено лише у одного коагулазопозитивного стафілокока. Виявлення нами ізолятів стафілококів що проявляли стійкість до антибіотиків та здатність до формування біоплівки дають підстави зробити припущення про те, що свині у свинарських підприємства можуть бути джерелом потенційно небезпечних для людей мікроорганізмів.

Результатом молекулярно-генетичних досліджень було виявлення відсутності у досліджуваних нами стафілококів виділених від тварин-компаньйонів генів: носія стійкості до метициліну *tes A* та гену *fet B* що сприяє підвищенню стійкості.

Ген утворення біоплівки *ica D* виявлено у 12,0% «20» «42» «43» штамів коагулазонегативних стафілококів, а ген утворення біоплівки *ica A* виявлено у одного штаму «19» коагулазопозитивного стафілокока, що становило 4,0%.

Незважаючи на не виділення нами генів стійкості до метициліну та інших β -лактамних антибіотиків здатність до формування біоплівки досліджуваних нами стафілококів є одним із факторів що можуть посилювати їх патогенні властивості.

В результаті молекулярно-генетичних досліджень стафілококів виділених від людей встановлено, що 15,7% коагулазонегативних («14» «17» «19») та 5,2% коагулазопозитивних 2 штами володіли структурним геном *tes A*. Також штаму «2» коагулазопозитивний (5,2%) володів одночасно структурними генами *tes A* і *fet B* (5,2%). Одночасно шість («1» «2» «4» «6» «7» «9») коагулазопозитивних штамів містили у своєму складі гени утворення біоплівки *ica D* та *ica A*. Гени *ica D* були в наявності у двох («3» і «8») коагулазопозитивних та чотирьох («14», «15», «17», «19») коагулазонегативних стафілококів. Ген біоплівкоутворення *ica AB* було виявлено у трьох (15,7%) коагулазонегативних штамів («12» «13» «16»)

стафілококів. Отримані нами результати в цілому збігаються з результатами інших авторів [17, 22, 26, 130, 186, 187, 222, 231].

Результати проведених нами досліджень свідчать про різну наявності дослідних генів серед різних стафілококів виділених з досліджуваних об'єктів. Найбільшою наявністю дослідних генів володіли стафілококи виділені від людей потім стафілококи виділені від корів і тварин компаньйонів.

Отримані нами результати не можуть повною мірою бути співставлені з результатами іноземних авторів у зв'язку з не повнотою наших молекулярно-генетичних досліджень а саме не проведенням окремих дослідів у ПЛР щодо відношення певних виділених нами стафілококів до окремих клональних комплексів що циркулюють у Європейських та Азійських країнах; а також досліджень відсутності проведених нами досліджень персоналу свинокомплексів в яких проводили відбір проб від свиней на можливість носійства стафілококів та співставлення їх властивостей між собою.

Також варто зазначити що процес формування біоплівки складний і багатокомпонентний участь у якому приймають не лише досліджені нами гени а й інші гени та білки [130]. На нашу думку представлені дослідні гени найбільш часто зустрічаються у комплексі (*ica*) але вони не можуть служити вирішальним маркером щодо здатності стафілококів до формування біоплівки.

Водночас аналіз одержаних результатів свідчить, що незалежно від джерела виділення, представники як коагулазопозитивних, так і коагулазонегативних стафілококів, можуть виступати носіями генетичних детермінант патогенності, зокрема генів, носія стійкості до метициліну та інших β -лактамних антибіотиків *tes A* та гену *fem B* що сприяє підвищенню стійкості. та генів утворення біоплівки (*ica A*, *ica D* *ica AB*).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі висвітлено результати досліджень культурально-морфологічних, ферментативних та біохімічних властивостей бактерій роду *Staphylococcus*, виділених з зразків біологічного матеріалу від свійських тварин та людини. Вивчено чутливість до антибіотиків ізолятів стафілококів отриманих з молока хворих на мастит корів, від свиней, котів, собак та людей.

Досліджена здатність виділених бактерій роду *Staphylococcus* до формування біоплівки. Проведено молекулярно-генетичні дослідження з метою виявлення детермінант патогенності – генів, що викликають стійкість до метициліну та утворення біоплівки.

З'ясовано ефективність застосування різних культуральних середовищ для відновлення ліофілізованих штамів стафілококів та накопичення їх біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів. Підготовлено пакет нормативних документів для реєстрації засобу для діагностики патогенних стафілококів.

1. Встановлено що частота виділення стафілококів становила: з молока 41,0%, від свиней 74,1%, собак і котів 56,8%. Коагулазопозитивні стафілококи переважали серед ізолятів виділених від свиней (45,3%) і людей (57,9%), а коагулазонегативні – виділені з молока (94,2%) та від тварин-компаньйонів (92,0%). Частіше спроможність до гемолізу еритроцитів виявлено у стафілококів виділених від свиней (71,0%), тварин-компаньйонів (84,0%) та людей (100%).

2. Встановлено що полірезистентні стафілококи складали - 34,2% культур виділених з молока; понад 50,0%, штамів виділених від свиней; 32% - тварин-компаньйонів та 21,0% від людей.

3. Досліджено високу здатність до утворення біоплівки стафілококами виділеними від тварин компаньйонів (88,0%) та від хворих

людей (68,4%), Формували біоплівки низької щільності 28,5% та не утворення її взагалі 17,2% ізолятів, виділених з молока.

4. Виявлено наявність у досліджуваних стафілококів детермінант патогенності – генів, носія стійкості до метициліну та інших β -лактамних антибіотиків *mec A* та гену *fem B* що сприяє підвищенню стійкості у 2,8% з молока, 10,0% від свиней, 26,3% від людей. У стафілококів виділених від тварин компаньйонів дослідні гени не виявлено.

5. Встановлено присутність у досліджуваних стафілококів детермінант патогенності – генів, що беруть участь в формуванні біоплівок (*ica D*, *ica A*, *ica AB*) у 20,0% з молока, 10,0% від свиней, 9,0% від тварин-компаньйонів, 78,9% від людей.

6. Встановлено, що в процесі сублімації та кріоконсервації культур *Staphylococcus aureus* втрати життєздатних мікробних клітин становили 99,98%. Найбільш високу продуктивність у відновлених культур було отримано за застосування Серцево-мозкового бульйону (концентрацію живих мікробних клітин у дослідних культур реєстрували $6,4 \times 10^9$ КУО/см³). Продуктивність культури *S. aureus* за застосування інших середовищ була нижчою на 64 %, 69 % та 36 % відповідно. Таким чином експериментально обґрунтовано застосування культуральних середовищ серцево-мозковий бульйон та триптон-соєвий бульйон для відновлення ліофілізованих стафілококів та накопичення бактеріальної біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів.

7. Аналіз проведених результатів досліджень дає підстави для проведення моніторингу із застосуванням мікробіологічних та молекулярно-генетичних методів для виявлення циркуляції потенційно небезпечних культур стафілококів серед тварин і людей та визначення генетичних маркерів патогенності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Акатов, А. К., Зуева, В. С. Стафилококки. Москва : Медицина, 1983. 240 с.
2. Акименко Л., Бойко, П. Підтримання біотехнологічних характеристик депонованих штамів - важлива складова якості імунобіологічних препаратів. Наук.-техн. бюл. Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Львів, 2007. Вип. 8, № 3, 4. С. 221-226.
3. Виговська Л. М., Іщенко Л. М., Ушкалов В. О., Данчук В. В., Мідик С. В., Кепл О. Ю., Калакайло Л. І., Вішован Ю. Ю., Ушкалов А. В., Гранат А. В., Терещенко С. А., Давидовська Л. О., Бояновський С. О., Довбня Ю. Ю. Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів: [методичні рекомендації]. Київ, 2019. 36 с.
4. Виговська Л. М., Ушкалов В. О., Данчук В. В., Вішован Ю. Ю., Ушкалов А. В. Патент України на корисну модель u201907865. МПК: (2006): A61K 39/02 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01), C12Q 1/00, C12R 1/00 Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів (*Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Escherichia* тощо), придатних до використання в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) як позитивних контролей № 141068: заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. Заявлено 11. 07. 2019 опубліковано 25.03.2020, бюл. № 6/2020
5. Виговська, Л., Ушкалов, В., Акименко, Л., Салганська, О., Семко, К. Робота зі штамми мікроорганізмів у ДНКІБШМ. Ветеринарна медицина України: Наук.-вироб. щомісяч. 2007.12. С. 17-19.
6. Вішован Ю. Ю., Виговська Л. М., Ушкалов В. О. Данчук В. В. Патент України на корисну модель u201903914. МПК: A61K 39/085 (2006.01) Коагулазопозитивний штам *Staphylococcus aureus* з множинною стійкістю до антибіотиків для виготовлення діагностичних та

імунобіологічних препаратів № 141004: заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. Заявлено 15. 04. 2019 опубліковано 25.03.2020, бюл. № 6/2020.

7. Вішован Ю. Ю., Ушкалов В. О., Виговська Л. М. Поширення мікроорганізмів роду *Staphylococcus* серед клінічно здорових свиней. Актуальні інфекційні захворювання. Сучасні аспекти клініки, діагностики, лікування та профілактики: між нар. наук-практ. конф.: тези доп., Київ, 2019.

8. Вішован Ю.Ю. Дослідження на вміст *Staphylococcus spp* молока від хворих на субклінічний мастит корів. Наукові доповіді НУБіП України 2017. №6(70).

9. Вішован Ю.Ю., Ушкалов В.О. Поширення стафілококів та захворювань зумовлених ними. Вісник аграрної науки.2018. № 2(779) 36-42 с.

10. Волобуєва Л., Русалов,В., Салманова, О. Видовий склад та біологічні властивості стафілококів ендогенного походження, що є збудниками піодермій.Укр. медичний альманах. 2013.Т. 16, № 2.С. 16 - 18

11. Головка А. М., Ушкалов А. В., Виговська Л. М., Ковтун В. А. Вивчення впливу захисного середовища з аеросилом у процесі ліофілізації та зберігання на досліджувані культури *Yersinia spp*. Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. 2015. Вип. 16. № 2. С. 188–193

12. Головка А.М., Скрипник, В.Г., Пінчук Н.Г Гордієнко О.І., Ординська Д.О. Спосіб контактного висушування для довготривалого збереження бактерій. Методичні рекомендації по довготривалому збереженню бактерій методом сорбційно-контактного зневоднення. К., 2004. -18 с.

13. Гордієнко О. І. та ін. Оптимізація параметрів стадії досушування процесу ліофілізації *E.Coli* 0–55 при використанні модифікованих захисних

середовищ. Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. Харків: ІЕКВМ, 2011. Вип. 95. С. 51–53

14. Гордієнко, О. Використання високодисперсного кремнезему а-300 при сублімації мікроорганізмів. Ветеринарна біотехнологія. 2018. Вип. 32(1). С. 80–84.

15. Довідник лікаря ветеринарної медицини; за ред. П.і. Вербицького, П.П. Достоевського. — К.: Урожай, 2004. — 1278 с.

16. ДСТУ ISO 6888-1:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод підраховування коагулазо-позитивних стафілококів (*staphylococcus aureus* та інших видів). Частина 1. Метод з використанням агарового середовища Беард-Паркера.

17. Зезюліна, О., Воронкова, О. Біологічні властивості грампозитивних коків, виділених при хронічному носійстві у дорослих. Український журнал медицини, біології та спорту, 2018

18. Ковтун В. А., Ушкалов В. О., Виговська Л. М., Мачуський О. В. Конструювання захисного середовища для ліофілізації бактерій роду *Listeria*. Ветеринарна біотехнологія : бюллетень. Інститут ветеринарної медицини НААН, Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів. 2013. № 22. С. 224–232.

19. Краткий определитель бактерий Берги / Под. ред. Дж. Хоулта. Москва :Мир, 1980. 496 с

20. Кухтин М., Крушельницька Н. Формування біоплівки мікроорганізмами, які виділені з доїльного устаткування. Біологія тварин. 2014. Т. 16, № 1. С. 95-103.

21. Кухтин М., Перкій Ю., Крушельницька Н. Формування змішаних біоплівки мікроорганізмами, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого. Ветеринарна медицина. 2013. Вип. 97. С. 442-443.

22. Надвернюк Р.А., Воронкова О.С., Франкенберг А.А., & Шевченко Т.М. Чутливість до антибіотиків клінічних ізолятів стафілококів. *Вісник проблем біології і медицини*. 2019. 1 (1 (148)), 254-257

23. Окулич, В. К., Кабанова А.А. Плотников Ф.В. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии : монография. - Витебск 2017. - 300 с
24. Осадчая А. И. и др. Влияние некоторых факторов на криорезистентность сохранение жизнеспособности при лиофилизации культур *Bacillus subtilis*. Биотехнология. 2002. № 3. С. 45–54.
25. Педан, В. А. Бактерії роду *Staphylococcus* — збудники стафілококозу перепелів. Вісн. Сум. нац. аграр. ун-ту. 2004. Вип. 2. С. 112–114.
26. Полтавець О. Д., Крисенко О. В., & Воронкова О. С. Моніторинг стафілококового носійства серед вагітних у місті Дніпро. Вісник проблем біології і медицини. 2016. 2 (4), 180-183.
27. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 п 535 "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико - диагностических лабораториях лечебно - профилактических учреждений"
28. Романько М. Є. Мембранотропний вплив наночастинок аурому та аргентуму на інтенсивність окиснювальних процесів у клітинах *Escherichia* за умов їх ліофілізації/регідратації. Біологія тварин. 2010. Т. 12, № 2. С. 460–473.
29. Романько М. Є., Рєзніченко Л. С. Наночастинки аурому та аргентуму як потенційні кріопротектори за довготривалого зберігання виробничих штамів мікроорганізмів. Біотехнологія. 2012. Т. 5, № 5. С. 100–108.
30. Ушкалов В. О., Салганська О. О., Виговська Л. М., Постоєнко В. О. Дослідження біологічних властивостей бактерій роду *Salmonella* при тривалому зберіганні у ліофільному стані. Ветеринарна біотехнологія: бюлетень. 2008. № 12. С. 276–283.

31. Черкасский Б. Л., Минаев В. И. Александрова Н. З. Методы хранения культур бактерий рода *Campylobacter*. Актуальные вопросы изучения кишечных инфекций. Нальчик, 1988. С. 66–70.
32. Abed, A. H., Menshawy, A., Zeinhom, M., Hossain, D., Khalifa, E., Wareth, G., & Awad, M. F. Subclinical Mastitis in Selected Bovine Dairy Herds in North Upper Egypt: Assessment of Prevalence, Causative Bacterial Pathogens, Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Genes. *Microorganisms*. 2021. 9(6), 1175.
33. Adeyanju, A., et al. Local Epidemiology of Nosocomial *Staphylococcus aureus* Infection in a Nigerian University Teaching Hospital. *Antibiotics* 2022, 11, 1372.
34. Adigun, O, Gcebe, N, Jambwa, K, Fasina, F, Adesiyun, AA. Molecular and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from carcass swabs and carcass drips of chickens slaughtered in the informal market in Gauteng Province, South Africa. *J Food Saf.* 2020. e12806.
35. Aires-de-Sousa M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2017. 23(6), 373–380.
36. Alibayov, B., Zdenkova, K., Sykorova, H., Demnerova, K. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPI) and their superantigens combination of food samples. *Journal of Microbiological Methods*. 2014. 107, 197–204
37. Amaechi, N., & Adiele, W. Microbial Evaluation of Raw Milk from Dairy Farms in Udi (2015). *L. G. A Enugu State , Nigeria*.
38. Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaioli, S., & Montanaro, L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2015. 5, 7.
39. Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*. 2010. 2(7), 1751–1773.

40. Asai, K., Yamada, K., Yagi, T., Baba, H., Kawamura, I., & Ohta, M. Effect of incubation atmosphere on the production and composition of staphylococcal biofilms. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherap.* 2015. 21(1), 55–61.
41. Asanin, J., et al. Genetic Profiling and Comparison of Human and Animal Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Serbia. *Antibiotics.* 2019. 8(1), 26.
42. Ashley, D. J., & Brindle, M. J. Penicillin resistance in staphylococci isolated in a casualty department. *Journal of clinical pathology.* 1960. 13(4), 336–338.
43. Ayshpur O., Mushtuk I., Humeniuk V., Yermolenko O., Derevianko M. Studying Antibiotic Resistance of *Staphylococcus Aureus* Clinical Isolates from Cattle with Bovine Bacteriosis in Ukrainian Farms. *BTRP Ukraine 2022 International Biothreat Reduction Symposium.* Kyiv, Ukraine, 24-27 October 2022. abstract Kyiv,2022, p.126
44. Baig, S., Johannesen, T.B., Overballe-Petersen, S., Larsen, J., Larsen, A.R., Stegger, M. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 2018. 61:74–76
45. Barrett, F. F., McGehee, R. F., Jr, & Finland, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. *The New England journal of medicine.* 1968. 279(9), 441–448.
46. Benrabia, I., Hamdi, T. M., Shehata, A. A., Neubauer, H., & Wareth, G. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Poultry Species in Algeria: Long-Term Study on Prevalence and Antimicrobial Resistance. *Veterinary Sciences.* 2020. 7(2), 54.
47. Bernier-Lachance, J., et al. Prevalence and characteristics of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolated from chicken meat in the province of Quebec, Canada. *PloS one.* 2020. 15(1). e0227183.

48. Bhoi, P., Otta, S., Swain, B., & Kar, B. R. Prevalence of nasal carriage of MRSA in diabetic patients attending the outpatient department. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 2020. 8(4), 1336.
49. Bierowiec, K., Płoneczka-Janeczko, K., & Rypuła, K. Prevalence and Risk Factors of Colonization with *Staphylococcus aureus* in Healthy Pet Cats Kept in the City Households. *BioMed research international*. 2016. 3070524.
50. Boles, B. R., & Horswill, A. R. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in microbiology*. 2011. 19(9), 449–455.
51. Boswihi, S.S., Udo, E.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update on the epidemiology, treatment options and infection control. *Curr Med Res Pract*. 2018. 8:18–24
52. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: *U.S. Department of Health and Human Services, CDC*; 2019
53. Chambers, H. F., & Deleo, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews. Microbiology*. 2009. 7(9), 629–641.
54. Chen, Q., et al. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. *MicrobiologyOpen*. 2020. 9(1), e00946.
55. Cherifi, S., Byl, B., Deplano, A., Nonhoff, C., Denis, O., & Hallin, M. Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. *Journal of clinical microbiology*. 2013. 51(5), 1541–1547.,
56. Cheung, G. Y., Joo, H. S., Chatterjee, S. S., & Otto, M. Phenol-soluble modulins--critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS microbiology reviews*. 2014. 38(4), 698–719.
57. Chueahiran, S., Yindee, J., Boonkham, P., Suanpairintr, N., & Chanchaithong, P. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 398 as a Major MRSA Lineage in Dogs and Cats in Thailand. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2021. 10(3), 243.

58. Chujun Ou, Daiqi Shang, Jingxian Yang, Bo Chen, Jiang Chang, Fangning Jin, Chunlei Shi. Prevalence of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with strong biofilm formation ability among animal-based food in Shanghai, *Food Control*. 2020. 112,107106.
59. Clarke, S. R., & Foster, S. J. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Advances in microbial physiology*. 2006. 51, 187–224. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2003. 9(9), 955–958.
60. Coelho, C., et al. Molecular detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from dogs in Portugal. *Microbial Drug Resistance*. 2011. 17(2), 333-337,
61. Conlon, K. M., Humphreys, H., & O'Gara, J. P. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of bacteriology*. 2002. 184(16), 4400–4408.
62. Crespo-Piazuelo, D., Lawlor, P.G. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) prevalence in humans in close contact with animals and measures to reduce on-farm colonisation. *Ir Vet J*. 2021. 74, 21
63. Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., & Penadés, J. R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*. 2001. 183(9), 2888–2896.
64. Cuny, C., Abdelbary, M. M., Köck, R., Layer, F., Scheidemann, W., Werner, G., & Witte, W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from infections in horses in Germany are frequent colonizers of veterinarians but rare among MRSA from infections in humans. *One Health*. 2016. 2, 11-17.
65. Cuny, C., Strommenger, B., Witte, W., & Stanek, C. (2008). Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in a veterinary hospital. *Microbial drug resistance*, 14(4), 307-310.

66. da Costa Krewer, C., Santos Amanso, E., Veneroni Gouveia, G., de Lima Souza, R., da Costa, M. M., & Aparecido Mota, R. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Tropical animal health and production*. 2015. 47(3), 511–518.
67. Daka, D., G/Silassie, S., & Yihdego, D. Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2012. 11, 26.
68. Dastgheyb, S. S., & Otto, M. Staphylococcal adaptation to diverse physiologic niches: an overview of transcriptomic and phenotypic changes in different biological environments. *Future microbiology*, 2015. 10(12), 1981–1995.
69. de Freitas Guimarães, F., Nóbrega, D. B., Richini-Pereira, V. B., Marson, P. M., de Figueiredo Pantoja, J. C., & Langoni, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of dairy science*. 2013. 96(5). 2866–2872
70. Devriese, L.A., Van Damme, L.R. and Fameree, L. Methicillin (Cloxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains Isolated from Bovine Mastitis Cases. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*. 1972. 19: 598-605.
71. Dhanawade, N. B., Kalorey, D. R., Srinivasan, R., Barbuddhe, S. B., & Kurkure, N. V. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Veterinary research communications*. 2010. 34(1), 81-89.
72. Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Shortridge, D., Zervos, M., & Jones, R. N. Twenty-Year Trends in Antimicrobial Susceptibilities Among *Staphylococcus aureus* From the SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program*. *Open forum infectious diseases*, 6(Suppl 1). 2019. S47–S53.
73. Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*. 2000.

74. Donkor, E., Aning, K., & Quaye, J. Bacterial contaminations of informally marketed raw milk in Ghana. *Ghana medical journal*. 2007. 41(2), 58–61.
75. Drougka, E., et al. Interspecies spread of *Staphylococcus aureus* clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece. *Preventive veterinary medicine*. 2016. 126, 190–198.
76. Dunyach-Remy, C., Ngba Essebe, C., Sotto, A., & Lavigne, J. P. *Staphylococcus aureus* Toxins and Diabetic Foot Ulcers: Role in Pathogenesis and Interest in Diagnosis. *Toxins*, 2016. 8(7), 209.
77. Dutta, T. K., et al. Multidrug-resistant *Staphylococcus pettenkoferi* isolated from cat in India. *Veterinary world*. 2018. 11(10), 1380–1384
78. Ehlers, M. M., Strasheim, W., Lowe, M., Ueckermann, V., & Kock, M. M. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Implicated in Catheter-Related Bloodstream Infections at an Academic Hospital in Pretoria, South Africa. *Frontiers in microbiology*. 2015. 8. 9, 417.
79. Enquebaber Tarekgne, Siv Skeie, Knut Rudi, Taran Skjerda and Judith A. Narvhus. *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* species in milk and milk products from Tigray region, Northern Ethiopia. *African Journal of Food Science*. 2015. 9(12), 567-576.
80. Eucast. The European committee on antimicrobial susceptibility testing (2020). Available from: <http://www.eucast.org/>
81. European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018*. Stockholm: ECDC; 2019.
82. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - *Annual Epidemiological Report 2021*. Stockholm: ECDC; 2022.
83. European Centre for Disease Prevention and Control. Multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* – 8 November 2018. *Stockholm: ECDC*; 2018.,

84. Fabrizio. et al. First reporting of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in an industrial rabbit holding and in farm-related people. *Veterinary Microbiology*. 2014. 170. 10.
85. Faires, M. C., Tater, K. C., & Weese, J. S. An investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in people and pets in the same household with an infected person or infected pet. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2009. 235(5), 540–543.
86. Ferreira, D.deC., Silva, G. R., Cavalcante, F. S., Carmo, F. L., Fernandes, L. A., Moreira, S., Passos, M. R., Colombo, A. P., & Santos, K. R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in HIV patients: risk factors associated with colonization and/or infection and methods for characterization of isolates - a systematic review. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 2014. 69(11), 770–776.
87. Feßler, A. T. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from zoo and wild animals. *Veterinary microbiology*. 2018. 218, 98–103.
88. Findik, A., Çiftçi, A., Önyay, T., Sezener, M.G., Koçak, Y., & Gülhan, T. Determination of methicillin resistance and some genotypic characteristics of staphylococci isolated from dogs and their owners. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*:2018 Vol. 42: No. 6.
89. Firyal, S. et al., "Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of poultry and human sources. *14th International Bhurban Conference on Applied Sciences and Technology (IBCAST)*, Islamabad, 2017, pp. 189-191.
90. Formosa-Dague, C., et al. Sticky matrix: adhesion mechanism of the staphylococcal polysaccharide intercellular adhesin. *ACS nano*. 2016. 10(3), 3443-3452.
91. Foster T. *Staphylococcus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>

92. Frebourg, N. B., Lefebvre, S., Baert, S., & Lemeland, J. F. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *Journal of clinical microbiology*. 2000. 38(2), 877–880.
93. Gabli, Z., Djerrou, Z., Gabli, A. E., & Bensalem, M. Prevalence of mastitis in dairy goat farms in Eastern Algeria. *Veterinary world*. 2019. 12(10), 1563–1572.
94. Gagliotti Carlo et al. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: diverging trends of methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates, EU/EEA, 2005 to 2018. *Euro Surveill*. 2021. 26(46).
95. Ge, J. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among urban rodents, house shrews, and patients in Guangzhou, Southern China. *BMC veterinary research*. 2019. 15(1), 260
96. Gelasakis, A. I., Mavrogianni, V. S., Petridis, I. G., Vasileiou, N. G., & Fthenakis, G. C. Mastitis in sheep. The last 10 years and the future of research. *Veterinary microbiology*. 2015. 181(1-2), 136–146.
97. Gerke, C., Kraft, A., Süssmuth, R., Schweitzer, O., & Götz, F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *The Journal of biological chemistry*. 1998. 273(29), 18586–18593.
98. Gill, S. R., et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *Journal of bacteriology*. 2005. 187(7), 2426–2438.
99. Gómez-Sanz E, Ceballos S, Ruiz-Ripa L, Zarazaga M and Torres C. Clonally Diverse Methicillin and Multidrug Resistant Coagulase Negative *Staphylococci* Are Ubiquitous and Pose Transfer Ability Between Pets and Their Owners. *Front. Microbiol*. 2019. 10:485.
100. Gottlieb S. CDC reports first case of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. *BMJ: British Medical Journal*. 2003. 326(7393), 783.

101. Gravenkemper, C. F., Brodie, J. L., & Kirby, W. M. Resistance Of Coagulase-Positive Staphylococci To Methicillin And Oxacillin. *Journal of bacteriology*. 1965. 89(4), 1005–1010.
102. Guardabassi, L., Stegger, M., & Skov, R. Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish slaughter pigs. *Veterinary microbiology*. 2007. 122(3-4), 384-386.
103. Haenni M, Châtre P, Dupieux-Chabert C, et al. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Horses, Cats, and Dogs Over a 5-Year Period in France. *Frontiers in Microbiology*. 2017. 8:2493.
104. Hajjeh, R. A., Reingold, A. L., Weil, A., Shutt, K., Schuchat, A., & Perkins, B. A. Toxic Shock Syndrome in the United States: Surveillance Update, 1979–1996. *Emerging Infectious Diseases*. 1999, 5(6), 807-810.
105. Hamiroune, M., Berber, A., & Boubekour, S. Contribution to the study of staphylococcus contamination of cows' milk on a number of farms in Algiers: its impact on human health. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2014. 33(3), 1035–1034.
106. Haran, et al. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. *J. Clin. Microbiol.* 2012. V. 50. № 3. P. 688 - 695.
107. Heaton, C. J., Gerbig, G. R., Sensius, L. D., Patel, V., & Smith, T. C. *Staphylococcus aureus* Epidemiology in Wildlife: A Systematic Review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2020. 9(2), 89.
108. Heilmann C. Adhesion mechanisms of staphylococci. *Advances in experimental medicine and biology*. 2011. 715, 105–123.
109. Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., & Götz, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular microbiology*. 1996. 20(5), 1083-1091.

110. Hiramatsu, K., et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet (London, England)*. 1997. 350(9092), 1670–1673.
111. Hogan, S., Stevens, N. T., Humphreys, H., O'Gara, J. P., & O'Neill, E. Current and future approaches to the prevention and treatment of staphylococcal medical device-related infections. *Current pharmaceutical design*. 2015. 21(1), 100–113.
112. Hogan, S., Zapotoczna, M., Stevens, N. T., Humphreys, H., O'Gara, J. P., & O'Neill, E. Eradication of *Staphylococcus aureus* Catheter-Related Biofilm Infections Using ML:8 and Citrox. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016. 60(10), 5968–5975.
113. Horiuk, Yu. V., Kukhtyn, M.D., Perkiy, Y.B. & Horiuk, V.V. Resistance of the main pathogens of mastitis of cows to modern antimicrobial drugs. Science and Technology *Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*. 2018. 6(2), 49–53.
114. Horiuk, Yu.V., Kukhtyn, M.D., Perkiy, Yu.B., & Horiuk, V.V. Distribution of main patho-gens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 2018. 20(83), 115–119
115. <https://microbeonline.com/mrsa-emergence-types-detection/>
116. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
117. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/154/>
118. Huijsdens, X. W., Van Dijke, B. J., Spalburg, E., van Santen-Verheuvél, M. G., Heck, M. E., Pluister, G. N., ... & De Neeling, A. J. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2006. 5(1), 26.
119. Hussain, M., Herrmann, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F., & Peters, G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infection and immunity*. 1997. 65(2), 519–524

120. Indráková, A., Mašláňová, I., Kováčová, V., Doškař, J. & Pantůček, R. The evolutionary pathway of the staphylococcal cassette chromosome element. *Biologia*. 2016. 71(11), 1195-1203.
121. Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B., & Kaplan, J. B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. 74(2), 470-476.
122. Jevons, M. P. "Celbenin"-resistant staphylococci. *British medical journal*. 1961. 1(5219), 124.
123. Jonas, D., Speck, M., Daschner, F. D., & Grundmann, H. Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. *Journal of clinical microbiology*. 2002. 40(5), 1821–1823.
124. Kaspar U, von Lützau A, Schlattmann A, Roesler U, Köck R, et al. Zoonotic multidrug-resistant microorganisms among small companion animals in Germany. *Plos One*. 2018. 13(12): e0208364
125. Kern, A., & Perreten, V. Clinical and molecular features of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci of pets and horses. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013. 68(6), 1256–1266.
126. Khanna, T., Friendship, R., Dewey, C., & Weese, J. S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Veterinary microbiology*. 2008. 128(3-4), 298-303
127. Kinross P, et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among human MRSA isolates, European Union/European Economic Area countries, 2013. *Euro Surveill*. 2017;22(44).
128. Kmeť, V., Čuvalová, A., & Stanko, M. Small mammals as sentinels of antimicrobial-resistant staphylococci. *Folia microbiologica*. 2018. 63(5), 665–668.
129. Kozytska T., Garkavenko T. Circulation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in livestock and domestic animals in Ukraine. *4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium*, Kyiv, Ukraine, 20–24 May 2019: abstract. Kyiv, 2019. P. 245.

130. Kryvtsova M.V., Király J., Koščová J., Kostenko Ye.Ya., Bubnov R.V., Spivak M.Ya. Determination of biofilm formation and associated gene detection in *Staphylococcus* genus isolated from the oral cavity under inflammatory periodontal diseases. *Studia Biologica*. 2020: 14(3); 49–64.
131. Kukhtyn, M. D., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., Yaroshenko, T. Y., Vichko, O. I., & Pokotylo, O. S. Biotype characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products of private production in the western regions of Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. 8(3), 384–388.
132. Kuroda, M., et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet (London, England)*. 2001. 357(9264), 1225–1240.
133. Lakhundi, S., Zhang, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018. 31:e00020–e00018.
134. Le, K. Y., Dastgheyb, S., Ho, T. V., & Otto, M. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014. 4, 167.
135. Lee, G. Y., Lee, H. H., Hwang, S. Y., Hong, J., Lyoo, K. S., & Yang, S. J. Carriage of *Staphylococcus schleiferi* from canine otitis externa: antimicrobial resistance profiles and virulence factors associated with skin infection. *Journal of veterinary science*. 2019. 20(2), e6
136. Loeffler, A., & Lloyd, D. H. Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community?. *Epidemiology and infection*. 2010. 138(5), 595–605.
137. Loncaric, I., Tichy, A., Handler, S., Szostak, M. P., Tickert, M., & Künzel, F. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* sp. (MRS) in Different Companion Animals and Determination of Risk Factors for Colonization with MRS. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2019. 8(2), 36.
138. M. de L.R. de S. da Cunha et al. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006. 37(1). 70-74.

139. Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., & Laufs, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *Journal of bacteriology*. 1996. 178(1), 175–183
140. Magiorakos, A., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012. 18(3), 268–281.
141. Mahato, S., Mistry, H. U., Chakraborty, S., Sharma, P., Saravanan, R., & Bhandari, V. Identification of Variable Traits among the Methicillin Resistant and Sensitive Coagulase Negative Staphylococci in Milk Samples from Mastitic Cows in India. *Frontiers in microbiology*. 2017. 8, 1446.
142. Mama, O., Morales, L., Ruiz-Ripa, L., Zarazaga, M., Torres, C. High prevalence of multidrug resistant *S. aureus*-CC398 and frequent detection of enterotoxin genes among non-CC398 *S. aureus* from pig-derived food in Spain. *International Journal of Food Microbiology*. 2020. 320, 108510,
143. Manian F. A. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2003. 36(2), e26–e28.
144. Ministry of health of Ukraine. Determination of susceptibility of microorganisms to antibacterial drugs (2009). Available from: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07>
145. Molloy S. Biofilms: Biofilms take shape. *Nature reviews. Microbiology*. 2012., 10(3), 162.
146. Monecke, S. et al. Diversity of *Staphylococcus aureus* Isolates in European Wildlife. *PloS one*. 2016. 11(12), e0168433

147. Monistero, V., et al. Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries, *Journal of Dairy Science*. 2020. Vol. 103, Issue 4. Pages 3431-3446.
148. Mrochen, D. M. et al. Wild rodents and shrews are natural hosts of *Staphylococcus aureus*. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2018. 308(6), 590–597.
149. Nicholson, T. L., Shore, S. M., Smith, T. C., & Fraena, T. S. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolates of swine origin form robust biofilms. *PLoS One*. 2013. 8(8).
150. Novick, R. P., & Geisinger, E. Quorum sensing in staphylococci. *Annual review of genetics*. 2008. 42, 541-564.
151. Novick, R. P., Christie, G. E., & Penadés, J. R. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nature reviews. Microbiology*. 2010. 8(8). 541–551.
152. Nyamadzawo, A., Nishio, J., Okada, S., & Nyamakura, R. Effect of using portable alcohol-based handrub on nurses' hand hygiene compliance and nasal carriage of *staphylococcus aureus* in a low-income health setting. *American Journal of Infection Control*. 2020.
153. O'Gara, J. P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters*. 2007. 270(2), 179-188.
154. O'Neill, E., et al. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *Journal of bacteriology*, 2008. 190(11), 3835-3850.
155. Oniciuc E., Nicolau A., Hernández M., Rodríguez-Lázaro D. Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the food chain, *Trends in Food Science & Technology*. 2017. 61, 49-59.

156. Onyango, L. A., & Alreshidi, M. M. Adaptive Metabolism in Staphylococci: Survival and Persistence in Environmental and Clinical Settings. *Journal of pathogens*, 2018, 1092632.
157. Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiology spectrum*. 2018. 6(4), 10.
158. Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*. 2013. 64, 175–188.
159. Otto, M. Staphylococcal biofilms. *Gram-Positive Pathogens*. 2019. 699-711.
160. Oufriid et al. – Staphylococcal biofilm and catheter-related infections *J Infect Dev Ctries* 2015; 9(4):368-372.
161. Paharik, A. E., & Horswill, A. R. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiology spectrum*. 2016. 4(2), 10.
162. Palazzo, I. C., Araujo, M. L., & Darini, A. L. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. *Journal of clinical microbiology*. 2005. 43(1), 179–185.
163. Palma, E., Tilocca, B., & Roncada, P. Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. 21(6), 1914
164. Papadimitriou-Olivgeris, M., et al. Spread of Tst-Positive Staphylococcus aureus Strains Belonging to ST30 Clone among Patients and Healthcare Workers in Two Intensive Care Units. *Toxins*. 2017. 9(9), 270
165. Park K-H, , et al. Persistent Catheter-Related Staphylococcus aureus Bacteremia after Catheter Removal and Initiation of Antimicrobial Therapy. *PLoS ONE*. 2012. 7(10): e46389.
166. Park, J., Friendship, R. M., Poljak, Z., Weese, J. S., & Dewey, C. E. An investigation of exudative epidermitis (greasy pig disease) and antimicrobial resistance patterns of Staphylococcus hyicus and Staphylococcus aureus isolated

from clinical cases. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 2013 54(2), 139–144

167. Paterson, G. K., Harrison, E. M., & Holmes, M. A. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*. 2014. 22(1), 42–47

168. Periasamy, S., et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. 109(4), 1281–1286.

169. Petersen, A. et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel mecC gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013. 19(1), E16–E22.

170. Petinaki, E., & Spiliopoulou, I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection risks from companion animals: current perspectives. *Veterinary medicine (Auckland, N.Z.)*. 2015. 6, 373–382.

171. Podkowik, M., Park, J. Y., Seo, K. S., Bystron, J., & Bania, J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International journal of food microbiology*. 2013. 163(1). 34–40.

172. Pollitt EJG, Szkuta PT, Burns N, Foster SJ. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLoS Pathog* 2018.14(6): e1007112.

173. Porrero, M. C. et al. Carriage of *Staphylococcus aureus* by free-living wild animals in Spain. *Applied and environmental microbiology*. 2014. 80(16), 4865–4870.

174. Pumipuntu, N., et al. *Staphylococcus* spp. associated with subclinical bovine mastitis in central and northeast provinces of Thailand. *PeerJ*. 2019. 7, e6587

175. Rahimi F, Karimi S. Characteristics of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Poultry in Iran, *Arch Clin Infect Dis*. 2015. 10(4):e30885.

176. Rasmussen, S. L. et al. European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) as a natural reservoir of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* in Denmark. *PloS one*. 2019. 14(9), e0222031.
177. Rautenberg, M., Joo, H. S., Otto, M., & Peschel, A. Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulins release and virulence. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011. 25(4), 1254–1263.
178. Reyes, N., et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and microbiome composition among medical students from Colombia: a cross-sectional study. *F1000Research*. 2020. 9.
179. Ribeiro, C. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Poultry and Poultry Meat: A Meta-Analysis. *J Food Prot*. 2018. 81 (7): 1055–1062.
180. Rodríguez-López, P., et al. Assessment of the Antibiotic Resistance Profile, Genetic Heterogeneity and Biofilm Production of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from The Italian Swine Production Chain. *Foods*. 2020. 9(9), 1141.
181. Rohde, H. et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*. 2007. 28(9), 1711-1720.
182. Rountree, P. M., & Freeman, B. M. Infections caused by a particular phage type of *Staphylococcus aureus*. *The Medical journal of Australia*. 1955. 42(5), 157–161. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of clinical pathology*. 1961. 14(4), 385–393.
183. Ruegg, P. L., Oliveira, L., Jin, W., & Okwumabua, O. Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. *Journal of dairy science*. 2015. 98(7). 4521–4534.

184. Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J. L., Rolain, J. M., & Blin, O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Frontiers in microbiology*. 2018. 9, 2419.
185. Salmanov, A., Ushkalov, V., Shunko, Y., Piven, N., Vygovska, L., Verner, O., Kushnirenko S. One Health: Antibiotic-Resistant Bacteria Contamination In Fresh Vegetables Sold At A Retail Markets In Kyiv. *Wiad Lek*. 2021;74(1):83-89
186. Salmanov, A., Vozianov, S., Kryzhevsky, V., Litus, O., Drozdova, A., & Vlasenko, I. Prevalence of healthcare-associated infections and antimicrobial resistance in acute care hospitals in Kyiv, *Ukraine*. *Journal of Hospital Infection*. 2019. 102(4), 431–437.
187. Salmanov, A. et all. Healthcare-associated infections in intensive care units. *Wiad. Lek* 72 (5), 963-969
188. Samia, N.I., Robicsek, A., Heesterbeek, H. *et al*. Methicillin-resistant *staphylococcus aureus* nosocomial infection has a distinct epidemiological position and acts as a marker for overall hospital-acquired infection trends. *Sci Rep* 2022.**12**, 17007
189. Schelin, J., Wallin-Carlquist,N., Cohn, M., Lindqvist, R. & Barker, C. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment, *Virulence*.2011, 2:6, 580-592.
190. Schwaber, M. J., et al. Clonal transmission of a rare methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotype between horses and staff at a veterinary teaching hospital. *Veterinary microbiology*. 2013. 162(2-4), 907-911.
191. Schwarz, S.et al. Antimicrobial Resistance among *Staphylococci* of Animal Origin. *Microbiology spectrum*. 2018. 6(4).
192. Senghore, et al. Transmission of *Staphylococcus aureus* from Humans to Green Monkeys in The Gambia as Revealed by Whole-Genome Sequencing. *Applied and environmental microbiology*.2016. 82(19), 5910–5917.

193. Senok, A., et al. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates Associated with Nasal Colonization and Environmental Contamination in Academic Dental Clinics. *Microbial Drug Resistance*. 2020.
194. Sharma, N. K., Garg, R., Baliga, S., & Bhat K, G. Nosocomial Infections and Drug Susceptibility Patterns in Methicillin Sensitive and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 2013. 7(10), 2178–2180.
195. Shiferaw, S., & Ahmad, M. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* from lactating cow's milk in Bahir Dar dairy farms. *African Journal of Microbiology Research*. 2016.10(35), 1444-1454.
196. Shorr, A. F. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clinical infectious diseases*. 2007. 45. S171-S176
197. Silva, V. et al. Diversity of methicillin-resistant staphylococci among wild *Lepus granatensis*: first detection of *mecA*-MRSA in hares. *FEMS microbiology ecology*. 2020. 96(1), fiz204.
198. Silva, V., Correia, E., Pereira, J. E., González-Machado, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* from Pets, Livestock, and Wild Animals: Relationship with Clonal Lineages and Antimicrobial Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 2022. 11(6), 772.
199. Silva, Vanessa et al. "Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Lineages in Wild Animals in Europe: A Review." *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 2020. vol. 9,3 122.
200. Singh, R., Ray, P., Das, A., & Sharma, M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010. 65(9), 1955-1958.
201. Smit, J., Søgaard, M., Schønheyder, H. C., Nielsen, H., Frøslev, T., & Thomsen, R. W. Diabetes and risk of community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia: a population-based case-control study. *European journal of endocrinology*, 2016.174(5), 631–639.

202. Smith, T.C., et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain ST398 Is Present in Midwestern U.S. Swine and Swine Workers. *Plos One*. 2009. 4(1): e4258.
203. Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T. J., & Geoghegan, J. A. Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014. 4, 171.
204. Spiliopoulou, A. I., et al. An extracellular *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide: relation to polysaccharide intercellular adhesin and its implication in phagocytosis. *BMC microbiology*. 2012. 12(1), 76.
205. Srednik, M., Crespi, E., Testorelli, M., Puigdevall, T., Pereyra, A., Rumi, M., Caggiano, N., Gulone, L., Mollerach, M., Gentilini E. First isolation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Argentina, *Veterinary and Animal Science*. 2017 Volume 7.
206. Stepanović, S., Djukić, N., Djordjević, V., & Djukić, S. Influence of the incubation atmosphere on the production of biofilm by staphylococci. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2003. 9(9), 955–958.
207. Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*. 2000. 40(2), 175-179.
208. Sutherland, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001. 147(1), 3-9.
209. Szweda, P., Schielmann, M., Milewski, S., Frankowska, A., & Jakubczak, A. Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *Polish journal of microbiology*. 2012. 61(1), 65–69.
210. Taniguchi, Y., et al. Predominance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec type II-CC5 and SCCmec type IV-CC1/CC8 among companion animal clinical isolates in Japan: Findings from phylogenetic

comparison with human clinical isolates. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2020. 20, 253–259.

211. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA J.* — 2017. — V. 15, Iss. 2. — 212 p.

212. The state of the world's antibiotics. Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. 2015. *State of the World's Antibiotics, 2015. CDDEP: Washington, D.C.* — 84 p

213. Thomas, D., Chou, S., Dauwalder, O., & Lina, G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chemical immunology and allergy*. 2007. 93. 24–41.

214. Tomlin, J., Pead, M. J., Lloyd, D. H., Howell, S., Hartmann, F., Jackson, H. A., & Muir, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 11 dogs. *The Veterinary record*. 1999. 144(3), 60–64.

215. Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr . *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*. 2015. 28(3), 603–661

216. Trakulsomboon, et al. First Report of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin in Thailand. *Journal of clinical microbiology*. 2001. 39. 591-5.

217. Traversa, A. et al. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and wild animal carcasses in Italy. *Food microbiology*. 2015. 52, 154–158

218. Ushkalov, V., Vygovska, L., Ushkalov, A., Boianovskiy, S., Hranat A., Tereshchenko, S., Davydovska, L., Vishovan, Y. A Study Of The Efficiency Of Culture Media For The Recovery Of Lyophilized Pathogenic Bacteria. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*. 2021. 12(1): 40–50.

219. V. Ushkalov, L. Vygovska, A. Salmanov, Y. Vishovan, L. Ishchenko. Determination of Pathogenicity Genes (MeC A, Fem B, Ica A, Ica D, Ica AB) in

Staphylococcus Spp World Microbe Forum 2021 20-24 June 2021 Online WorldWide <https://worldmicrobeforum.org/images/WMF/06-23-CE-Portal-Tutorial.pdf>

220. van Cleef, et al. Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Humans, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 2011.17(3), 502-505.

221. Van Duijkeren, E., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. *Emerging infectious diseases*. 2007. 13(9), 1408.

222. Vashchenko A. O., Valchuk S. I., Voronkova Yu. S., Shevchenko T. M., Voronkova O. S. Susceptibility To Antibiotics Of *Staphylococcus Aureus* Strains, Isolated From Upper Respiratory Tract Of Human . *Вісник Проблем Біології І Медицини*. 2021. Вип. 2 (160).

223. Vasileiou, N., et al. Role of staphylococci in mastitis in sheep. *The Journal of dairy research*. 2019. 86(3), 254–266.

224. Vasileiou, N., et al. Slime-producing staphylococci as causal agents of subclinical mastitis in sheep. *Veterinary microbiology*. 2018. 224, 93–99.

225. Veras, J., et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais. Brazil, *International Journal of Infectious Diseases*. 2008. 12, 4,410-415.

226. Vishovan Y., Ushkalov V. Biological properties of *Staphylococcal* animal companies. *Youth and modern problems of microbiology and virology: conference materials*, Kyiv, 2019. p 33.

227. Vishovan, Y., Ushkalov, V., Kepple, O., & Granate, A. Antimicrobial resistance and biological properties of *Staphylococci* isolated from pigs. *One Health & Risk Management*. 2020. 1(1), 58-63.

228. Vishovan, Y., Ushkalov, V., Vygovska, L., Ishchenko L., Salmanov A., Bilan A., Kalakailo L., Hranat A., Boianovskiy, S. Biofilm formation and

antibiotic resistance in staphylococcus isolated from different objects. *EUREKA: Life Sciences*. 2021. 4, 58–65

229. Vishovan, Y., Ushkalov, V., Vygovska, L., Machusky, O., Hranat A., Shaiko, A., Boianovskiy, S. Biological Properties Of Staphylococci Derived From Cats And Dogs. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*. 2020. 11(3): 56–64.

230. Vyshovan, Y., Ushkalov, V., Vygovska, L., Ishchenko L. Detection of Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in Staphylococci Isolated from Milk. *BTRP Ukraine 2022 International Biothreat Reduction Symposium*. Kyiv, Ukraine, 24-27 October 2022. abstract Kyiv,2022, p.113

231. Voronkova, O., Shevchenko, T., Vinnikov, A. Adhesive properties of film forming and non-film forming strains of Staphylococcus epidermidis, isolated from upper respiratory tract of human. *Український вісник медико-соціальної експертизи*, 2019

232. Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J. M., Yao, Y., Fischer, E. R., DeLeo, F. R., & Otto, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *Journal of Biological Chemistry*. 2004. 279(52), 54881-54886.

233. Walana, W., et al. Staphylococcus aureus nasal carriage among healthcare workers, inpatients and caretakers in the Tamale Teaching Hospital, Ghana. *Scientific African*. 2020. 8, e00325.

234. Wanig, H., Yu, Z., Gui, Z., Liu, W., Ye, S., & Chu, W. Multidrug resistance, extracellular enzymatic activity and biofilm formation of Staphylococcus aureus isolates from various animal foods in East China. *Biomedical Research*. 2020. 30(6).

235. Weese, J. S., Dick, H., Willey, B. M., McGeer, A., Kreiswirth, B. N., Innis, B., & Low, D. E. Suspected transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Veterinary microbiology*. 2006. 115(1-3), 148–155

236. Weiner-Lastinger, L., et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network 2015–2017. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2020. 41(1), 1-18.
237. Wu, S. et al. A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*. 2016. 8(7), 176.
238. Yinduo, Ji. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Protocols *Methods in Molecular Biology* Volume. 2014. 1085? X, 353
239. Zapotoczna, M., McCarthy, H., Rudkin, J. K., O'Gara, J. P., & O'Neill, E. An Essential Role for Coagulase in *Staphylococcus aureus* Biofilm Development Reveals New Therapeutic Possibilities for Device-Related Infections. *The Journal of infectious diseases*. 2015. 212(12), 1883–1893.

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України які входять до міжнародних науко метричних баз даних:

1. Вішован Ю.Ю. Дослідження на вміст *Staphylococcus spp* молока від хворих на субклінічний мастит корів. Наукові доповіді НУБіП України 2017. №6(70). *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати, сформульовано висновки та підготовлено статтю).*
2. **Вішован Ю.Ю.,** Ушкалов В.О. Поширення стафілококів та захворювань зумовлених ними. *Вісник аграрної науки.* 2018. № 2(779) 36-42 с. *(Здобувачем взято участь у аналізі літературних даних, формулюванні висновків та написанні статті).*
3. **Vishovan, Y.,** Ushkalov, V., Vygovska, L., Machuskyu, O., Hranat A., Shaiko, A., Boianovskiy, S. Biological Properties Of Staphylococci Derived From Cats And Dogs. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences.* 2020. 11(3): 56–64. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати, сформульовано висновки та підготовлено статтю).*
4. Ushkalov, V., Vygovska, L., Ushkalov, A., Boianovskiy, S., Hranat A., Tereshchenko, S., Davydovska, L., **Vishovan, Y.** A Study Of The Efficiency Of Culture Media For The Recovery Of Lyophilized Pathogenic Bacteria. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences.* 2021. 12(1): 40–50. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати, сформульовано висновки та підготовлено статтю).*

Статті у періодичних наукових виданнях інших держав

5. **Vishovan, Y.,** Ushkalov, V., Vygovska, L., Ishchenko L., Salmanov A., Bilan A., Kalakailo L., Hranat A., Boianovskiy, S. Biofilm formation and antibiotic resistance in staphylococcus isolated from different objects. *EUREKA: Life Sciences*. 2021. 4, 58–65. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати, сформульовано висновки та підготовлено статтю).*

6. **Vishovan, Y.,** Ushkalov, V., Kepple, O., & Granate, A. Antimicrobial resistance and biological properties of Staphylococci isolated from pigs. *One Health & Risk Management*. 2020. 1(1), 58-63. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати, сформульовано висновки та підготовлено статтю).*

Патенти України на корисну модель:

7. **Вішован Ю. Ю.,** Виговська Л. М., Ушкалов В. О. Данчук В. В. Патент України на корисну модель u201903914. МПК: A61K 39/085 (2006.01) Коагулазопозитивний штам *Staphylococcus aureus* з множинною стійкістю до антибіотиків для виготовлення діагностичних та імунобіологічних препаратів № 141004: заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. Заявлено 15. 04. 2019 опубліковано 25.03.2020, бюл. № 6/2020.

(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, проаналізовано отримані результати та підготовлено документацію).

8. Виговська Л. М., Ушкалов В. О., Данчук В. В., **Вішован Ю. Ю.,** Ушкалов А. В. Патент України на корисну модель u201907865. МПК: (2006): A61K 39/02 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01), C12Q 1/00, C12R 1/00 Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів (*Listeria, Salmonella, Yersinia, Staphylococcus, Escherichia* тощо), придатних до використання в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) як позитивних контролей № 141068: заявник і патентовласник Національний

університет біоресурсів і природокористування України. Заявлено 11. 07. 2019 опубліковано 25.03.2020, бюл. № 6/2020. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, взято участь у написанні текстової частини та підготовлено документацію).*

Методичні рекомендації:

9. Виговська Л. М., Іщенко Л. М., Ушкалов В. О., Данчук В. В., Мідик С. В., Кепл О. Ю., Калакайло Л. І., **Вішован Ю. Ю.**, Ушкалов А. В., Гранат А. В., Терещенко С. А., Давидовська Л. О., Бояновський С. О., Довбня Ю. Ю. Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів: [методичні рекомендації]. Київ, 2019. 36 с. *(Затверджено Вченою радою Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК протокол № 13 від 27.11.2019 р.) (Здобувачем взято участь у написанні текстової частини).*

Тези наукових доповідей:

10. **Vishovan Y.**, Ushkalov V. Biological properties of *Staphylococcal* animal companies. Youth and modern problems of microbiology and virology: conference materials, Kyiv, 2019. p 33. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, взято участь у написанні тез).*

11. **Вішован Ю. Ю.**, Ушкалов В. О., Виговська Л. М. Поширення мікроорганізмів роду *Staphylococcus* серед клінічно здорових свиней. Актуальні інфекційні захворювання. Сучасні аспекти клініки, діагностики, лікування та профілактики: між нар. наук-практ. конф.: тези доп., Київ, 2019. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, взято участь у написанні тез).*

12. V. Ushkalov, L. Vygovska, A. Salmanov, **Y. Vishovan**, L. Ishchenko. Determination of Pathogenicity Genes (MeC A, Fem B, Ica A, Ica D, Ica AB) in *Staphylococcus* Spp World Microbe Forum 2021 20-24 June 2021 Online WorldWide <https://worldmicrobeforum.org/images/WMF/06-23-CE-Portal->

Tutorial.pdf *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, взято участь у написанні тез).*

13. **Vyshovan Y.**, Ushkalov V., Vygovska L., Ishchenko L. Detection of Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in Staphylococci Isolated from Milk. BTRP Ukraine 2022 International Biothreat Reduction Symposium. Kyiv, Ukraine, 24-27 October 2022. abstract Kyiv,2022, p.113*(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, взято участь у написанні тез).*

ДОДАТОК Б

Таблиця Б.1 Культуральні та ферментативні властивості *Staphylococcus spp.* виділених з молока.

№ ізоляту	Досліджувані властивості					
	Ката-лаза	Леци- тиназа	Гемоліз	Плазмо- коагуляція	Маніто- сольовий агар	Колір колоній на агарі з кристалічним фіолетовим
1	2	3	4	5	6	7
101	+	-	-	-	-	Білі
103	+	-	-	-	-	Білі
104	+	-	-	-	-	Білі
105	+	+	+	-	+	Сині
107	+	-	-	-	+	Сині
108	+	-	-	-	+	Сині
110	+	+	+	-	+	Сині
111	+	-	-	-	-	Сині
112	+	+	-	-	+	Білі
113	+	+	-	-	-	Білі
114	+	-	-	-	-	Білі
115	+	+	-	-	+	Сині
116	+	-	-	-	-	Сині
117	+	-	-	-	-	Білі
118	+	-	-	-	-	Сині

Продовження таблиці Б.1.

119	+	+	-	-	+	Білі
120	+	-	-	-	-	Білі
121	+	+	+	-	-	Білі
122	+	-	-	-	-	Білі
123	+	+	+	-	+	Білі
124	+	-	-	-	-	Білі
125	+	-	-	-	-	Білі
127	+	-	-	-	-	Білі
128	+	+	+	-		Сині
129	+	-	-	-	-	Білі
130	+	+	-	-	+	Білі
131	+	-	-	-	-	Білі
132	+	-	-	-	-	Сині
133	+	+	+	+	+	Сині
134	+	-	-	-	-	Білі
135	+	-	-	-	-	Сині
136	+	+	+	+	+	Сині
137	+	-	-	-	-	Білі
138	+	-	-	-	-	Сині
139	+	+	-	-	+	Сині

Примітка: «+» - реакція позитивна, «-» - реакція негативна, «Білі» - колір колоній.

ДОДАТОК В

Таблиця В.1. Зони затримки росту культур стафілококів від корів мм

Назва препарату	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту культур стафілококів від корів мм															
		101	103	104	105	107	108	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Пеніциліни																	
Бензилпеніцилін	26>s; 26<r	24	23	32	20	24	19	21	22	19	25	16	26	11	22	31	22
Оксацилін	18>s; 18<r	6	12	6	19	14	14	12	6	14	11	6	10	13	10	13	6
Ампіцилін	13>s; 10<r 18>s; 17<r	28	30	30	30/22	30	24	30	28	28	30	23	27	14	23	28	23
Аміноглікозиди, Макроліди, Тетрацикліни																	
Гентаміцин	18>s; 18<r 22>s; 22<r	-	-	-	-	23	-	23	-	-	-	-	20	16	-	22	-
Тобраміцин	18>s; 18<r	30	26	30	28	25	27	25	25	28	30	27	22	20	25	21	24
Еритроміцин	21>s; 17<r	25	30	34	28	20	24	10	28	66	10	6	6	6	28	19	27
Тетрациклін	22>s; 19<r	23	23	26	30	27	26	30	23	23	17	10	11	31/10	22	25	21
Доксициклін	16>s; 12<r	22	20	20	23	26	23	28	21	24	17	10	10	10	21	24	20

Примітка. 15>s; 15<r більше 15 штам чутливий, менше 15 штам стійкий; «6» - мінімальний розмір диску з антибіотиками штам резистентний; «*» - наявність росту окремих колоній у зоні інгібіції росту, штам резистентний; «-» - чутливість штаму не досліджувалась; «14/11» - суцільний ріст резистентних колоній в проміжку діаметрів зони інгібіції від 14 мм до 11 мм.

Продовження таблиці В.1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Фторхінолони																	
Норфлуксацин	20>s; 20<r 24>s; 24<r	20	19	25	22	22	21	24	25	20	24	6	23	12 *	20	20	12
Ципрофлуксацин	21>s; 21<r 24>s; 24<r	26	24	30	30	29	30	30	30	23	30	15	30	29/10	25	23	24
Інші																	
Хлорамфенікол	18>s; 18<r	27	28	30	25	26	24	28	30	22	29	6	26	10	24	22	26
Фузидієва кислота	24>s; 24<r	27	24	28	30	16	23	10	27	15	27	25	13	30	24	25	22
Ванкоміцин	15>s; 15<r	23	22	26	20	18	19	21	21	19	23	21	16	18	21	13	23

Примітка. 15>s; 15<r більше 15 штам чутливий, менше 15 штам стійкий; «б» - мінімальний розмір диску з антибіотиками штам резистентний; «*» - наявність росту окремих колоній у зоні інгібіції росту, штам резистентний; «-» - чутливість штаму не досліджувалась; «14/11» - суцільний ріст резистентних колоній в проміжку діаметрів зони інгібіції від 14 мм до 11 мм.

Продовження таблиці В.1.

Назва препарату	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту культур стафілококів від корів мм																		
		120	121	122	123	124	125	127	128	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Пеніциліни																				
Бензилпеніцилін	26>s; 26<r	33	6	25	10	21	25	25	24	22	30	25	6	22	32	12	28	30	15	29
Оксацилін	18>s; 18<r	16	23	6	22	6	6	6	19	6	16	6	6	13	14	19	18	15	17	19
Ампіцилін	13>s; 10<r 18>s; 17<r	29	13	30	16	27	19*	25	29	23	30	30	6	26	28	10	30	31	30	28
Аміноглікозиди, Макроліди, Тетрацикліни																				
Гентаміцин	18>s; 18<r 22>s; 22<r	18	20	-	-	-	-	22	-	-	20	-	18	-	20	15	20	21	-	-
Тобраміцин	18>s; 18<r	21	22	30	25	26	26	21	24	23	21	30	19	30	21	18	22	19	30	26
Еритроміцин	21>s; 17<r	17	6	22	24	24	27	26	26	27	19	26	18	13	21	20	20	20	20	24
Тетрациклін	22>s; 19<r	19	23	13	14	22	20	23	25	24	26	20	6	25	28	22	24	23	27	25
Доксициклін	16>s; 12<r	24	21	13	15	18	20	21	23	22	23	20	12	23	30	23	25	25	30	25

Примітка. 15>s; 15<r більше 15 штам чутливий, менше 15 штам стійкий; «6» - мінімальний розмір диску з антибіотиками штам резистентний; «*» - наявність росту окремих колоній у зоні інгібіції росту, штам резистентний; «-» - чутливість штаму не досліджувалась; «14/11» - суцільний ріст резистентних колоній в проміжку діаметрів зони інгібіції від 14 мм до 11 мм.

Продовження таблиці В.1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Фторхінолони																				
Норфлоксацин	20>s; 20<r 24>s; 24<r	22	24	23	26	21	24	21	22	19	25	24	9	22	23	23	24	19	30	21
Ципрофлоксацин	21>s; 21<r 24>s; 24<r	25	28	30	30	30	32	25	27	20	30	30	15	24	24	30	28	23	30	22
Інші																				
Хлорамфенікол	18>s; 18<r	20	6	28	25	29	25	23	24	23	23	30	23	23	22	23	24	24	30	25
Фузидієва кислота	24>s; 24<r	21	27	27	30	23	26	22	26	24	30	26	28	22	24	22	26	26	25	26
Ванкоміцин	15>s; 15<r	15	19	22	18	25	22	24	23	22	16	25	15	26	16	17	16	16	25	22

Примітка. 15>s; 15<r більше 15 штам чутливий, менше 15 штам стійкий; «б» - мінімальний розмір диску з антибіотиками штам резистентний; «*» - наявність росту окремих колоній у зоні інгібіції росту, штам резистентний; «-» - чутливість штаму не досліджувалась; «14/11» - суцільний ріст резистентних колоній в проміжку діаметрів зони інгібіції від 14 мм до 11 мм.

ДОДАТОК Г

Таблиця Г.1. Кількість досліджених культур *Staphylococcus spp* виділених від свиней свиногомплексу №1.

Назва антибіотика	Кількість досліджених культур <i>Staphylococcus spp</i>							
	Коагулазопозитивних				Коагулазонегативних			
	Чутливі	Помірно стійкі	Резистентні	Всього	Чутливі	Помірно стійкі	Резистентні	Всього
Пеніциліни								
Бензилпеніцилін	0	0	18	18	7	0	18	25
Оксацилін	30	1	2	33	25	0	0	25
Ампіцилін	0	0	14	14	3	0	20	23
Аміноглікозиди								
Гентаміцин	13	0	1	14	12	0	13	25
Тобраміцин	14	0	0	14	23	0	2	25
Макроліди								
Еритроміцин	29	2	2	33	21	2	2	25
Тетрацикліни								
Тетрациклін	10	0	11	21	20	3	2	25
Доксицилін	6	4	4	14	23	1	1	25

Продовження таблиці Г.1.

Лінкозаміди								
Лінкоміцин	1	0	12	13	21	0	4	25
Кліндаміцин	18	0	13	31	24	1	0	25
Фторхінолони								
Норфлоксацин	0	0	27	27	1	1	23	25
Ципрофлоксацин	0	0	15	15	5	0	20	25
Офлоксацин	1	0	20	21	7	0	18	25
Пефлоксацин	3	6	1	10	7	6	12	25
Ломефлоксацин	1	1	13	15	4	2	19	25
Левефлоксацин	1	0	14	15	2	0	23	25
Спарфлоксацин	1	0	32	33	11	0	14	25
Гатіфлоксацин	0	2	13	15	6	12	7	25
Інші								
Хлорамфенікол	37	0	0	37	24	1	0	25

ДОДАТОК Д

Таблиця Д.1 Діаметри інгібіції росту культур стафілококів від свиней свиногомплексу №1.

Назва препарату	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту штамів стафілококів від свиней свиногомплексу №1, мм									
		1	2	3	4	5	6	8	9	10	11
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Пеніциліни											
Бензилпеніцилін	26>s; 26<r	7	19	6	6	6	6	12	13	15*	14*
Оксацилін	18>s; 18<r	21	22	20	20	-	23	21	24	21	-
Ампіцилін	13>s; 10<r 18>s; 17<r	15	24	16	16	-	-	-	13	14	-
Аміноглікозиди, Макроліди, Тетрацикліни, Лінкозаміди											
Гентаміцин	18>s; 18<r 22>s; 22<r	20	30/23	24/21*	-	21	20	-	20	-	19
Тобраміцин	18>s; 18<r	22	33/25	29/22	-	24	18	-	26	-	26
Еритроміцин	21>s; 17<r	-	26	-	23	24	-	24	22	22	26
Тетрациклін	22>s; 19<r	-	20	23	24	23	26	23	25	24	25
Доксициклін	16>s; 12<r	10	27	23	23	22	-	-	24	25	23
Лінкоміцин	21>s; 17<r	-	24	22	17	-	15	-	25	-	-
Кліндаміцин	22>s; 19<r	25	22	30/25	28/25	29/26	28	25	29/24	22	25
Фторхінолони											
Норфлуксацин	20>s; 20<r 24>s; 24<r	6	27/18	6	6	6	21	-	6	6	6
Ципрофлуксацин	21>s; 21<r 24>s; 24<r	16/12	26/14	15	11	11	30	-	17*	14	12
Офлуксацин	16>s; 12<r	20	33/26	14	1/13	16/11	-	10	19	10	15

Продовження таблиці Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Пефлоксацин	22>s; 15<r	21	28	17	18	16	22	6	12	22	15
Ломефлоксацин	22>s; 18<r	-	24	6	-	6	6	6	6	6	6
Левовфлоксацин	22>s; 22<r 24>s; 24<r	14	22	14	16/9	15	20	15/12	13	-	-
Спарфлоксацин	19>s; 15<r	-	27	6	9	6	25	6	10*	12	6
Гатіфлоксацин	18>s; 14<r	15	28	13	13	12	-	13	14*	15	11
Інші											
Хлорамфенікол	18>s; 18<r	19	22	20	22	23/20	22	20	20/10	19	20

Примітка. 15>s; 15<r більше 15 штам чутливий, менше 15 штам стійкий; «6» - мінімальний розмір диску з антибіотиками штам резистентний; «*» - наявність росту окремих колоній у зоні інгібіції росту, штам резистентний; «-» - чутливість штаму не досліджувалась; «14/11» - суцільний ріст резистентних колоній в проміжку діаметрів зони інгібіції від 14 мм до 11 мм.

Продовження таблиці Д.1

Назва препарату	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту штамів стафілококів від свиней свиногомплексу №1, мм									
		12	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Пеніциліни											
Бензилпеніцилін	26>s; 26<r	17	30	16	34	16*	18*	18	21	16*	12
Оксацилін	18>s; 18<r	26	24	27	26	23	-	-	28	9	20
Ампіцилін	13>s; 10<r 18>s; 17<r	-	36	17	14	12	15	17	16	16	17
Аміноглікозиди, Макроліди, Тетрацикліни, Лінкозаміди											
Гентаміцин	18>s; 18<r 22>s; 22<r	19	33	26	16	22	25	20	26	27	12
Тобраміцин	18>s; 18<r	26	32	12	17	24	30	26	29	24*	20*
Еритроміцин	21>s; 17<r	-	28	24	20	26	25	25	26	26	10*
Тетрациклін	22>s; 19<r	-	30	25	28	10	28	24	20	6	9
Доксициклін	16>s; 12<r	14	32	22	25	12	-	25	22	6	6
Лінкоміцин	21>s; 17<r	-	30	24	12	6	-	-	25	6	6
Кліндаміцин	22>s; 19<r	32	31	30	19	25	22	26	29	12	16
Фторхінолони											
Норфлуксацин	20>s; 20<r 24>s; 24<r	6	25	6	14	6	6	6	6	6	6

Продовження таблиці Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ципрофлоксацин	21>s; 21<r 24>s; 24<r	13	30	14	31	15	13	15*	13	16	15
Офлоксацин	16>s; 12<r	16	27	11	32	13	12	12	13	15	12
Пефлоксацин	22>s; 15<r	-	24	6	30	15	16	16	13	-	-
Ломефлоксацин	22>s; 18<r	6	23	6	24	6	-	6	6	6	6
Левовфлоксацин	22>s; 22<r 24>s; 24<r	17	27	11/9	28	15	-	14	16	-	-
Спарфлоксацин	19>s; 15<r	6	28	6	28	6	6	6	6	-	6
Гатіфлоксацин	18>s; 14<r	10	25	6	28	14	11	10	13/10	14*	11
Інші											
Хлорамфенікол	18>s; 18<r	23	27	21	22	25	23	25	26	22	26

Примітка. 15>s; 15<r більше 15 штам чутливий, менше 15 штам стійкий; «б» - мінімальний розмір диску з антибіотиками штам резистентний; «*» - наявність росту окремих колоній у зоні інгібіції росту, штам резистентний; «-» - чутливість штаму не досліджувалась; «14/11» - суцільний ріст резистентних колоній в проміжку діаметрів зони інгібіції від 14 мм до 11 мм.

Продовження таблиці Д.1

Назва препарату	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту штамів стафілококів від свиней свиногомплексу №1, мм									
		23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Пеніциліни											
Бензилпеніцилін	26>s; 26<r	-	9	-	30	26	-	25	24	20	15
Оксацилін	18>s; 18<r	19	-	19	22	25	-	22	23	34	17
Ампіцилін	13>s; 10<r 18>s; 17<r	12	15	14	34	14	17	15	10	14	17
Аміноглікозиди, Макроліди, Тетрацикліни, Лінкозаміди											
Гентаміцин	18>s; 18<r 22>s; 22<r	-	-	28/18	25	32	-	30	29	30	26
Тобраміцин	18>s; 18<r	-	-	29	22	28	-	24*	28	28	23
Еритроміцин	21>s; 17<r	24	30	12*	23	24	30	34	26	26	-
Тетрациклін	22>s; 19<r	8	11	13	25	21	20	19	11/7	38	12
Доксициклін	16>s; 12<r	11	15	15	28	18	-	18	11	40	14
Лінкоміцин	21>s; 17<r	6	6	16	18	23	6	22	21	28	6
Кліндаміцин	22>s; 19<r	10	17	23	22	25	16	25	25	32	18
Фторхінолони											
Норфлоксацин	20>s; 20<r 24>s; 24<r	6	-	10	6	6	6	6	6	6	6

Продовження таблиці Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ципрофлоксацин	21>s; 21<r 24>s; 24<r	14	15	15	17	17	17	18	16	16	-
Офлоксацин	16>s; 12<r	15	14	17	20	19	11	14	15	14	15
Пефлоксацин	22>s; 15<r	-	-	-	22	22	-	20	21	14	-
Ломефлоксацин	22>s; 18<r	-	9	-	18	16	19*	9	15	11	9
Левовфлоксацин	22>s; 22<r 24>s; 24<r	18	18	23	23	17	17	20	19	19	18
Спарфлоксацин	19>s; 15<r	6	6	14	21	11	-	14	14	13	11
Гатіфлоксацин	18>s; 14<r	-	11	-	25/20	16	12	19	19	12	12
Інші											
Хлорамфенікол	18>s; 18<r	24	30	24	25	34	34	30	30	31	22

Примітка. 15>s; 15<r більше 15 штам чутливий, менше 15 штам стійкий; «б» - мінімальний розмір диску з антибіотиками штам резистентний; «*» - наявність росту окремих колоній у зоні інгібіції росту, штам резистентний; «-» - чутливість штаму не досліджувалась; «14/11» - суцільний ріст резистентних колоній в проміжку діаметрів зони інгібіції від 14 мм до 11 мм.

Продовження таблиці Д.1

Назва препарату	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту штамів стафілококів від свиней свиногомплексу №1, мм									
		33	34	35	36	37	38	39	41	42	43
Пеніциліни											
Бензилпеніцилін	26>s; 26<r	-	-	29	18	-	18	-	-	15	22
Оксацилін	18>s; 18<r	29	10	21	30	30	30	24	20	18	28
Ампіцилін	13>s; 10<r 18>s; 17<r	-	-	17	15	-	17	17	-	-	16
Аміноглікозиди, Макроліди, Тетрацикліни, Лінкозаміди											
Гентаміцин	18>s; 18<r 22>s; 22<r	-	-	26	23	30	20	29	-	-	19
Тобраміцин	18>s; 18<r	-	-	25*	26	30	28	21	-	-	25
Еритроміцин	21>s; 17<r	30	30	30	22	-	25	22	18	20	30
Тетрациклін	22>s; 19<r	-	14	22	26	-	30	12	-	-	23
Доксициклін	16>s; 12<r	-	-	26	32	-	30	-	-	-	22
Лінкоміцин	21>s; 17<r	-	15	22	28	17	28	6	-	-	18
Кліндаміцин	22>s; 19<r	22	22	22	36	30	35	16	24	19	22
Фторхінолони											
Норфлуксацин	20>s; 20<r 24>s; 24<r	19	18	6	6	6	6	6	6	6	13
Ципрофлуксацин	21>s; 21<r 24>s; 24<r	-	-	18	16	-	16	-	-	-	19
Офлуксацин	16>s; 12<r	12	10	30	15	10	15	-	11	-	13
Пефлуксацин	22>s; 15<r	-	-	21	16	-	17	-	-	-	13
Ломефлуксацин	22>s; 18<r	-	-	14	14	-	24	23	11	-	15
Левовфлуксацин	22>s; 22<r 24>s; 24<r	-	-	23	18	-	18	-	15	13	-
Спарфлуксацин	19>s; 15<r	6	10	13	10	-	10	13	9	13	28
Гатіфлуксацин	18>s; 14<r	-	-	16	17	-	17	-	-	-	13
Інші											
Хлорамфенікол	18>s; 18<r	-	30	32	30	-	31	28	19	20	30

Продовження таблиці Д.1

Назва препарату	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту штамів стафілококів від свиней свиногомплексу №1, мм										
		44	45	46	47	50	51	52	53	54/1	54/2	55
Пеніциліни												
Бензилпеніцилін	26>s; 26<r	-	40	38	-	-	20	-	25	-	-	12
Оксацилін	18>s; 18<r	22	28	27	19	22	27	21	21	17	17	12
Ампіцилін	13>s; 10<r 18>s; 17<r	-	15	17	-	-	17	-	16			
Аміноглікозиди, Макроліди, Тетрацикліни, Лінкозаміди												
Гентаміцин	18>s; 18<r 22>s; 22<r	-	20	21	-	-	21	-	20	-	-	-
Тобраміцин	18>s; 18<r	-	26	24	-	-	23	-	24	-	-	-
Еритроміцин	21>s; 17<r	25	30	26	24	22	20	20	25	19	22	22
Тетрациклін	22>s; 19<r	18	23	22	16	-	20	-	19	16	-	-
Доксициклін	16>s; 12<r	-	22	21	-	-	21	-	20	-	-	-
Лінкоміцин	21>s; 17<r	-	21	22	-	-	22	-	21	-	-	-
Кліндаміцин	22>s; 19<r	28	30	29	25	18	31	25	24	12	12	15
Фторхінолони												
Норфлуксацин	20>s; 20<r 24>s; 24<r	6	15	16	-	-	16	-	6	-	-	-
Ципрофлуксацин	21>s; 21<r 24>s; 24<r	-	24	25	-	-	26	-	11	-	-	-
Офлуксацин	16>s; 12<r	-	15	12	-	-	8	-	16	-	-	-
Пефлуксацин	22>s; 15<r	-	23	24	-	-	12	-	14	-	-	-
Ломефлуксацин	22>s; 18<r	-	19	20	-	-	14	-	15	-	-	-
Левовфлуксацин	22>s; 22<r 24>s; 24<r	-	19	21	-	-	19	-	17	-	-	-
Спарфлуксацин	19>s; 15<r	15	26	26	6	14	25	11	6	12*	10	14
Гатіфлуксацин	18>s; 14<r	-	17	17	-	-	16	-	13	-	-	-
Інші												
Хлорамфенікол	18>s; 18<r	21	30	28	23	22	26	20	22	18	21	22

Продовження таблиці Д.1

Назва препарату	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту штамів стафілококів від свиней свиногомплексу №1, мм												
		56	57	58	59	61	62	63	64	65	68	69	70	72
Пеніциліни														
Бензилпеніцилін	26>s; 26<r	-	28	-	26	25	26	-	-	25	-	-	-	24
Оксацилін	18>s; 18<r	20	24	24	24	22	20	25	23	24	21	24	24	22
Ампіцилін	13>s; 10<r 18>s; 17<r	-	15	-	-	-	15	-	-	14	-	-	-	-
Аміноглікозиди, Макроліди, Тетрацикліни, Лінкозаміди														
Гентаміцин	18>s; 18<r 22>s; 22<r	-	20	-	20	-	21	-	-	21	-	-	-	21
Тобраміцин	18>s; 18<r	-	24	-	22	-	22	-	-	20	-	-	-	20
Еритроміцин	21>s; 17<r	25	17	22	15	23	-	25	23	23	23	26	23	23
Тетрациклін	22>s; 19<r	-	22	-	22	-	20	-	-	22	-	-	-	-
Доксициклін	16>s; 12<r	-	24	-	23	-	21	-	-	22	-	-	-	-
Лінкоміцин	21>s; 17<r	-	15	-	22		14			23				21
Кліндаміцин	22>s; 19<r	-	30	-	25	-	25	-	-	24	-	-	-	24
Фторхінолони														
Норфлуксацин	20>s; 20<r 24>s; 24<r	-	12	6	6	10*	6	-	14	15	6	6	-	10
Ципрофлуксацин	21>s; 21<r 24>s; 24<r	-	18	-	15	-	16	-	-	15	-	-	-	13
Офлуксацин	16>s; 12<r	-	14	-	15	-	12	-	-	14	-	-	-	6
Пефлуксацин	22>s; 15<r	-	14	-	13	-	13	-	-	13	-	-	-	12
Ломефлуксацин	22>s; 18<r	-	15	-	16	-	16	-	-	15	-	-	-	14
Левофлуксацин	22>s; 22<r 24>s; 24<r	-	20	-	18	-	18	-	-	16	-	-	-	18
Спарфлуксацин	19>s; 15<r	13	19	11	19	13	12	14	11	21	11*	-	-	15
Гатіфлуксацин	18>s; 14<r	-	17	-	16	-	11	-	-	17	-	-	-	16
Інші														
Хлорамфенікол	18>s; 18<r	18	24	23	20	20	24	23	22	22	21	69	20	22

Додаток Е

Таблиця Е.1. Діаметри інгібіції росту культур виділених від котів мм.

Назва АБП	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту культур виділених від котів мм.													
		17	18	20	22	26	27	28	29	30	31	37	40	41	46
Пеніциліни															
P	26>s; 26<r	6	30	30	10*	20	22	32	32	6	35	35	35	30	30
OX	13>s; 10<r 18>s; 17<r	6	20	18	16	10	6	20	24	6	21	21	19	20	16
AMP	18>s; 17<r	6	32	32	15*	28	28	29	30	6	30	31	30	29	28
Аміноглікозиди, Макроліди															
GEN	18>s; 18<r 22>s; 22<r	13	26	25	27	24	28	25	23	20	26	21	22	26	19
TOB	18>s; 18<r	18	28	25	28	25	25	23	26	20	23	24	25	27	19
E	21>s; 17<r	6	30	28	26	10	10	27	30	6	26	25	27	26	12
Тетрацикліни															
TE	22>s; 19<r	10	29	20	30	22	23	18	30	17	30	24	27	30	23/10
DO	16>s; 12<r	14	30	30	30	24	25	20	27	14	30	27	30	30	23/10
Фторхінолони															
NX	20>s; 20<r 24>s; 24<r	16*	28	20	25	20	20	24	28	20	26	26	26	29	23
CIP	21>s; 21<r 24>s; 24<r	22*	32	20	27	26	25	32	32	24	28	26	30	30	28*
LE	22>s; 22<r 24>s; 24<r	24	32	29	30	28	28	30	26	24	28	28	29	30	25*
Інші															
C	18>s; 18<r	6	28	30	28	26	17	28	25	24	25	25	23*	30	19
FC	24>s; 24<r	25	30	20	29	21	21	28	30	6	28	29	29	30	24

Примітка. Р - Бензилпеніцилін; ОХ - Оксацилін; АМР - Ампіцилін; GEN - Гентаміцин; ТОВ - Тобраміцин; Е - Еритроміцин; ТЕ - Тетрациклін; DO - Доксиклін; NX - Норфлоксацин; СІР - Ципрофлоксацин; LE - Левофлоксацин; С - Хлорамфенікол; FC - Фузидієва кислота

Таблиця Е.2. Діаметри інгібіції росту культур стафілококів виділених від собак мм.

Назва АБП	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту культур виділених від собак мм.										
		19	21	23	25	33	35	36	38	39	42	43
Пеніциліни												
P	26>s; 26<r	30	30	6	6	22	19	20	6	30	30	30
OX	13>s; 10<r 18>s; 17<r	21	20	14	14	18	6	19/10	6	19	20	21
AMP	18>s; 18<	28	32	6	6	30	25	25	6	29	32	32
Аміноглікозиди, Макроліди												
GEN	18>s; 18<r 22>s; 22<r	24	23	23	22	16	22	23	21	22	24	26
TOB	18>s; 18<r	23	24	25	26	20	25	25	20	27	24	28
E	21>s; 17<r	24	24	22	6	22	22	26	10	27	17	22
Тетрацикліни												
TE	22>s; 19<r	30*	26	14	25	30	10	30	20	30	28	26
DO	16>s; 12<r	30/13	29	17	27	30	11	30	27/21	30	26	28
Фторхінолони												
NX	20>s; 20<r 24>s; 24<r	27*	26	24	25	25	6	26	6	28	26	29
CIP	21>s; 21<r 24>s; 24<r	30*	30	25*	28	30	6	28	6	30	28	30
LE	22>s; 22<r 24>s; 24<r	32*	30	26	30	32	6	26	15	32	28	30
Інші												
C	18>s; 18<r	28*	27	24	6	25	6	25	15*	30	27	27
FC	24>s; 24<r	25/20	28	25*	26*	16	12	30	21	30	30	32

Примітка. 15>s; 15<r більше 15 штам чутливий, менше 15 штам стійкий; «б» - мінімальний розмір диску з антибіотиками штам резистентний; «*» - наявність росту окремих колоній у зоні інгібіції росту, штам резистентний; «-» - чутливість штаму не досліджувалась; «14/11» - суцільний ріст резистентних колоній в проміжку діаметрів зони інгібіції від 14 мм до 11 мм. Р- Бензилпеніцилін; ОХ - Оксацілін; АМР - Ампіцилін; GEN - Гентаміцин; ТОВ - Тобрамідин; Е - Еритроміцин; ТЕ - Тетрациклін; ДО - Доксидин; NX - Норфлоксацин; СІР - Ципрофлоксацин; LE - Левофлоксацин; С - Хлорамфенікол; FC - Фузидієва кислота

Додаток Є

Таблиця Є.1. Діаметр зони затримки росту коагулазопозитивних культур стафілококів виділених від людей мм.

Назва АБП	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту мм.										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Пеніциліни												
Бензилпеніцилін	26>s; 26<r	16	6	18	30	33	29	6	32	6	26	28
Ампіцилін	18>s; 18<r	20	15 *	20	32	32	28	6	29	9	25	28
Оксацилін	13>s; 10<r 18>s; 17<r	19	13 *	21	22	20	18	15	20	14	20	19
Фторхінолони												
Норфлоксацин	20>s; 20<r 24>s; 24<r	22	21	26	28	23	19	19	19	19	19	22
Ципрофлоксацин	21>s; 21<r 24>s; 24<r	23	25	30	30	25	21	21	21	21	22	24
Аміноглікозиди												
Гентаміцин	18>s; 18<r 22>s; 22<r	24	25	29	24	20	21	14	20	16	20	21
Тобраміцин	18>s; 18<r	22	24	32	28	22	24	18	22	18	20	22
Макроліди												
Еритроміцин	21>s; 18<r	24	17	20	23	22	23	15	24	18	20	20
Лінкоміцин	21>s; 17<r	22	8	26	21	23	20	21	26	22	23	24
Тетрацикліни												
Тетрациклін	22>s; 19<r	23	27	30	26	25	23	19	23	20	21	20
Доксициклін	16>s; 12<r	26	29	29	26	24	25	19	25	24	27	25
Інші												
Хлорамфенікол	18>s; 18<r	28	17	32	28	26	25	20	24	18	22	26
Фузі дієва кислота	24>s; 24<r	26	18	24	26	26	24	22	25	22	25	27
Ванкоміцин	15>s; 15<r	17	23	21	19	18	19	16	17	15	18	20

Таблиця Є.2. Діаметр зони затримки росту коагулазонегативних культур стафілококів виділених від людей мм.

Назва антибіотика	Інтерпретація EUCAST та МВ МОЗ України 2007	Зони затримки росту коагулазонегативних культур стафілококів виділених від людей мм.							
		12	13	14	15	16	17	18	19
Пеніциліни									
Бензилпеніцилін	26>s; 26<r	6	16	6	6	16	6	16	6
Ампіцилін	18>s; 18<r	19	15	10	10	23	20	16	13
Оксацилін	13>s; 10<r 18>s; 17<r	6	13	6	21*	23	6	19	6
Фторхінолони									
Норфлуксацин	20>s; 20<r 24>s; 24<r	6	16	6	22	22	6	24	6
Ципрофлуксацин	21>s; 21<r 24>s; 24<r	12	25	6	25	28	10	23	6
Аміноглікозиди									
Гентаміцин	18>s; 18<r 22>s; 22<r	20	16	6	26	29	6	25	10
Тобраміцин	18>s; 18<r	22	22	6	22	27	6	22	12
Макроліди									
Еритроміцин	21>s; 18<r	19	19	6	18	24	20	22	6
Лінкоміцин	21>s; 17<r	22	25	6	19	25	23	27	14
Тетрацикліни									
Тетрациклін	22>s; 19<r	30	20	17*	21	28	15	25	11
Доксициклін	16>s; 12<r	30	30	19*	15	30	22	26	11
Інші									
Хлорамфенікол	18>s; 18<r	23	24	21	20	30	22	24	8
Фузі дієва кислота	24>s; 24<r	26	25	11	22	29	10	30	30
Ванкоміцин	15>s; 15<r	19	18	22	19	20	18	22	18

ДОДАТОК Ж

 <p align="center">НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ</p> <p align="center">УКРАЇНЬСЬКА ЛАБОРАТОРІЯ ЯКОСТІ І БЕЗПЕКИ ПРОДУКЦІЇ АГРОПРОМИСЛОВОГО КОМПЛЕКСУ</p>	
<p>Фактична адреса: вул. Машинобудівників, 7, смт Чабани, Києво-Святошинський р-н, Київська обл., 08162, Україна.</p> <p>Юридична адреса: вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна.</p>	<p>Тел.: +38 (044) 5264503, Факс: +38 (044) 5264504 E-mail: info@quality.ua, Web: http://www.quality.ua/</p>
<p align="center">ПАСПОРТ № 101</p> <p align="center">від " 10 " липня 2018 р.</p>	
<p>1. Видова назва мікроорганізму: <u>Staphylococcus aureus</u></p>	
<p>2. Позначення штаму: <u>St -2017/1</u></p>	
<p>3. Родовід штаму: _____</p>	
<p>4. Спосіб одержання штаму (ким, коли і де було виділено): <u>УЛЯБП АПК</u></p>	
<p>5. Хто і де ідентифікував штаму: <u>Вішован Ю.Ю., Воробьова А.В., УЛЯБП АПК</u></p>	
<p>6. Культурно-морфологічні та фізіологічно-біологічні особливості штаму: <u>грампозитивні коки</u></p> <p>МПА –білі випуклі колонії; ЖСА – жовто-білі колонії, оточені райдужною оболонкою; Вісмут- сульфіт агар – ріст відсутній; SS-агар – ріст відсутній; Ендо – ріст відсутній; Коагулаза плазми – позитивна</p>	
<p>7. Відомості про патогенність (безпечність) штаму (для людини, тварин, рослин тощо): <u>3-4 група</u></p>	
<p>8. Особливі властивості штаму (в т.ч. продукт, що синтезується штамом): _____</p>	
<p>9. Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму: <u>БПА, ЖСА, МПА, МПБ</u></p>	
<p>10. Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму: <u>В ліофільному стані за температури - 70±10°C 1 рік На напіврідкому агарі під вазелиновим маслом – 3 місяці</u></p>	
<p>11. Дата, номер останнього пасажування: <u>20.06.2018</u></p>	
<p>12. Дата останньої перевірки підтвердження штаму: <u>05.07.2018</u></p>	
<p>13. Генетичні особливості штаму: _____</p>	
<p>14. Галузь використання та господарська цінність штаму: <u>тестовий</u></p>	
<p>15. Відомості про депозитора: _____</p>	
<p>Відповідальний за штам мікроорганізму</p> <p>Оформила: Виговська Л.М. тел.: +38 (044) 526-45-03</p>	<p>Виговська Л. М.</p> <p align="right">Паспорт № <u>101</u> стор. 1 з 1</p>

ДОДАТОК 3

СВІДОЦТВО

про первинне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Українська лабораторія якості і безпеки продукції
агропромислового комплексу Національного університету біоресурсів і
природокористування України

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму Staphylococcus aureus St-2017/1

первинно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного
інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: 767

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клопотання, паспорт,
акти, зразки

Дата первинного депонування: 30.09.2020

Місце зберігання: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і
штамів мікроорганізмів, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

М.П.

16.12.2020



А.М. Головка

ДОДАТОК И



(11) **141004**(19) **UA**

(51) МПК

A61K 39/085 (2006.01)(21) Номер заявки: **u 2019 03914**(22) Дата подання заявки: **15.04.2019**(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.03.2020**(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **25.03.2020, Бюл. № 6**

(72) Винахідники:

**Вішован Юрій Юрійович, UA,
Виговська Лілія Миколаївна,
UA,
Ушкалов Валерій
Олександрович, UA,
Данчук В'ячеслав
Володимирович, UA**

(73) Власник:

**НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
УКРАЇНИ,
вул. Героїв Оборони, 15, м.
Київ-41, 03041, UA**

(54) Назва корисної моделі:

КОАГУЛАЗОПОЗИТИВНИЙ ШТАМ STAPHYLOCOCCUS AUREUS З МНОЖИННОЮ СТІЙКІСТЮ ДО АНТИБІОТИКІВ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ДІАГНОСТИЧНИХ ТА ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

(57) Формула корисної моделі:

Коагулазопозитивний штам *Staphylococcus aureus* St-2017/1 з множинною стійкістю до антибіотиків для розробки та виготовлення діагностичних та імунобіологічних препаратів відноситься до: домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, класу *Bacilli*, ряду: *Bacillales*, родини *Staphylococcaceae*, роду *Staphylococcus*, виду *Staphylococcus aureus*, має однорідний склад популяції та володіє набутою резистентністю до природних пеніцилінів (бензилпеніциліну), хінолінів (норфлоксацину, спарфлоксацину), помірно резистентний до макролідів (еритроміцину), лінкозамідів (кліндаміцину), може бути використаний при тестуванні та виготовленні засобів діагностики, імунобіологічних препаратів та в навчальному процесі.



(11) **141068**(19) **UA**

(51) МПК (2020.01)
A61K 39/02 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C12Q 1/00
C12R 1/00 (2006.01)

(21) Номер заявки: **u 2019 07865**(22) Дата подання заявки: **11.07.2019**(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.03.2020**(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **25.03.2020, Бюл. № 6**

(72) Винахідники:
Виговська Лілія Миколаївна, UA,
Ушкалов Валерій Олександрович, UA,
Данчук В'ячеслав Володимирович, UA,
Вішован Юрій Юрійович, UA,
Ушкалов Артем Валерійович, UA

(73) Власник:
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ,
 вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ-41, 03041, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ СТАНДАРТНИХ ЗРАЗКІВ АНТИГЕНІВ ЗБУДНИКІВ ХАРЧОВИХ ЗООНОЗІВ (LISTERIA, SALMONELLA, YERSINIA, STAPHYLOCOCCUS, ESCHERICHIA ТОЩО), ПРИДАТНИХ ДО ВИКОРИСТАННЯ В ПОЛІМЕРАЗНІЙ ЛАНЦЮГОВІЙ РЕАКЦІЇ (ПЛР) ЯК ПОЗИТИВНИХ КОНТРОЛЕЙ

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів, придатних до використання в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) як позитивних контролей, що включає відбір стандартних штамів мікроорганізмів відповідних видів/родів *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, їх культивування у відповідних поживних середовищах, перевірку на відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою та подальшою ліофілізацією і використанням за призначенням, причому концентрація біомаси мікроорганізмів до ліофілізації повинна бути в межах 10^8 КУО/см³.

ДОДАТОК І

Погоджено

Затверджую

Перший проректор
Національного університету
біоресурсів і
природокористування України

Ректор Одеського
державного аграрного
університету



І.І. Ібатуллин

р.



М.М. Брошков

р.

М.П.

А К Т

про впровадження результатів наукових досліджень робіт по темі
110/1 л-пр-2018 «Науково-експериментальне обґрунтування
молекулярно-генетичного скринінгу збудників, що передаються з
продуктами харчування (*Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*)»

керівник теми Ушкалов Валерій Олександрович

Ми, що нижче підписалися: декан факультету ветеринарної медицини та біотехнології Ушаков Олег Степанович, завідувач кафедри фізіології, біохімії та мікробіології Найда Василь Олексійович, завідувач кафедри епізоотології та паразитології Гуменний Олег Григорович даним актом засвідчуємо, що методичні рекомендації «СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ СТАНДАРТНИХ ЗРАЗКІВ АНТИГЕНІВ ЗБУДНИКІВ ХАРЧОВИХ ЗООНОЗІВ» Л.М. Виговська, Л.М. Іщенко, В.О. Ушкалов, В.В. Данчук, С.В. Мідик, О.Ю. Кеппл, Л.І. Калакайло, Ю.Ю. Вішован, А.В. Ушкалов, А.В. Гранат, С.А. Терещенко, Л.О. Давидовська, С.О. Бояновський, Ю.Ю. Довбня впроваджені в навчальному процесі за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» при викладанні дисциплін: епізоотологія та ветеринарна мікробіологія.

Декан факультету ветеринарної
медицини та біотехнології

О.С. Ушаков

Завідувач кафедри фізіології,
біохімії та мікробіології

В.О. Найда

Завідувач кафедри епізоотології
та паразитології

О.Г. Гуменний

Погоджено

Перший проректор
Національного університету
біоресурсів і
природокористування України

І.І. Ібатулін

«

»

р.

М.П.

Затверджую

Директор Державного науково-
контрольного інституту біотехнології
і штамів мікроорганізмів

А.М. Головка

«



» 2020 р.

М.П.

АКТ

про впровадження результатів наукових досліджень робіт по темі 110/1 л-пр-2018 «Науково-експериментальне обґрунтування молекулярно-генетичного скринінгу збудників, що передаються з продуктами харчування (Listeria, Salmonella, Yersinia)»

Керівник теми: Ушкалов Валерій Олександрович

Ми, що нижче підписалися: Бабкін Михайло Валерійович, заступник директора з наукового супроводу виробництва та обігу ВІЗ, канд. вет. наук, ст. наук. співробітник, В'ячеслав Леонідович Коваленко, доктор вет. наук, професор, завідувач сектором з розробки нормативно-правової бази з питань біобезпеки Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів, даним актом засвідчуємо, що методичні рекомендації «ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ХАРЧОВИХ ЗООНОЗІВ З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ» В.О. Ушкалов, Л.М. Виговська, Л.М. Іщенко, В.В. Данчук, Л.І. Калакайло, Ю.Ю. Вішован, О.Ю. Кеппл, А.В. Ушкалов, А.В. Гранат, С.А. Терещенко, Л.О. Давидовська, С.О. Бояновський впроваджені в наукову-дослідну роботу щодо діагностики бактеріальних зоонозів.

Заступник директора з наукового
супроводу виробництва та обігу ВІЗ

М.В. Бабкін

Завідувач сектором з розробки
нормативно-правової бази з питань біобезпеки

В.Л. Коваленко

ДОДАТОК І

РЕЄСТРАЦІЙНІ МАТЕРІАЛИ

на

Набір діагностичний «*STAPHYLOCOCCUS AUREUS*-

ПЛР», для виявлення здатності до утворення
біоплівки та стійкості до метициліну бактерій виду

Staphylococcus aureus

методом полімеразної ланцюгової реакції

Київ – 2020 р.

ЗМІСТ

Заява до реєстраційного досьє	
Частина I. Загальна характеристика	3
Розділ А. Адміністративні дані	4
Дозвіл на виробництво (ЛІЦЕНЗІЯ)	
Розділ В. Коротка характеристика ВІП	5
Листівка – вкладка (настанова по застосуванню)	8
Вторинне пакування та маркування	14
Первинне пакування та маркування	15
Розділ С. Експертні висновки	16
Акт міжлабораторних випробувань	
Частина II. Аналітичні (фізико-хімічні, біологічні або мікробіологічні) методи дослідження ВІП	17
Розділ А. Якісний та кількісний склад	18
Розділ В. Виробництво ВІП	20
Інструкція з виготовлення та контролю тест - системи	21
Розділ С. Виробництво і контроль вхідних матеріалів	32
Розділ D. Спеціальні заходи щодо запобігання трансмісивній губчастій енцефалопатії	39
Розділ Е. Методи дослідження в процесі виробництва	40
Розділ F. Методи дослідження кінцевого продукту	44
Протоколи досліджень	
Розділ G. Стабільність.	50
Частина III. Дослідження нешкідливості	51
Розділ А. Лабораторні дослідження	57
Розділ В. Польові дослідження	58
Розділ С. Екотоксичність	59
Частина IV. Дослідження ефективності	60
Розділ А. Лабораторні дослідження.	61
Додаток 1 Коротка характеристика препарату	
Додаток 2 Листівка вкладка (настанова по застосуванню)	
Додаток 3 Маркування	
Додаток 4 Технічні умови	