

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

КОЗИЦЬКА ТАМАРА ГРИГОРІВНА

УДК 619:616.98:579.861.2:636(477)

**МЕТИЦИЛІНРЕЗИСТЕНТНИЙ СТАФІЛОКОК:
ПОШИРЕННЯ, БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
ТА ДІАГНОСТИКА**

16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,
інфекційні хвороби та імунологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2021

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису
Роботу виконано в Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи Міністерства розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України

Науковий керівник кандидат ветеринарних наук,
старший науковий співробітник
Гаркавенко Тетяна Олександрівна,
Державний науково-дослідний інститут
з лабораторної діагностики
та ветеринарно-санітарної експертизи,
перший заступник директора
з наукового забезпечення керівництва
випробувальним центром

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук,
старший науковий співробітник
Музика Віктор Павлович,
Державний науково-дослідний контрольний інститут
ветеринарних препаратів та кормових добавок,
заступник директора з наукової роботи

доктор ветеринарних наук,
старший науковий співробітник
Виговська Лілія Миколаївна,
Українська лабораторія якості і безпеки
продукції агропромислового комплексу
Національного університету біоресурсів
і природокористування України,
завідувач відділу мікробіологічних досліджень

Захист відбудеться «23» квітня 2021 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «22» березня 2021 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

В. В. Мельник

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Проблема стафілококозів стала однією з найбільш важливих у сучасній інфекційній патології сільськогосподарських тварин. Патогенність *Staphylococcus spp.* пов'язана з токсиноутворенням, інвазивністю, стійкістю до дії антибіотиків. Серед представників роду *Staphylococcus spp.* найбільшим патогенним потенціалом володіє *Staphylococcus aureus*. Широке розповсюдження ізолятів *Staphylococcus spp.* серед людей, які за професійною діяльністю мають контакт із тваринами або переробкою первинної продукції, свідчить про передачу збудника (Neradova K., Jakubu V., 2020).

Нині все частіше трапляються штами *S. aureus*, стійкі до оксациліну (метициліну). Метицилінрезистентні *S. aureus* (MRSA) – це *S. aureus*, резистентні до β -лактамних антибіотиків. Основний компонент цієї стійкості – ген *meсA*, який кодує утворення модифікованого пеніцилін-зв'язуючого протеїну й цим перешкоджає вбудовуванню β -лактаму в клітинну стінку (Ellin Doule M. et all., 2011; Волобуєв Л. М., 2013; Меєнкен Д., 2010).

Питання щодо стафілококозів привертає до себе увагу й тим, що незмінно спостерігається високий рівень реєстрації захворювань у тварин і людей, зумовлених представниками численних видів *Staphylococcus spp.*, тривале безсимптомне носійство інфекції, тенденція до зростання стійкості *Staphylococcus spp.* до антибіотиків, виявлення нових факторів патогенності – здатності до формування бактерійної біоплівки, де збудник *S. aureus* значно ефективніше захищений і проявляє свою стійкість до дії антибактеріальних засобів і препаратів (Покришко О., 2017; Hamroune M., 2014; Вішован Ю. та ін., 2018).

На сучасному етапі означені питання є актуальними та потребують вивчення у сфері ветеринарної медицини в Україні, що стало основою для дисертаційного дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Матеріали дисертації є фрагментом наукових досліджень Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи відповідно до наукових програм «Розробка, вивчення та порівняння різних методів і засобів ветеринарно-санітарної оцінки і контролю якості та безпеки продукції тваринного і рослинного походження та кормів» (номер державної реєстрації 0109U001082, 2009–2018 рр.) та «Оцінка ступеню поширення антибіотикорезистентності у збудників зоонозів в Україні» (номер державної реєстрації 0118U100599, 2019–2028 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертації – дослідити поширення, біологічні властивості *S. aureus*, які циркулюють серед тварин, у продукції тваринного походження та в об'єктах довкілля на території України та удосконалити методи діагностики MRSA.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

– дослідити поширення стафілококозів серед тварин в Україні, частоту виділення *S. aureus* у зразках продукції тваринного походження та в об'єктах довкілля, що підлягають ветеринарно-санітарному контролю в Україні;

– дослідити зразки патологічного та біологічного матеріалу від тварин, продукції тваринного походження та об'єктів довкілля бактеріологічними методами з метою індикації ізолятів *S. aureus*;

– вивчити особливості культурально-морфологічних, біохімічних та патогенних властивостей ізолятів *S. aureus*;

– визначити чутливість одержаних ізолятів *S. aureus* до антибактеріальних препаратів;

– виявити та вивчити набуті молекулярно-генетичні механізми стійкості до метициліну (ген *mecA*) в ізолятів *S. aureus*;

– встановити рівень поширеності *MRSA* серед ізолятів *S. aureus*, виділених з об'єктів досліджень;

– вивчити здатність до утворення біоплівок в ізолятів *MRSA*;

– дослідити чутливість до дезінфікуючих засобів ізолятів *MRSA* та *S. aureus* з набутою множинною стійкістю до антибактеріальних препаратів.

Об'єкт дослідження – зразки патологічного та біологічного матеріалу від тварин, харчових продуктів тваринного походження, об'єктів довкілля, ізоляти *S. aureus*.

Предмет дослідження – біологічні властивості ізолятів *S. aureus*.

Методи дослідження: бактеріологічні (культурально-морфологічні, ферментативні, біохімічні, визначення чутливості до антибактеріальних препаратів, вивчення здатності до формування біоплівок високої щільності, встановлення стійкості до дезінфікуючих засобів); біологічні (патогенність *S. aureus* для білих мишей); молекулярно-генетичні (підтвердження наявності гену *mecA* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі).

Наукова новизна одержаних результатів. Проведено широкомасштабний аналіз результатів бактеріологічних досліджень щодо поширення *S. aureus* серед різних видів тварин, у зразках продукції тваринного походження, об'єктів довкілля, що підлягають ветеринарно-санітарному контролю, в Україні; встановлено широке розповсюдження зоонозного патогену *S. aureus* в зазначених об'єктах. Так, за досліджуваній період 2015–2019 рр. виявлено зростання випадків реєстрації стафілококозу серед тварин із 0,9 % у 2015 р. до 2,3 % у 2019 р. Найчастіше це захворювання реєструвалося у великої та дрібної рогатої худоби, а також у птиці. У харчових продуктах також спостерігали тенденцію до зростання контамінації цим збудником із 7,7 до 11,2 %, найбільше невідповідностей було виявлено в м'ясі та м'ясопродуктах. Щодо об'єктів довкілля, які підлягали ветеринарно-санітарному контролю, *S. aureus* ізолювали постійно, рівень контамінації становив 0,2 % за п'ять років.

Встановлено, що прояви біологічних властивостей (культурально-морфологічних, ферментативних, патогенних) у 39 дослідних ізолятів *S. aureus* були характерними для штамів виду *S. aureus*, що підтверджувалося типовим ростом на диференційно-діагностичних поживних середовищах, ферментативною здатністю до розщеплення глюкози, лактози, сахарози та маніту з утворенням кислоти без газу та відсутністю ферментів для розщеплення мальтози, підтвердженням належності означених культур також

були позитивні тести на продукцію каталази, лецитинази, коагулази та наявність α -токсину, який забезпечував β -гемоліз на кров'яному агарі.

Досліджено та проведено порівняльний аналіз чутливості до антибактеріальних препаратів дослідних ізолятів *S. aureus*, встановлено поширення *S. aureus* у межах 82,1 %, від загальної кількості досліджених, з різною стійкістю до різних груп антибіотиків.

Експериментально обґрунтовано доцільність проведення комплексних досліджень із застосуванням мікробіологічних та молекулярно-генетичних методів для визначення набутих механізмів резистентності у *S. aureus* (виявлення гену *mecA*) та вивчення метицилінрезистентних *S. aureus*. Встановлено наявність гену *mecA* у 53,8 % досліджених ізолятів *S. aureus*; отримані дані чітко збігалися з результатами скринінгу зі специфічним чутливим маркером цефокситіном за постановки диско-дифузійного методу щодо виявлення *MRSA*.

Задепоновано штамп *MRSA* (Свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізму № «22-22» в Депозитарії Державного науково-дослідного контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів від 18.02.2019 р).

Досліджено та проведено порівняльний аналіз здатності до утворення біоплівки у штамів *S. aureus*, одержаних із різних об'єктів; встановлено що високий рівень щільності було виявлено серед 57,1 % досліджуваних штамів *S. aureus*; середній рівень щільності формували 2,6 % штамів *S. aureus*; низький рівень щільності біоплівок було виявлено у 14,3 % досліджуваних штамів.

На основі аналізу проведених експериментів отримано нові наукові дані про стійкість виявлених антибіотикорезистентних штамів *S. aureus* (*MRSA*) до дезінфікуючих засобів із різними діючими речовинами, встановлено, що метицилінрезистентні штами *S. aureus* «18/52», «28/70» та «30/75» були стійкими до дезінфікуючого засобу № 1 з вмістом діючих речовин, таких як бензалконію хлорид, глутаровий альдегід та формальдегід у концентрації 0,25 % за експозиції 30 хв, а також штамп *MRSA* «28/70» був стійким до дезінфікуючих засобів № 2 (гліоксалевий альдегід, глутаровий альдегід, бензалконій хлорид, додецилдиметиламоній хлорид) та № 3 (глутаровий альдегід, гліоксалевий альдегід, четвертинні амонієві сполуки, полігексаметиленгуанідин гідрохлорид) у концентрації 0,05 % за експозиції 30 хв.

Практичне значення одержаних результатів. Результати досліджень стали науковим підґрунтям для розроблення та впровадження в систему лабораторної діагностики в регіональних державних лабораторіях Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів нормативних документів, а саме: «Методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» (розглянуто та затверджено Науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 25 грудня 2014 року), «Методичні вказівки. Сучасні методи визначення чутливості та виявлення механізмів резистентності *S. aureus* до антибактеріальних

препаратів», «Методичні рекомендації з визначення бактерицидної активності дезінфікуючих засобів на бактеріях у біоплівках» (розглянуто та затверджено Вченою радою Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, відповідно протокол № 1 від 27 лютого 2019 року та протокол № 1 від 24 лютого 2020 року).

Розроблено паспорт на штам *S. aureus* «22/22» та задепоновано для внутрішньо лабораторного контролю якості мікробіологічних досліджень, для розроблення діагностикумів та використання в якості тест-культури (позитивного контролю) штам *MRSA* «22-22» в Державному науково-дослідному контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів (Свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії від 18.02.2019 р.).

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно здійснено інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою дисертації; виконано експериментальну частину; проведено статистичну обробку результатів і зроблено їх узагальнення.

Планування експериментів було проведено під керівництвом наукового керівника кандидата ветеринарних наук, старшого наукового співробітника Т. О. Гаркавенко. Дослідження з визначення здатності до утворення біоплівки, чутливості до дезінфікуючих засобів в ізолятів *S. aureus* з набутою множинною стійкістю до антибактеріальних препаратів та у *MRSA* проведено за участі кандидатів ветеринарних наук О. І. Горбатюк, В. О. Андріюшак та Л. В. Марущак.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації доповідалися та обговорювалися на: III та IV щорічних Регіональних симпозіумах в рамках концепції «Єдине здоров'я» (м. Київ, 2018 р., 2019 р.); семінарі з питань застосування антимікробних препаратів у секторі тваринництва (м. Уппсала, Королівство Швеція, 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Біотехнологія та її роль в забезпеченні здоров'я людей та тварин» (м. Київ, 2018 р.); Міжнародній виставці LabComplex «Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів» (м. Київ, 2018 р.); VIII Міжнародній науково-практичній конференції «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування» (м. Львів, 2019 р.), Всеукраїнському семінарі бактеріологів «Сучасні підходи до вирішення проблеми антибіотикорезистентності мікроорганізмів. Програми державного ветеринарно-санітарного контролю сальмонельозу птиці в птахогосподарствах України» (м. Івано-Франківськ, 2018 р.); Всеукраїнському семінарі бактеріологів «Нагляд за протимікробною резистентністю зоонозних та комменсальних бактерій в Україні. Мікробіологія харчового ланцюга» (м. Київ, 2020 р.).

Публікації. Основні положення дисертації викладено в 11 наукових працях, з яких 5 статей у наукових фахових виданнях України, у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні, включеному до міжнародної наукометричної бази даних Web of Science, 3 методичні рекомендації, 2 тези наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 176 сторінках, ілюстровано 19 таблицями та 21 рисунком. Робота складається з анотацій, вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Список використаних джерел налічує 214 найменування.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційні дослідження виконано впродовж 2014–2020 рр. на базі науково-дослідного бактеріологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Експериментальні дослідження здійснювали відповідно до розробленої схеми, яка складається з 6 етапів (рис. 1).

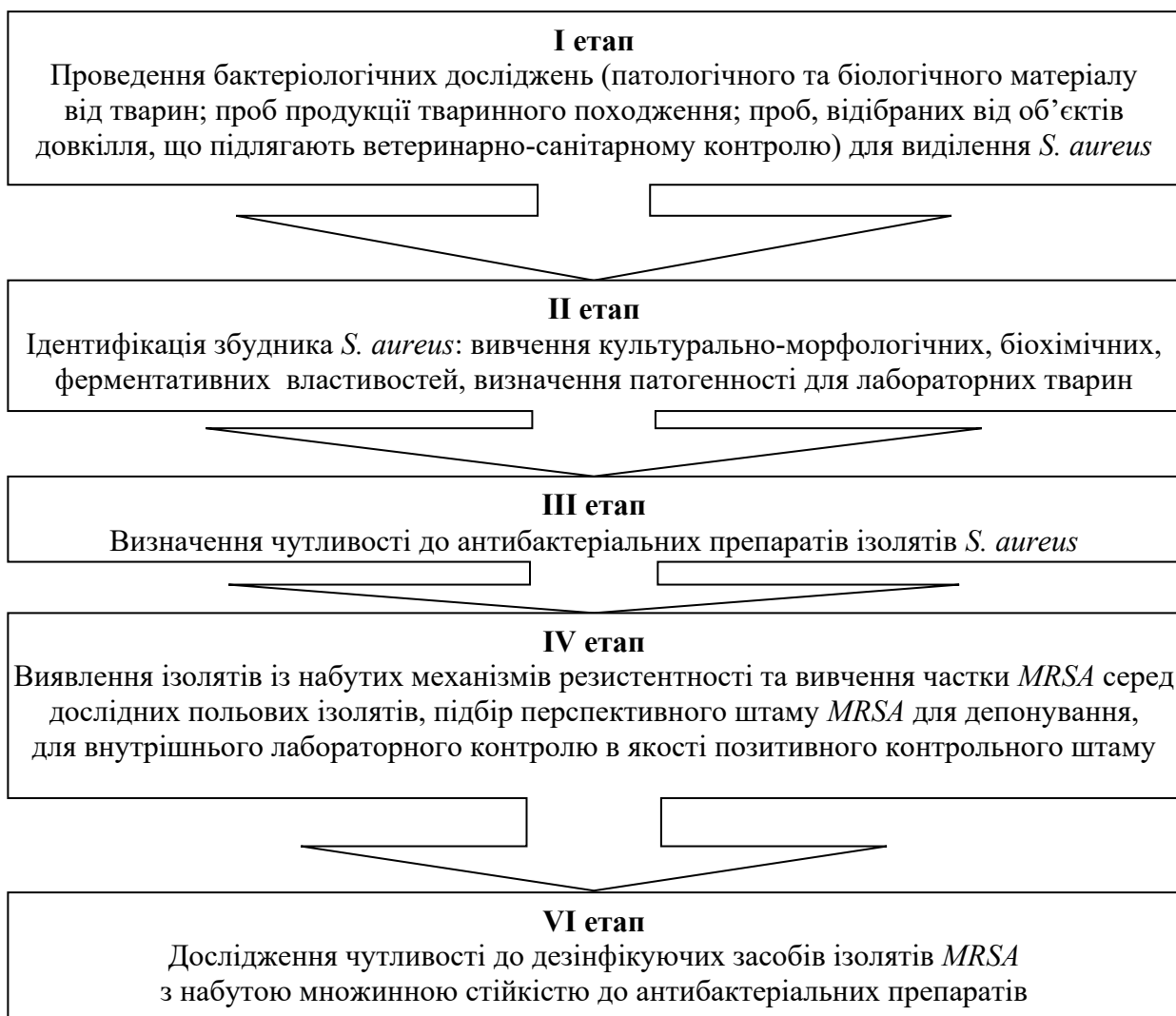


Рис. 1. Загальна схема проведення експериментальних досліджень

Ізоляцію та ідентифікацію ізолятів *S. aureus* здійснювали відповідно до чинних методик (ISO 6888-1, ISO 6888-2, ISO 6888-3, ДСТУ ISO 6888-1:2003, ДСТУ ISO 6888-2:2003, ДСТУ IDF 138:2003, ГОСТ 30347-97, «Методические рекомендации. Лабораторная диагностика стафилококковых инфекций»

(1989 г.), «Методичні рекомендації щодо мікробіологічної діагностики збудників стафілококових інфекцій» (1999 р.), «Методические рекомендации по лабораторной диагностике стафилококковых инфекций» (1987 г.), «Методичні вказівки щодо санітарно-мікробіологічного контролю об'єктів виробництва та реалізації, які підлягають ветеринарному нагляду» (2013 р.).

Було досліджено 39 польових ізолятів *S. aureus*, одержаних із патологічного та біологічного матеріалу від тварин, від проб продукції тваринного походження та об'єктів довкілля, ідентифікованих у науково-дослідному бактеріологічному відділі Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи та поміщених на зберігання в Музей ізолятів збудників зоонозних інфекцій бактеріальної етіології, який було створено відповідно до Доручення Держпродспоживслужби від 12.10.2018 р. № 602-06-06/42 (табл. 1).

Таблиця 1

Перелік дослідних ізолятів *S. aureus* та категорії об'єктів, n=39

Категорія дослідного об'єкта				
Ізоляти <i>S. aureus</i> виділені із патологічного та біологічного матеріалу від тварин (n=9)	Ізоляти <i>S. aureus</i> виділені в зразках продукції тваринного походження (n=26)			Ізоляти <i>S. aureus</i> виділені з проб, відібраних від об'єктів довкілля (n=4)
28/70	2/15	22/22	80/187	21/57
94/205	37/92	23/59	81/188	27/69
18/52	42/105	69/164	82/189	30/75
84/191	56/142	70/165	83/190	95/206
85/192	57/143	74/169	90/197	
86/193	59/152	75/170	145/328	
87/194	60/153	77/173	147/329	
88/195	66/161	78/174	148/345	
89/196	62/155	79/176		

Для визначення патогенності ізолятів *S. aureus* було використано лабораторні тварини (білі миші вагою 20–22 г – 320 гол.). Тваринам вводили по 0,2 см³ суспензії *S. aureus* у концентрації 1,0×10⁹ КУО/см³ у ділянці латеральної поверхні задньої кінцівки. Експерименти на тваринах було проведено з дотриманням вимог Загальних етичних принципів експериментів над тваринами, схвалених Національним конгресом із біоетики й узгоджених із положеннями Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2010).

Для визначення чутливості дослідних штамів *S. aureus* до антибіотиків та визначення антибіотикограми застосовували диско-дифузійний метод Кірбі-

Бауера, інтерпретацію результатів проводили за методологією EUCAST (версія № 8.1 від 15.05.2018 р.).

Для визначення чутливості польових ізолятів *S. aureus* використовували диски антибіотиків виробництва HiMedia (Індія), зокрема: група пеніцилінів: бензилпеніцилін (1 мкг), оксацилін (5 мкг); група глікопептидів: ванкоміцин (50 мкг); група тетрациклінів: тетрациклін (30 мкг); група макролідів і лінкозамідів: еритроміцин (15 мкг), кліндаміцин (2 мкг); група аміноглікозидів: амікацин (5 мкг), гентаміцин (10 мкг), тобраміцин (10 мкг); група флюорохінолонів: ципрофлоксацин (5 мкг), левофлоксацин (5 мкг), норфлоксацин (10 мкг), офлоксацин (5 мкг); група цефалоспоринів: цефоксітин (30 мкг); група оксилідінонів: лінезолід (10 мкг); інші групи: хлорамфенікол (30 мкг), фузидієва кислота (10 мкг), рифампіцин (5 мкг), триметопрім (5 мкг).

Набуті механізми резистентності в 39 дослідних штамів *S. aureus* визначали за методологією EUCAST (версія № 8.1 від 15.05.2018 р.) з використанням диско-дифузійного методу через проведення скринінгу з цефоксітином (30 мкг/диск) за умови виявлення метицилінрезистентних штамів *S. aureus* за встановлення діаметру зони інгібування росту навколо диска <22 мм, якщо ≥22 мм – штам чутливий до метициліну (EUCAST версія № 8.1 від 15.05.2018 р.).

Виявлення хромосомального гену *tesA* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі проводили за допомогою набору реагентів AmpliSens MRSA-screen-titre-FRT PCR kit (Російська Федерація), згідно з інструкцією виробника на базі науково-дослідного бактеріологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Здатність до утворення біоплівки дослідних ізолятів *S. aureus* вивчали за розробленою та валідованою методикою згідно «Методичних рекомендацій із визначення бактерицидної активності дезінфікуючих засобів на бактеріях у біоплівках (Кухтин М. Д. та ін., 2020), де в результаті проведених досліджень діставали промивний спиртовий розчин, який зливали в стерильні ємності і вимірювали його оптичну щільність на спектрофотометрі за довжини хвилі 570 нм. Облік результатів проводили за наступними критеріями: якщо оптична щільність промивного спиртового розчину складала до 0,5 Од – щільність сформованих біоплівок вважали низькою; за оптичної щільності від 0,5 до 1,0 Од – середньою; за оптичної щільності більше 1,0 Од – високою.

Дослідження антибіотикорезистентних дослідних штамів *S. aureus* на виявлення стійкості до дезінфікуючих засобів із різними діючими речовинами проводили суспензійним методом відповідно до «Методичних рекомендацій із визначення бактерицидної активності та контролю відсутності бактеріостатичного ефекту дезінфікуючих засобів» (Гаркавенко Т. О. та ін., 2019) (табл. 2).

Статистичну обробку одержаних результатів досліджень проводили з обчисленням середніх значень (M), середньоквадратичних відхилень (m) і порівняльних середніх значень із використанням параметричного t-критерію Стьюдента з урахуванням порогу вірогідності від $p < 0,05$ до $p < 0,001$.

**Досліджувані дезінфікуючі засоби
та вміст діючих речовин згідно листівки-вкладки**

Дезінфікуючий засіб	№ 1 в 100 мл препарату, г		№ 2 в 1 кг препарату, г		№ 3 діючі речовини (%):	
	Уміст діючих речовин згідно листівки-вкладки	Бензалконій хлорид	5,0	Гліоксалевий альдегід	5,0	Глутаровий альдегід
Глутаровий альдегід		10,0	Глутаровий альдегід	115,0	Гліоксалевий альдегід	8
Формальдегід		14,8	Бензалконій хлорид	240,0	Четвертинні амонієві сполуки	20
			Додецилдиметиламоній хлорид	5,0	Полігексаметиленгуанідин гідрохлорид	1
Досліджувані концентрації, %	0,25; 0,5; 1,0		0,05; 0,25; 0,5		0,05; 0,25; 0,5	
Експозиція, хв	30		30		30	

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

ТА ЇХ АНАЛІЗ

Аналіз результатів бактеріологічних досліджень проб патологічного та біологічного матеріалу від тварин щодо *S. aureus* на території України за період 2015–2019 рр. Результати бактеріологічних досліджень щодо наявності збудника *S. aureus* у патологічному та біологічному матеріалі від тварин на території України показали тенденцію до зростання з показниками від 1,7 % у 2017 р. до 2,3 % у 2019 р. (рис. 2).

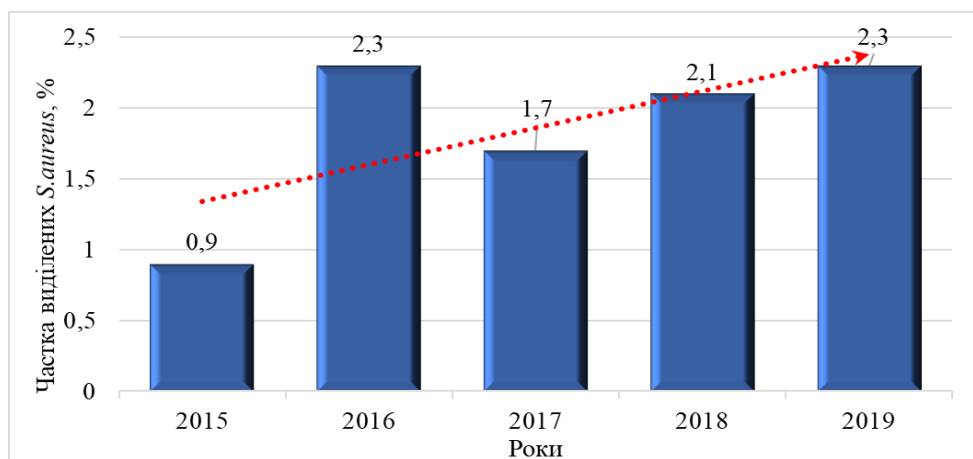


Рис. 2. Показники виділення збудника *S. aureus* із патологічного та біологічного матеріалу від тварин України за період 2015–2019 рр.

За період 2015–2019 рр. найвищий рівень стафілококозів на території України спостерігався у 2019 р., коли із 6465 зразків патологічного матеріалу з підозрою на стафілококову інфекцію, ізоляти збудника *S. aureus* було виявлено у 2,3 % випадків, що у 2,6 раза перевищувало показники 2015 р.

Починаючи з 2017 р., показник виявлених й ідентифікованих польових ізолятів *S. aureus* із патологічного матеріалу від великої рогатої худоби складав до 3,4 %, у 2018 р. – до 8,0 % і у 2019 р. – до 11,5 % позитивних результатів (рис. 3).

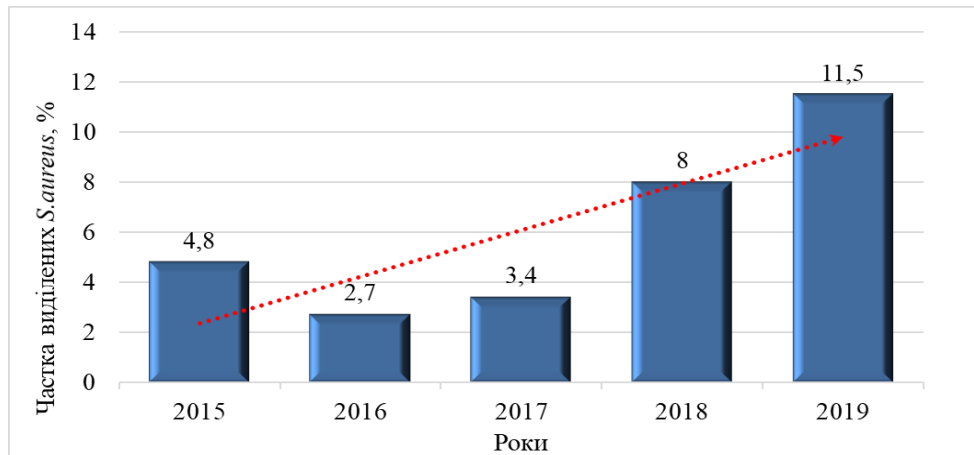


Рис. 3. Частота виділення *S. aureus* із проб патологічного матеріалу від великої рогатої худоби в Україні за період 2015–2019 рр.

Кількісне надходження зразків патологічного матеріалу від дрібної рогатої худоби для бактеріологічних досліджень на виявлення збудника *S. aureus* є значно меншим, порівняно з такими показниками у великої рогатої худоби. Проте, частота виділення *S. aureus* серед овець і кіз у певні роки дослідного періоду, навіть, перевищувала аналогічні показники в корів (рис. 4).

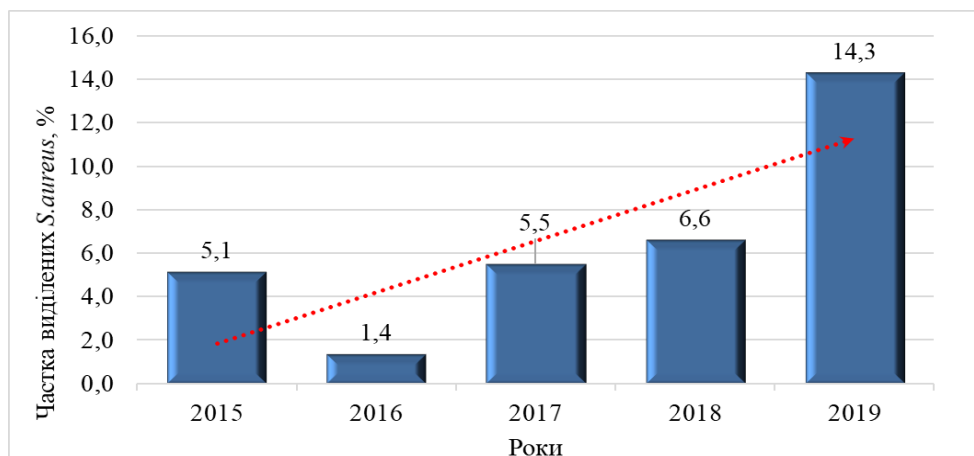


Рис. 4. Частота виявлення *S. aureus* із проб патологічного матеріалу від дрібної рогатої худоби в Україні за період 2015–2019 рр.

Результати бактеріологічних досліджень показали, що спостерігалася тенденція до зростання стафілококозів серед дрібної рогатої худоби, більше, як у 10 разів, від 1,4 % у 2016 р. до 14,3 % у 2019 р.

Аналіз результатів бактеріологічних досліджень із вивчення циркуляції збудника *S. aureus* серед свиней показав значне циклічне варіювання показників. Зокрема, у 2015 р. від рівня 1,5 % виділених польових ізолятів збудника аналогічні показники у 2016 р. зменшилися у 2,5 раза – до 0,6 %. Далі

у 2017 р. знову зростання до 1,4 % та зменшення їхньої кількості до 0,4 % у 2018 р. У 2019 р. *S. aureus* в жодному випадку не виділяли із патологічного матеріалу від свиней. Цей факт свідчить про тенденцію до зниження поширеності *S. aureus* серед поголів'я свиней на території України з 2018 р. (рис. 5).

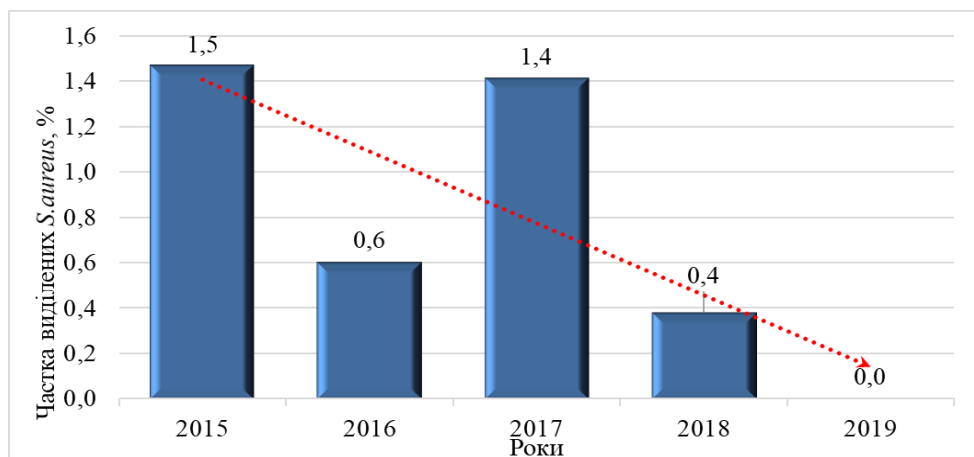


Рис. 5. Частота виявлення *S. aureus* із проб патологічного матеріалу від свиней в Україні за період 2015–2019 рр.

За аналізом результатів бактеріологічних досліджень було з'ясовано, що за останні два роки (2018–2019 рр.), кількість бактеріологічних досліджень від птиці зменшилася до 5,5–6,0 тис. зразків. За таких об'ємів досліджень відсоткова частка ізольованих та ідентифікованих збудників *S. aureus* була незначною і складала 0,3 % у 2015 р. Проте, з кожним роком цей показник зростав і у 2019 р. склав уже 1,9 % (рис. 6).

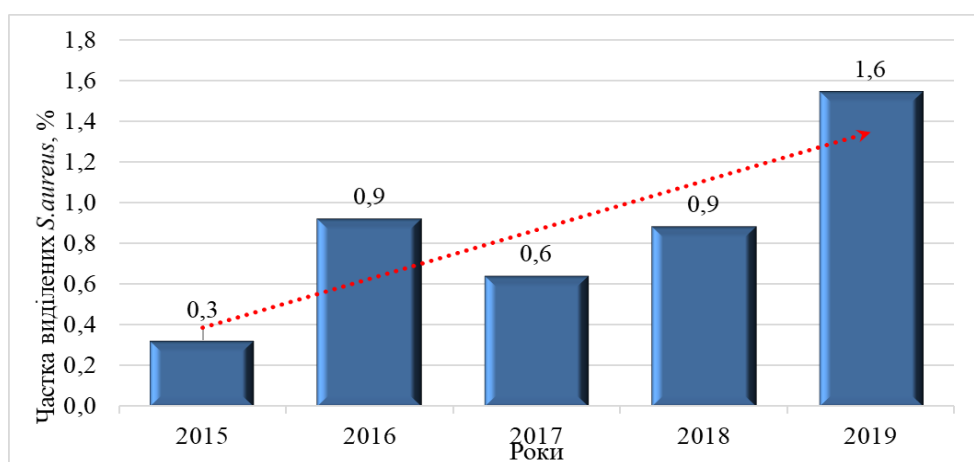


Рис. 6. Частота виявлення *S. aureus* із проб патологічного матеріалу від птиці в Україні за період 2015–2019 рр.

За останні п'ять років виділення збудника *S. aureus* серед птиці зросло більше, як у 6 разів, порівняно з показниками 2015 р.

За результатами бактеріологічних досліджень встановлено, що патологічний матеріал від хутрових звірів поступав у незначних об'ємах та щороку кількість дослідних проб зменшувалася.

Аналіз результатів бактеріологічних досліджень на *S. aureus* серед коней упродовж дослідного (2015–2019 рр.) періоду показав повне епізоотичне благополуччя щодо стафілококової інфекції на території України.

Аналіз результатів бактеріологічних досліджень щодо контамінації продукції тваринного походження *S. aureus* за період 2015–2019 рр. За період 2015–2019 рр. було проведено 291552 бактеріологічних досліджень на виявлення збудника *S. aureus* у зразках продукції тваринного походження, рівень контамінації склав 666 (0,2 %) виявлених невідповідностей.

За результатами проведених досліджень щодо виявлення *S. aureus* із м'яса різних видів тварин, спостерігали, що контамінація стафілококом свинини мала незначний рівень, були виділені лише 9 ізолятів *S. aureus* у 2015 р. та 6 – у 2016 р. Упродовж останніх двох років дослідного періоду, серед 160 проб свинини у 2018 р. та серед 141 зразка у 2019 р., які надійшли для досліджень на стафілокок, позитивних результатів не підтверджено.

Аналізуючи загальний стан мікробіологічної безпеки продукції тваринного походження за результатами бактеріологічних досліджень встановлено, що протягом дослідного періоду спостерігалася тенденція до зниження мікробіологічної контамінації збудником *S. aureus* продукції тваринного походження, оскільки у 2019 р., порівняно з 2015 р., у випробувальних зразках свинини, баранини і м'яса птиці, субпродуктах тварин і птиці, яйцях, молочних консервах і молочних сухих виробках не було виділено *S. aureus*. За такого ж періоду кількість випадків виділення ізолятів *S. aureus* у дослідних зразках іншої продукції тваринного походження значно знижувалася, зокрема, в зразках яловичини – від 3,6 до 2,0 %, у фарші м'ясному – від 10,3 до 0,8 %, фарші з м'яса птиці – від 5,4 до 1,6 %, ковбасах – від 0,2 до 0,1 %, яйцепродуктах – від 4,8 до 0,2 %, кисломолочній продукції – від 0,1 до 0,02 % від кількості дослідженої продукції, що сприяло поліпшенню ситуації щодо безпечності продукції тваринного походження щодо їхньої контамінації *S. aureus*.

Аналіз результатів бактеріологічних досліджень щодо контамінації об'єктів довкілля *S. aureus* в Україні за період 2015–2019 рр. Для вивчення санітарно-гігієнічного стану об'єктів довкілля в Україні було проаналізовано 315579 проб за показником *S. aureus*, проведених у період із 2015 до 2019 р. та виявлено 487 (0,2 %) невідповідностей.

Найчастіше *S. aureus* виділявся зі змивів інвентаря та обладнання, відібраних у супермаркетах, магазинах, що склало по 0,3 % позитивних результатів від усіх досліджень проведених за період 2015–2019 рр. Також за цей період 0,2 % невідповідностей щодо *S. aureus* були виявлені на яйцескладах. У забійних цехах та на птахопереробних підприємствах було виявлено 0,1 % позитивних результатів, також 0,04 % невідповідних результатів по *S. aureus* було виявлено та на молокопереробних підприємствах за аналогічний період часу.

Під час виконання Держпродспоживслужбою планових заходів державного нагляду (контролю) у 2019 р. було виявлено найбільшу кількість випадків щодо контамінації *S. aureus* у закладах громадського здоров'я – 1,3 %.

У дитячих закладах у цьому ж році невідповідності по *S. aureus* було зареєстровано у 0,8 % випадках, у лікувальних закладах цей показник склав 0,6 %.

Дані щодо виявлення *S. aureus* на поверхнях об'єктів доквілля, які підлягали ветеринарно-санітарному контролю, свідчать про недотримання санітарно-гігієнічних правил на виробництві, таких як прибирання та дезінфекція приміщення, відхилення від інструкції щодо дезінфекції інвентаря, обладнання та стін, недотримання правил гігієни (чистий спецодяг, гумові рукавички), відсутність своєчасного проведення медичного огляду працівників, якість дезінфекції.

Особливості біологічних властивостей та діагностики польових ізолятів *S. aureus*, одержаних із патологічного й біологічного матеріалів від тварин, проб продукції тваринного походження та із проб, відібраних з об'єктів доквілля. Бактеріологічні дослідження патологічного, біологічного матеріалів від тварин, проб продукції тваринного походження та змивів, відібраних з об'єктів доквілля проводили з обов'язковою мікроскопією – виготовляли препарати, фарбували за Грамом (виявлено незначні скупчення грампозитивних коків у мазках, зроблених із патологічного матеріалу) з послідовними посівами на прості та диференційно-діагностичні для бактерій роду *Staphylococcus spp.* поживні середовища (табл. 3)

Таблиця 3

Культуральні властивості ізолятів *Staphylococcus spp.*, n=39

№ з/п	Назва поживних середовищ, режим інкубації	Характер росту
1	М'ясо-пептонний агар (24 год/37 °С)	Спостерігався ріст однорідних округлих колоній S-форми, з чіткими рівними краями, непрозорих, жовтого кольору (типові для <i>S. aureus</i>)
2	М'ясо-пептонний бульйон (24 год/37 °С)	Рівномірна каламуть, на дні зразкирки білий осад, що не розбивається у разі струшування (типово для <i>S. aureus</i>)
3	Молочно-сольовий агар (24–48 год/37 °С)	Спостерігався ріст однорідних колоній S-форми, непрозорих, округлих, із рівними чіткими краями, пігментованих до жовто-золотистого відтінку (типово для <i>S. aureus</i>)
4	Жовтково-сольовий агар (24–48 год/37 °С)	Спостерігався ріст колоній круглої форми з чітко вираженими краями, діаметром близько 2–4 мм, жовтувато-золотистого кольору. Навколо колоній було візуально видно зону помутніння та райдужне кільце (лецитиназне кільце) внаслідок розщеплення лецитину яєчного жовтка (типово для <i>S. aureus</i>)
5	Агар Бейрд-Паркера (24–48 год/37 °С)	Спостерігався ріст колоній чіткої круглої форми, випуклих, блискучих, чорного кольору з утворенням візуально видимої зони просвітлення (лецитиназної зони) (типово для <i>S. aureus</i>)
6	Колумбійський агар (24 год/37 °С)	Спостерігався ріст колоній круглої форми з чітким краєм і зоною просвітлення навколо них шириною в межах 0,1–0,4 мм (β-гемоліз) (типово для <i>S. aureus</i>)

Для визначення видової приналежності досліджуваних культур *Staphylococcus spp.* вивчали їхні біохімічні властивості, застосовуючи тести на виявлення продукції: каталази, лецитинази, плазмокоагулази, цукролітичних ферментів (табл. 4).

Таблиця 4

Результати вивчення біохімічних властивостей досліджуваних культур *Staphylococcus spp.* до виду *S. aureus*, n=39

№ з/п	Назва застосованого тесту для ідентифікації <i>S. aureus</i>	Дослідна культура стафілококу
		облік результатів
Продукція ферментів і токсинів		
1	Тест на визначення каталазної активності	Після внесення кожної із дослідних культур <i>Staphylococcus spp.</i> у краплю перекису водню спостерігалася інтенсивна реакція з утворенням бульбашок газу – «ефект кипіння». Всі 39 штамів були каталазопозитивними
2	Тест на визначення лецитиназної активності	Визначена у попередніх дослідженнях за характеристикою культурального росту на селективних для стафілококів середовищах жовтково-сольового агару з утворенням зони помутніння («райдужної» зони) та на середовищі Байрд-Паркера за утворення зони просвітлення («лецитиназної» зони) навколо колоній. Тест позитивний, що підтверджує належність культур до виду <i>S. aureus</i>
3	Тест на визначення плазмокоагулазної активності	Після внесення кожної із дослідних культур <i>Staphylococcus spp.</i> у пробірки з 0,5 см ³ плазми крові кроля спостерігалася утворення згустка впродовж 30 хв – у 16 культур; упродовж 60 хв – у 14 культур; упродовж 180 хв – у 3 культур та впродовж 24 год – у 6 культур із реакцією на +++ і ++++ хрести. Тест позитивний, що підтверджує належність культур до виду <i>S. aureus</i>
4	Тести з визначення наявності й активності цукролітичних ферментів для розщеплення глюкози, сахарози, лактози та маніту, відсутність ферменту для розщеплення мальтози	Після внесення дослідних культур <i>Staphylococcus spp.</i> у низку пробірок із бульйоном із феноловим червоним та вуглеводами глюкозою, сахарозою, лактозою, манітом і мальтозою та їхнім інкубуванням за температури 37±1 °С упродовж 24 год у всіх 39 культур виявлено ферменти для розщеплення глюкози, сахарози, лактози та маніту. Усі дослідні культури стафілококів не ферментували мальтозу, що підтверджує належність культур до виду <i>S. aureus</i>
5	Тести з визначення наявності й активності цукролітичних ферментів для розщеплення маніту в сольовому агарі з манітом	За посіву дослідних культур <i>Staphylococcus spp.</i> на чашки Петрі із сольовим агаром та подальшому їхньому інкубуванню за температури 37±1 °С упродовж 24 год спостерігався ріст випуклих колоній круглої форми, з чіткими краями, жовтого кольору
Відсутність продукції ферментів		
6	Тести з визначення наявності цитохромоксидази (оксидазна активність)	Після втирання добових дослідних культур <i>Staphylococcus spp.</i> на площині диска з оксидазою зміни кольору диску на синій не виявлено. Оксидазонегативність свідчить про приналежність до <i>S. aureus</i>
7	Тести з визначення уреазної активності	За посіву дослідних культур <i>Staphylococcus spp.</i> у пробірки із сечовиною та подальшим їхнім культивуванням за температури 37±1 °С упродовж 24 год зміни кольору середовища не наступило, що свідчить про відсутність уреазної активності, що є характерним для <i>S. aureus</i>

Результати визначення патогенних властивостей *S. aureus* для лабораторних тварин показали, що досліджувані штами *S. aureus* були патогенні для білих. У загиблих тварин спостерігали гіперемію кишечника та крапкові крововиливи на його слизових оболонках; відзначалася гіперемія і набряк легень; збільшення і кровонаповнення печінки та нирок. З відібраного патологічного матеріалу від загиблих тварин (печінка, селезінка, лігатурована частина ураженого кишечника) було ізольовано *S. aureus*, ідентичної культурам, якими проводили зараження.

Визначення чутливості досліджуваних штамів *S. aureus* до антибактеріальних препаратів. За результатами аналізу проведених досліджень усі досліджувані штами *S. aureus* були умовно розділені на 4 групи. Перша група – це штами *S. aureus*, які проявляли критично високий рівень стійкості (від 50,0 до 87,5 % щодо 18 застосованих антибактеріальних препаратів); 28,2 % ізолятів *S. aureus* серед досліджуваних культур належали до цієї групи. Другу умовну групу складали штами *S. aureus*, у яких рівень стійкості до застосованих антибіотиків перебував у діапазоні від 50,0 до 10,0 %; до цієї групи увійшло *S. aureus* – 43,6 % (найбільша кількість досліджуваних штамів). Третя умовна група штамів *S. aureus* була представлена досліджуваними культурами, на які застосовані антибіотики діяли з високою активністю та загальний відсоток стійкості до них склав менше 10,0 %; відсоток дослідних ізолятів *S. aureus*, які були віднесені до цієї групи, склав 10,3 %. До умовної четвертої групи були віднесені дослідні штами *S. aureus*, у яких було встановлено чутливість до всіх застосованих антибактеріальних препаратів, і таких штамів серед дослідних було 17,9 %.

До антибіотиків, які оцінюються як такі, до яких ізоляти *S. aureus* дуже повільно набувають резистентності, також виявлена стійкість, яка наявна в 15,8 % до тобраміцину, в 11,8 % до ванкоміцину та в 7,9 % до лінезоліду дослідних штамів *S. aureus* (рис. 7).

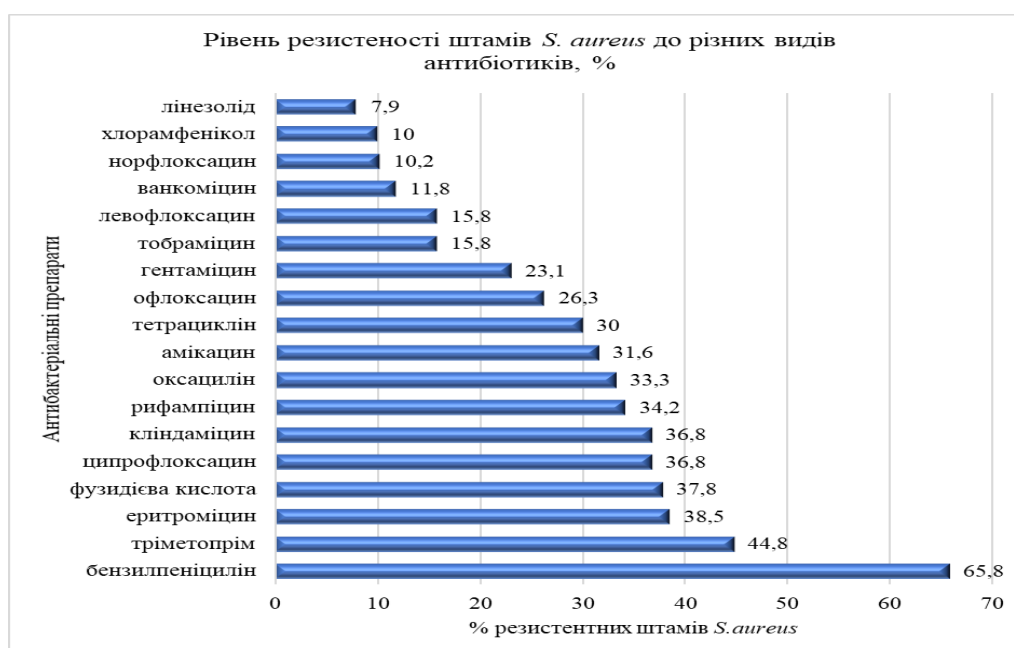


Рис. 7 Рівень резистентності до антибіотиків дослідних штамів *S. aureus*

Серед усіх дослідних штамів *S. aureus*, 82,1 % проявляли стійкість до застосованих антибіотиків.

Виявлення метицилінрезистентних штамів *S. aureus* (MRSA) із патологічного і біологічного матеріалів від тварин, проб продукції тваринного походження і проб, відібраних із об'єктів довкілля. За результатами фенотипової оцінки активності оксациліну та метициліну відносно досліджуваних штамів *S. aureus*, не було виявлено різниці в одержаних результатах досліджень (Козицька Т. Г., Гаркавенко Т. О., 2019; Горбатюк О. І., Гаркавенко Т. О., Козицька Т. Г. та ін., 2019). В обох випадках оксацилін і метицилін демонстрували ідентичні показники величини зон інгібування росту в 39 дослідних штамів *S. aureus*, що підтверджували резистентність до означених антибіотиків або були до них чутливими.

Проте, зважаючи на дані EUCAST щодо вираженої гетерогенної експресії гену *mecA*, який дуже часто має низькі показники мінімальної інгібуючої концентрації оксациліну, але резистентний до цього антибіотику; а також дані про відсутність у деяких штамів золотистих стафілококів генів *mecA* і *mecC* і через це відсутність продукції додаткових пеніцилінзв'язуючих білків ПСБ2а і ПСБ2с, але з проявом резистентності до оксациліну (метициліну), а також через низьку кореляцію одержуваних результатів визначення чутливості до оксациліну (метициліну) диско-дифузійним методом із наявністю гену *mecA* – призводить до одержання сумнівних результатів і помилок за визначення MRSA. Тому, для одержання вірогідних результатів було враховано рекомендації EUCAST і для виявлення набутих механізмів резистентності до метициліну (оксациліну) і визначення MRSA було застосовано скринінг зі специфічним чутливим маркером цефокситином за постановки диско-дифузійним методом (табл. 5).

За аналізом результатів експериментів з виявлення штамів з набутими механізмами резистентності – *mecA*-геном, встановлено, що серед 39 дослідних штамів *S. aureus*, виділених із патологічного матеріалу від тварин, зразків сировини, продукції тваринного походження та об'єктів довкілля, що складав 53,8 % (21 штам), тобто більшу половину від досліджених.

Виявлення метицилінрезистентних *S. aureus* методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Дослідження було проведено для підтвердження виявлення *mecA* у 21 ізоляті *S. aureus* та проведено апробацію методики виявлення ДНК метицилінчутливого й метицилінрезистентного *S. aureus*, метицилінрезистентних коагулазонегативних *Staphylococcus spp.* у біологічному матеріалі методом полімеразної ланцюгової реакції із гібридизаційним-флуоресцентною детекцією для подальшого використання в роботі Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Використання молекулярно-генетичних методів дослідження для виявлення гена *mecA* в ізолятах *S. aureus* дасть змогу проводити арбітражні дослідження, скоротити час дослідження, дасть змогу проводити аналіз зв'язків із джерелом контамінації *S. aureus*. А оцінка антибіотикорезистентних

генотипів ізолятів може слугувати інструментом для визначення гігієнічних норм в Україні.

Таблиця 5

Частота виділення MRSA серед дослідних штамів *S. aureus*, $M \pm m$, $n=39$

№ з/п	Назва дослідного штаму <i>S. aureus</i>	Цефокситін (30 мкг)		№ з/п	Назва дослідного штаму <i>S. aureus</i>	Цефокситін (30 мкг)	
		Облік результатів				Облік результатів	
		D зон, мм	Інтерпретація			D зон, мм	Інтерпретація
EUCAST**		P<22 мм		EUCAST**		P<22 мм	
<i>S. aureus</i> NCTC 12493		14±0,01					
1	штам 2/15	CP	Р	21	штам 78/174	26±0,33	Ч
2	штам 18/52	CP	Р	22	штам 79/176	24±0,67	Ч
3	штам 21/57	23±0,67*	Ч	23	штам 80/187	21±1,33	Р
4	штам 22/22	CP	Р	24	штам 81/188	20±1,33*	Р
5	штам 23/59	23±0,01	Ч	25	штам 82/189	16±0,01	Р
6	штам 27/69	23±0,67	Ч	26	штам 83/190	CP	Р
7	штам 28/70	10±1,33	Р	27	штам 84/191	24±0,33	Ч
8	штам 30/75	CP	Р	28	штам 85/192	22±1,33	Ч
9	штам 37/92	20±0,33*	Р	29	штам 86/193	24±1,67*	Ч
10	штам 42/105	14±0,67	Р	30	штам 87/194	23±0,01	Ч
11	штам 56/142	CP	Р	31	штам 88/195	23±0,33	Ч
12	штам 57/143	22±0,33	Ч	32	штам 89/193	17±0,33*	Р
13	штам 59/152	28±0,10	Ч	33	штам 90/197	CP	Р
14	штам 60/153	CP	Р	34	штам 94/205	20±0,33*	Р
15	штам 66/161	18±0,33	Р	35	штам 95/206	22±0,67	Ч
16	штам 69/164	16±0,01	Р	36	штам 145/327	28±0,33	Ч
17	штам 70/165	22±1,33*	Ч	37	штам 146/328	27±0,33	Ч
18	штам 74/169	21±1,67	Р	38	штам 147/329	30±1,67	Ч
19	штам 75/170	CP	Р	39	штам 148/345	27±0,33	Ч
20	штам 77/173	16±0,33	Р				
Всього: 21 – Р; 18 – Ч; Р – 53,8 %; Ч – 46,15 %							

Примітка. Р – штам резистентний; Ч – штам чутливий; CP – суцільний ріст; *відхилення достовірне щодо контрольного штаму *S. aureus* NCTC 12493, $p<0,01$

Методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу підтверджено наявність гена *mecA* у 21 із 39 досліджених ізолятів *S. aureus*, що складає 53,8 % від усіх досліджених штамів *S. aureus*. Отримані дані чітко співпадали з результатами з виявленими штамми *MRSA*.

Депонування штаму *MRSA*. Для проведення процедури депонування вивчали біологічні властивості отриманих у попередніх дослідженнях ізолятів. У результаті проведених досліджень було обрано штам *S. aureus* «22/22» (виділений у науково-дослідному бактеріологічному відділі Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи з проб копчених ковбасок) з набутим геном *mecA* (*MRSA*), який за біологічними властивостями відповідав усім типовим

властивостям *S. aureus*; за результатами проведеного скринінгу з цефоксїтіном та за постановки полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу у нього виявлено хромосомальний ген *tesA*. Зазначений штам є перспективним для використання під час контролю якості мікробіологічних досліджень, для розроблення діагностикумів та використання в якості тест-культури (позитивного контролю) за досліджень на виявлення набутого гену *tesA*.

S. aureus штам «22/22» було задепоновано у Депозитарії Державного науково-контрольного інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів. Кріогранули зі штамом *S. aureus* «22/22» зберігаються в Музеї антибіотико-резистентних штамів збудників зоонозів лабораторії діагностики інфекційних захворювань бактеріальної етіології науково-дослідного бактеріологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи в стані глибокої заморозки за температури -72 ± 5 °C. Термін зберігання п'ять років для первинної генерації культури.

Результати досліджень здатності до утворення біоплівки виявлення біоплівкоутворюючих властивостей штамів *S. Aureus*. Відомо, що певна частина бактеріальних клітин *S. aureus* у власних популяціях у процесі своєї життєдіяльності здатна формувати мікробні біоплівки, за утворення яких вони здатні проявляти значно вищу стійкість до антибактеріальних препаратів.

Було досліджено 7 штамів *MRSA*, виділених із різних категорій досліджуваних об'єктів, на визначення інтенсивності формування біоплівки (табл. 4).

Таблиця 4

Інтенсивність формування біологічних плівок у різних штамів *MRSA*,

$M\pm m$, О. од., $n=5$

№ з/п	Назва штаму <i>S. aureus</i>	Облік результатів	
		показники оптичної густини відмивної спиртової рідини (λ_{570})	рівень щільності сформованої біоплівки
Контроль			
	Негативний – м'ясо-пептонний бульйон без культури	0,001	залишки білкових решток м'ясо-пептонного бульйону
	Позитивний з низьким рівнем щільності – <i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,38±0,01	низька
	Позитивний з високим рівнем щільності штам <i>S. aureus</i> «22/22» (<i>MRSA</i>)	3,2±0,3**	висока
1	<i>S. aureus</i> штам «66/161» (продукція тваринного походження)	1,8±0,06*	висока
2	<i>S. aureus</i> штам «2/15» (продукція тваринного походження)	0,48±0,03	низька
3	<i>S. aureus</i> штам «37/92» (продукція тваринного походження)	1,6±0,01**	середня
4	<i>S. aureus</i> штам «42/105» (продукція тваринного походження)	1,6±0,01	висока

5	<i>S. aureus</i> штама «82/189» (продукція тваринного походження)	0,60±0,01	середня
6	<i>S. aureus</i> штама «77/173» (продукція тваринного походження)	2,0±0,01	висока
7	<i>S. aureus</i> штама «86/193» (патологічний матеріал від тварин)	2,0±0,06*	висока

Примітка. *відхилення достовірне $p < 0,01$; **відхилення достовірне $p < 0,001$

Встановлено, що високий рівень щільності сформованих біоплівок було виявлено серед 57,1 % дослідних штамів *MRSA* (рис. 8).

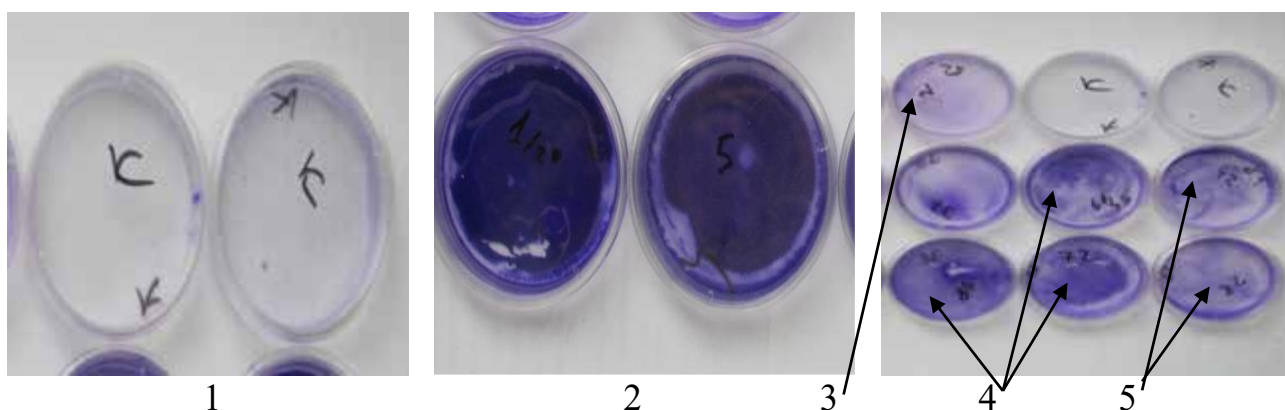


Рис. 8. Візуалізація дослідження щодо різних рівнів щільності сформованих біоплівок бактеріями дослідних штамів *S. aureus*: 1 – дуже низька щільність адгезованих залишків на дні чашок Петрі після промивання та пофарбування висушених залишків (без внесення культури *S. aureus*); 2 – дуже висока щільність сформованих біоплівок після промивання та пофарбування висушених залишків (позитивний контроль з антибіотикорезистентним штамом *MRSA* «22/22»); 3 – низький рівень щільності сформованих біоплівок дослідних штамів *S. aureus*; 4 – високий рівень щільності; 5 – середній рівень щільності

Аналіз результатів досліджень показав, що всім досліджуваним штамам *MRSA* була притаманна властивість до біоплівкоутворення, але з різними рівнями її прояву (щільності).

Отримані дані випробувань із виявлення біоплівкоутворення серед штамів *MRSA* засвідчили їхню здатність до формування високого та середнього рівнів щільності біоплівок, що складало 85,7 % від штамів, у яких визначали здатність до утворення біоплівок.

Вивчення стійкості антибіотикорезистентних штамів *S. aureus* до дезінфікуючих засобів. *S. aureus* є одним із найпоширеніших антибіотикорезистентних патогенів, який дуже швидко пристосовується до антибактеріальних препаратів. Тому, представляло науковий інтерес проведення досліджень щодо вивчення резистентності польових ізолятів *S. aureus* не лише до антибіотиків, а й до дезінфікуючих засобів із різними діючими речовинами для виявлення штамів збудника, стійких до обох антимікробних речовин.

Результати досліджень показали, що серед досліджених польових ізолятів золотистих стафілококів лише у *S. aureus* штам «21/61» була виявлена чутливість до всіх застосованих антибіотиків. Найвищий рівень резистентності був притаманний *S. aureus* штам «28/70», що складало 88,9 % резистентності щодо всіх застосованих препаратів. Висока резистентність спостерігалася у *S. aureus* штаму «18/52» і штаму «30/60», так як ізоляти були резистентними до 61,1 % препаратів. Інші виділені ізоляти *S. aureus* проявляли резистентність у діапазоні від 11,1 до 27,8 % серед застосованих антибіотиків. Варто зауважити, що *S. aureus* штамми «18/52», «28/70» і «30/75» були резистентними до цефоксітіну (*MRSA*).

Аналіз результатів проведених досліджень показав, що польові ізоляти *MRSA* (*S. aureus* штамми «18/52», «28/70» і «30/75»), були стійкими до дезінфікуючого засобу № 1 за експозиції 30 хв у концентрації 0,25 %, що було підтверджено ростом культур на твердих і рідких середовищах. За 30 хв експозиції після дії дослідних дезінфектантів у найнижчих концентраціях – 0,25 % (засіб № 1) і 0,005 % (засоби № 2 і № 3).

ВИСНОВКИ

У дисертації висвітлено результати вивчення поширення збудника стафілококозів серед тварин, у продукції тваринного походження та в об'єктах довкілля на території України. Досліджено біологічні властивості *S. aureus* методом *MRSA*, виділених від тварин та з об'єктів ветеринарно-санітарного контролю. Встановлено здатність до утворення біоплівки виділених ізолятів *MRSA* та визначено ефективність застосування дезінфікуючих засобів.

1. Встановлено, що в Україні стафілококоз протягом досліджуваного періоду 2015–2019 рр. постійно реєструвався серед різних видів тварин. Відсоток виділення збудника коливався від 0,8 до 18,3 %. Серед коней збудника стафілококозу не виділяли. Серед великої рогатої худоби та дрібної рогатої худоби у 2019 р. *S. aureus* було виділено відповідно у 2,4 та 2,8 рази більше в порівнянні з 2015 р. Серед птиці виділення *S. aureus* зросло від 0,3 до 1,6 %. Серед хутрових звірів, у 2019 р. позитивних результатів було в 5,3 рази більше в порівнянні з 2015 р. Аналіз виділення *S. aureus* від свиней свідчив про тенденцію до зменшення поширеності стафілококозів, про що свідчить відсутність виділення *S. aureus* у 2019 р.

2. За результатами бактеріологічних досліджень за період 2015–2019 рр. продукція тваринного походження була контамінована *S. aureus* у 0,2 % випадках. Виділення збудника мало тенденцію до зниження у 2019 р. в порівнянні з 2015 р., зокрема в яловичині – від 3,6 до 2,0 %, у фарші м'ясному – від 10,3 до 0,8 %, у фарші з м'яса птиці – від 5,4 до 1,6 %, у ковбасах – від 0,2 до 0,1 %, у яйцепродуктах – від 4,8 до 0,2 %, у кисломолочній продукції – від 0,1 до 0,02 %, від кількості дослідженої продукції, що сприяло поліпшенню ситуації щодо безпечності харчових продуктів в 2019 р. в порівнянні з 2015 р.

3. Аналіз результатів бактеріологічних досліджень проб, відібраних з об'єктів довкілля щодо виявлення *S. aureus* упродовж дослідного періоду

2015–2019 рр. показав, що *S. aureus* виділявся в межах від 0,04 до 0,3 %. Під час виконання планових заходів державного нагляду Держпродспоживслужби у 2019 р. було виявлено найбільшу кількість випадків щодо контамінації *S. aureus* у закладах громадського здоров'я – 1,3 %. У дитячих закладах у цьому ж році невідповідності по *S. aureus* було зареєстровано у 0,8 % випадках, у лікувальних закладах цей показник склав 0,6 %.

4. Всі 39 досліджуваних ізолятів *S. aureus* мають характерні: морфологічні й тинкторіальні відповідності, особливості культурального росту на простих та диференційно-діагностичних середовищах, ферментативну здатність до розщеплення глюкози, лактози, сахарози й маніту з утворенням кислоти без газу та відсутність ферментів до розщеплення мальтози; позитивні тести на продукцію каталази, лецитинази, коагулази та наявність α -токсину (α -гемолізіну), який забезпечував β -гемоліз на кров'яному агарі.

5. Рівень антибіотикорезистентних штамів *S. aureus* серед 39 досліджуваних складає 82,1 %. Стійкість *S. aureus* до антибіотиків третього й четвертого поколінь складає 15,8 % (тобраміцин), 11,8 % (ванкоміцин) та 7,9 % (лінезолід). Чутливість до антибіотиків виявлено в 17,9 % штамів *S. aureus* серед 39 досліджених.

6. Встановлено, що питома частка штамів *MRSA* складає 53,8 % серед 39 досліджуваних штамів *S. aureus*, що свідчить про високий рівень їхньої поширеності у харчовому ланцюзі.

7. Штами *MRSA* володіють властивістю утворювати біоплівки з різним рівнем активності їх формування, що підтверджено 57,1 % сформованих біоплівок із високим рівнем оптичної щільності та 28,6 % з середнім рівнем.

8. 42,9 % досліджуваних штамів *MRSA* стійкі до дезінфікуючого засобу № 1 (в 100 мл препарату: бензилконію хлорид – 5,0 г; глутаровий альдегід – 10,0 г; формальдегід – 14,8 г) у концентрації 0,25 % за експозиції 30 хв та 14,3 % штамів стійкі до дезінфікуючих розчинів № 2 (в 1 кг препарату: гліоксалевий альдегід – 5,0 г; глутаровий альдегід – 115,0 г; бензальконій хлорид – 240,0 г; додецилдиметиламоній хлорид – 5,0 г) і № 3 (глутаровий альдегід – 8 %; гліоксалевий альдегід – 8 %; четвертинні амонієві сполуки – 20 %; полігексаметилен гуанідин гідрохлорид – 1 %) у концентрації 0,05 % за експозиції 30 хв.

9. Аналіз результатів проведених досліджень підтверджує необхідність створення і впровадження в Україні єдиної системи бактеріологічного моніторингу *S. aureus* із постійним поповненням інформації, зібраної на території держави та інтерпретації результатів досліджень для глобального вирішення проблеми з контрольованого застосування антибіотиків.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для практики державних та виробничих лабораторій, а також для біотехнологічного виробництва запропоновано:

1. Штам *MRSA* «22-22» для внутрішньо лабораторного контролю якості мікробіологічних досліджень, розроблення діагностикумів та використання

в якості тест-культури (позитивного контролю) (*Свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії Державного науково-дослідного контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів від 18.02.2019 р.*).

2. «Методичні вказівки щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» (*затверджено науково-методичною радою Державної фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 25 грудня 2014 р.*).

3. Методичні вказівки «Сучасні методи визначення чутливості та виявлення механізмів резистентності *S. aureus* до антибактеріальних препаратів» (*затверджено Вченою радою Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, протокол № 1 від 27.02.2019 р.*).

4. «Методичні рекомендації з визначення бактерицидної активності дезінфікуючих засобів на бактеріях у біоплівках» (*затверджено Вченою радою Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, протокол № 1 від 24.02.2020 р.*).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України,

у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних

1. Гаркавенко Т. О., **Козицька Т. Г.**, Ординська Д. О., Меженська Н. А., Семенчукова І. В. Метицилінрезистентний стафілокок (*MRSA*) – стан проблеми у світі та в Україні. Ветеринарна біотехнологія. 2015. Вип. 26. С. 41–51. (*Здобувачем взято участь в аналізі та зборі даних, формулюванні висновків та написанні статті*).

2. **Козицька Т. Г.**, Гаркавенко Т. О. Аналіз результатів дослідження щодо наявності метицилінрезистентного стафілокока (*MRSA*) в харчових продуктах тваринного походження. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2018. Т. 20. № 87. С. 112–115. (*Здобувачем взято участь в проведенні експериментальних досліджень, аналізі отриманих результатів, формулюванні висновків та підготовці статті*).

3. Гаркавенко Т. О., **Козицька Т. Г.**, Горбатюк О. І., Коваленко В. Л. Вивчення стійкості антибіотикорезистентних штамів *S. aureus* до дезінфікуючих засобів з різними діючими речовинами. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2019. Вип. 20. № 2. С. 183–193. (*Здобувачем взято участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті*).

4. Горбатюк О. І., Гаркавенко Т. О., **Козицька Т. Г.**, Ординська Д. О., Мусієць І. В., Щур Н. В. Бактеріологічний моніторинг стафілокової інфекції у свиней, сировині і продукції із свинини на території України та біологічні ризики для людини. Науково-технічний бюлетень Державного науково-

дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2019. Вип. 20. № 2. С. 194–200. *(Здобувачем взято участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).*

5. Гаркавенко Т. О., Горбатюк О. І., **Козицька Т. Г.**, Андріящук В. О., Кухтин М. Д., Коваленко В. Л., Мусієць І. В., Ординська Д. О. Вивчення здатності до формування біоплівки польовими ізолятами *S. aureus*, виділеними із сировини і продукції тваринного походження. Ветеринарна біотехнологія. 2020. Вип. 37. С. 20–30. *(Здобувачем взято участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).*

**Стаття у науковому виданні України,
включеному до міжнародної наукометричної бази даних
Web of Science**

6. Kovalenko V. L., Ponomarenko G. V., Kukhtyn M. D., Paliy A. P., Bodnar O. O., Rebenko H. I., **Kozytska T. G.**, Makarevich T. V., Ponomarenko O. V., Paliy A. P. Evaluation of acute toxicity of the «Orgasept» disinfectant. Ukrainian Journal of Ecology. 2020. Vol. 10. Iss. 4. P. 273–278. *(Здобувачем взято участь в аналізі отриманих результатів, формулюванні висновків та підготовці статті).*

Методичні рекомендації

7. Гаркавенко Т. О., Неволько О. М., **Козицька Т. Г.**, Ординська Д. О., Меженська Н. А. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки. К., 2019. 79 с. *(Затверджено науково-методичною радою Державної фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 25 грудня 2014 р. Здобувачем взято участь в написанні текстової частини вказівок).*

8. Гаркавенко Т. О., **Козицька Т. Г.**, Горбатюк О. І., Андріящук В. О., Азиркіна І. М., Дибкова С. М., Гаркавенко В. М., Мех Н. В. Сучасні методи визначення чутливості та виявлення механізмів резистентності *Staphylococcus aureus* до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки. К., 2019. 54 с. *(Затверджено Вченою радою Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, протокол № 1 від 27.02.2019 р. Здобувачем взято участь у проведенні досліджень, підготовці та написанні вказівок).*

9. Кухтин М. Т., Коваленко В. Л., Гаркавенко Т. О., Горбатюк О. І., **Козицька Т. Г.**, Болтик Н. П., Климик В. Т., Рущинська Т. М., Горюк Ю. В., Салата В. З. Методичні рекомендації з визначення бактерицидної активності дезінфікуючих засобів на бактеріях у біоплівках. К., 2020. 25 с. *(Затверджено Вченою радою Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, протокол № 1 від 24.02.2020 р. Здобувачем взято участь у проведенні досліджень, підготовці та написанні вказівок).*

Тези наукових доповідей

10. **Kozytska T., Garkavenko T.** Analysis of the results of the study on the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus (MRSA)* in food products of animal origin. 3rd Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Kyiv, Ukraine, 16–20 April 2018: abstract. Kyiv, 2018. P. 296. (Здобувачем взято участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та написанні тез).

11. **Kozytska T., Garkavenko T.** Circulation of methicillin-resistant *Staphylococcus (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. (Здобувачем взято участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та написанні тез).

АНОТАЦІЯ

Козицька Т. Г. Метицилінрезистентний стафілокок: поширення, біологічні властивості та діагностика. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія. Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2021.

Дисертацію присвячено дослідженням із вивчення проблеми поширення на території України метицилінрезистентних штамів *S. aureus (MRSA)*. Робота містить аналіз результатів проведених бактеріологічних досліджень щодо поширення *S. aureus* серед тварин, в зразках продукції тваринного походження та об'єктів довкілля, які підлягають ветеринарно-санітарному контролю.

У дисертації викладено матеріали щодо результатів виявлення та підтвердження основних біологічних властивостей *S. aureus*, показано результати з визначення чутливості до антибактеріальних препаратів ізолятів *S. aureus* та вивчення рівня поширеності *MRSA*, виявлених методом скринінга із застосуванням специфічного цефалоспоринового маркера цефоксітіну та проведення досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі для виявлення гену *mec-A*. Вивчено біоплівкоутворюючі властивості у досліджуваних *S. aureus*. Одержано результати досліджень щодо стійкості штамів *MRSA* до дезінфікуючих засобів із різними діючими речовинами.

Ключові слова: антибіотикорезистентність, *S. aureus*, *MRSA*, скринінг, специфічний маркер, цефоксітін, дезінфікуючі засоби.

АННОТАЦИЯ

Козицкая Т. Г. Метицилинрезистентный стафилокок: распространение, биологические свойства и диагностика. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2021.

Диссертация посвящена изучению распространения стафилококкоза в Украине за период 2015–2019 гг. среди животных, контаминации *S. aureus* продукции животного происхождения и объектов окружающей среды, изучению биологических свойств *S. aureus*, выявлению у изолятов *S. aureus* гена *tesA* и определению доли *MRSA*.

Благодаря результатам исследований, установлен высокий уровень циркуляции возбудителя стафилококкоза среди различных видов животных в Украине.

Анализ результатов исследований по выявлению *S. aureus* в образцах продукции животного происхождения показал, что самый высокий уровень загрязнения наблюдался в баранине – 10,8 %, в образцах другой продукции животного происхождения количество выделенных *S. aureus* значительно снизилось, что связано с обязательным введением на всех предприятиях пищевой промышленности системы производственного контроля НАССР.

Анализ результатов проведенных исследований на наличие *S. aureus* среди образцов, отобранных из объектов окружающей среды показал, что среди 315579 исследований было выявлено 487 (0,2 %) несоответствий.

Проведено исследование по изучению резистентности и выведены антибиотикограммы общего профиля 39 исследуемых изолятов *S. aureus*. Определяли чувствительность к 12 группам антибактериальных препаратов. Анализ результатов исследований показал существенное распространение резистентных стафилококков (82,1 % от общего количества исследованных изолятов).

Изучен уровень распространенности *MRSA* среди животных, в образцах продукции животного происхождения, объектах окружающей среды с помощью скрининговых исследований с цефокситином в качестве специфического маркера; установлено, что доля штаммов *MRSA* среди 39 исследуемых составляла 53,8 %. Это говорит о высоком уровне их распространенности в пищевой цепи. Также было проведено прямое определение гена *tesA* полимеразная цепная реакция в режиме реального времени для подтверждения идентификации *MRSA*, в результате чего было подтверждено его наличие в 53,8 %.

Для контроля качества проведения микробиологических исследований в качестве тест-культуры (положительного контроля), задепонирован штамм *S. aureus* «22-22» с геном *tesA*. Содержащий ген *tesA* штамм *S. aureus* «22-22» задепонирован в качестве тест-культуры для контроля качества проведения микробиологических (и молекулярно-генетических) исследований.

В диссертации освещена проблема способности стафилококков к биопленкообразованию. Анализ результатов исследований показал актуальность исследований в данном направлении, поскольку изучаемые штаммы *S. aureus* в 85,7 % случаев обладали свойством образовывать биопленки

с разным уровнем активности их формирования, что подтверждает стратегию выживания этих бактерий в занимаемых ими экологических нишах.

Часть диссертации была посвящена проведению исследований изолятов *S. aureus* на определение устойчивости к дезинфицирующим средствам с различными действующими веществами.

Анализ полученных результатов исследований показал, что штаммы *MRSA* были устойчивыми к различным средствам в низких концентрациях, хотя производитель рекомендовал указанные концентрации для обезвреживания возбудителя на поверхностях объектов, подтверждает вероятность формирования определенных одинаковых механизмов защиты от антибактериальных препаратов и дезинфицирующих средств. Анализ полученных результатов исследований показал, что штаммы *MRSA* были устойчивыми к различным средствам в низких концентрациях, рекомендованных производителем, для обезвреживания возбудителя на поверхностях объектов. Это указывает на вероятность формирования подобных механизмов защиты у *MRSA* к антибактериальным препаратам и дезинфицирующим средствам.

Сложившаяся ситуация показывает актуальность разработки и внедрения национальной программы бактериологического мониторинга *MRSA* в рамках концепции «Единое здоровье», для проведения оценки рисков, предотвращения их распространения среди животных, людей, в пищевых продуктах и объектах окружающей среды.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, *S. aureus*, *MRSA*, ген *mecA*, антибиотики, цефокситин, дезинфицирующие средства.

ANNOTATION

Kozytska T. G Methicillin-Resistant Staphylococcus: Prevalence, Biological Properties and Diagnosis. – Qualifying scientific research on the rights of a manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of veterinary sciences on a specialty 16.00.03 «Veterinary Microbiology, Epizootology, Infectious Diseases and Immunology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to researches on studying of a problem of distribution in the territory of Ukraine of methicillin-resistant strains of *S. aureus* (*MRSA*). The paper contains an analysis of the results of bacteriological studies on the prevalence of *S. aureus* among animals, in samples of products of animal origin and environmental objects that are subject to veterinary control.

The dissertation presents materials on the results of detection and confirmation of the main biological properties of *S. aureus*. The results for determining the sensitivity to antibiotics of *S. aureus* isolates are shown. Studying the prevalence of *MRSA* detected by screening using a specific cephalosporin marker cefoxitin and conducting polymerase chain reaction in real time studies to detect the *mec-A* gene. The biofilm-forming properties of the studied *S. aureus* were studied. The

results of research on the resistance of *MRSA* strains to disinfectants with different active substances were obtained.

Key words: antibiotic resistance, *S. aureus*, *MRSA*, screening, specific marker, cefoxitin, disinfectants.

Підписано до друку 19.03.2021 року. Формат 60x84\16
Ум. друк. арк. 0,9 Обл.-вид.арк. 0,9
Наклад 100 прим. Зам. № 210130

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, тел.: 527-81-55, e-mail: nubip_druk@ukr.net
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4097 від 17.06.2011

