

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет ветеринарної медицини
Інститут післядипломного навчання керівників та спеціалістів
ветеринарної медицини

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ДОСЛІДЖЕННЯ
СТАФІЛОКОКІВ: МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ
ДІАГНОСТИКИ

Методичні рекомендації

Біла Церква
2024

Укладачі: Шевченко М.В. асистент;

Андрійчук А.В. канд. вет. наук, доцент;

Тарасов О.А. канд. вет. наук, ст. наук. співробітник;

Мазур Т.Г. канд. вет. наук, доцент;

Богатко Н.М. док. вет. наук, професор;

Савченко М.О. доктор філософії, асистент;

Наумчук В.С. зав. бактеріологічного відділу ВРДЛДПСС

Петрук І.П. провідний лікар вет. мед. бактеріологічного
відділу ВРДЛДПСС

Царенко Т.М. канд. вет. наук, доцент;

Сучасні підходи до дослідження стафілококів: мікробіологічні та молекулярно-генетичні методи діагностики / Шевченко М.В., Андрійчук А.В., Тарасов О.А., Мазур Т.Г., Богатко Н.М., Савченко М.О., Наумчук В.С., Петрук І.П. та Царенко Т.М. Біла Церква – 2024 – 49 с.

Методичні рекомендації «Сучасні підходи до дослідження стафілококів: мікробіологічні та молекулярно-генетичні методи діагностики» розроблені для слухачів Інституту післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини, практикуючих ветеринарних лікарів, працівників лабораторій та студентів факультетів ветеринарної медицини України. Методичні рекомендації фокусуються на сучасних методах діагностики стафілококів, в тому числі поєднанні мікробіологічних та молекулярно-генетичних підходів. Для кращого розуміння проблематики наведені теоретичні відомості про біологічні особливості цих бактерій.

Рецензенти:

Корнієнко Л.Є., д-р вет. наук, професор, головний науковий співробітник науково-дослідного епізоотологічного відділу ДНДІЛДВСЕ;

Зоценко В.М., к.вет.н., доцент кафедри мікробіології та вірусології

©БНАУ, 2024

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1. ХАРАКТЕРИСТИКА РОДУ	5
1.1. Зоонозний потенціал та поширення	5
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.3. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	8
1.4. Інші коагулазопозитивні стафілококи	9
1.5. Коагулазонегативні стафілококи	10
2. ПАТОГЕНЕЗ І ПАТОГЕННІСТЬ	11
2.1. Фактори патогенності	11
2.2. Біоплівка як фактор патогенності	12
2.3. Стафілококове харчове отруєння	13
3. СТІЙКІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ	14
3.1. Метицилінрезистентні стафілококи	14
3.2. Стійкість до інших груп антибіотиків	15
4. МІКРОБІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СТАФІЛОКОКІВ	18
4.1. Стафілококи в порівнянні з іншими грампозитивними коками	18
4.2. Відбір зразків та ізоляція збудника	18
4.3. Видові характеристики	20
4.4. Біохімічні набори	21
4.5. Хромогенні середовища	22
4.6. Визначення стійкості до антибіотиків	23
4.7. Вибір антибіотика для ідентифікації метицилін стійких стафілококів	25
4.8. Використання хромогенних середовищ для діагностики метицилін стійкого золотистого стафілокока	25
4.9. Вивчення біоплівкоутворюючих властивостей	26
4.10. Національні стандарти що регламентують мікробіологічну діагностику <i>Staphylococcus spp.</i>	28
5. МОЛЕКУЛЯРНО ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СТАФІЛОКОКІВ	30
5.1. Полімеразна ланцюгова реакція	30
5.2. Праймери націлені на фрагменти гена термонулкази	31
5.3. Інші досліджувані цільові гени	31
5.4. Дослідження геному	32
5.5. MALDI-TOF MS	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	35
ДОДАТОК 1 МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТЕСТИ ДЛЯ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СТАФІЛОКОКІВ	37
ДОДАТОК 2 МІКРОБІОЛОГІЧНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ СТАФІЛОКОКІВ	42
ДОДАТОК 3 ПРИКЛАДИ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ СХЕМ ІДЕНТИФІКАЦІЇ СТАФІЛОКОКІВ	45

ВСТУП

Стафілококи є одними з найпоширеніших патогенів, що викликають захворювання у тварин. Вони можуть спричиняти гнійно-запальні процеси, інфекції шкіри та м'яких тканин, мастити, пневмонії та сепсис у багатьох видів тварин, зокрема у великої рогатої худоби, дрібної рогатої худоби, свиней, кішок, собак та птахів.

Стафілококи є збудниками інфекцій завдяки наявності великої кількості різноманітних факторів патогенності та вірулентності, котрі сприяють проникненню бактерій в організм, уникненню імунної відповіді та руйнуванню клітин макроорганізму. Ці фактори належать до таких груп: фактори адгезії, ферменти, фактори ухилення від імунної відповіді, секреторні системи, токсини.

Особливе значення мають коагулазопозитивні стафілококи, серед яких найнебезпечнішим є *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus spp. – це універсальні та адаптивні бактерії, здатні набувати стійкості до антибіотиків.

Із розвитком молекулярно-генетичних методів дослідження стафілококів виявляється дедалі більше нових видів цих бактерій. Це ставить перед лабораторними працівниками завдання впровадження ефективних підходів для точної ідентифікації окремих видів стафілококів, адже вони можуть мати схожі культуральні та біохімічні властивості.

Особливо гостро постає питання диференціації патогенних і умовно-патогенних видів, здатних викликати важкі інфекції. Коагулазопозитивні стафілококи – це коменсальні бактерії, що є частиною нормальної мікрофлори шкіри та носової порожнини, проте вони можуть викликати опортуністичні інфекції у тварин і людей. У ветеринарній бактеріології важливе значення мають дев'ять видів CoPS.

В цій методичці детально розглядаються сучасні підходи до дослідження стафілококів із використанням мікробіологічних, біохімічних та молекулярно-генетичних методів.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА РОДУ

Стафілококи – грампозитивні кокоподібні мікроорганізми із середнім діаметром від 0,8 до 1 мкм, групуватися в неправильні скупчення відомі як “виноградні грона” або які зазвичай розташовуються парами, тетрадами.

Ці бактерії нерухомі, спор та капсул не утворюють.

Існує понад 60 видів стафілококів, і більшість з них зустрічаються у тварин, але лише деякі з них є патогенними. Вони вважаються умовно-патогенними мікроорганізмами. Інфекції, спричинені стафілококами, часто є гострими та гнійними.

Два основні ветеринарні патогенні стафілококи, *Staphylococcus aureus* і *S. pseudintermedius* є коагулазопозитивними.

Коагулазонегативні стафілококи зустрічаються як комменсальні мікроорганізми та в навколишньому середовищі. Обидві групи стафілококів вважаються основним компонентом нормальної мікрофлори тварин і людини та іноді викликають опортуністичні інфекції.

1.1. Зоонозний потенціал та поширення

Стафілококи широко поширені в природі і зустрічаються в організмі ссавців і птахів по всьому світу. Вони колонізують носову порожнину, носоглотку, шкіру та слизові оболонки різних систем та органів.

Таблиця 1

Хвороби викликані *Staphylococcus* spp. у тварин

Вид	Господар	Хвороба
<i>S. aureus</i>	Більшість видів тварин	Абсцеси. Інфекція може бути системною. Поширена причина інфекцій після операції.
	Велика рогата худоба	Мастит: субклінічний, хронічний, гострий, підгострий або гангренозний. Імпетиго вимені: невеликі пустули, часто біля основи діжок.
	Вівці	Мастит: гострий, підгострий або гангренозний. Кліщова піємія ягнят (віком від двох до п'яти тижнів): пов'язана з сильною інвазією кліщів (<i>Ixodes ricinus</i>). Періорбітальна екзема: інфекція ясен, пов'язана з годівлею в загальному кориті. Дерматит: схильні до нього через подряпини від рослинності, наприклад, будяків.
	Кози	Мастит: гострий або підгострий. Дерматит.
	Свині	Мастит: гострий, підгострий і хронічний (ботріомікоз).

		Некротичний ендометрит. Імпетиго вимені: після саден від зубів поросят.
	Коні	Мастит: гострий. Ботріомікоз після кастрації.
	Кролі	Ексудативний дерматит у новонароджених. Абсцеси, кон'юнктивіти.
	Птиця	“Джмелева стопа”: піогранулематозне ураження підшкірної клітковини стопи, яке може охоплювати суглоби. Артрит і сепсис у індиків.
	Собаки та коти	Гнійні стани, подібні до тих, що і для <i>S. pseudintermedius</i> .
<i>S. aureus</i> <i>subsp.</i> <i>anaerobius</i>	Вівці	Ураження, подібні до казеозного лімфаденіту (<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>).
<i>S. pseudintermedius</i>	Собаки та коти	Піодермія собак (котів). Пустульозний дерматит у новонароджених та у дорослих. Піометра. Отит зовнішній (зазвичай у поєднанні з іншими збудниками). Інфекції дихальних шляхів, кісток, суглобів, ран, повік та кон'юнктиви.
<i>S. hyicus</i>	Свині	Ексудативний епідерміт у свиней віком до семи тижнів, спостерігається системне ураження і стан може бути смертельним. Септичний поліартрит, метрит, вагініт.
	Велика рогата худоба	Рідкісні випадки маститу та шкірних інфекцій.
	Коні	Шкірні інфекції.
<i>S. chromogenes</i>	Жуйні, свині, коні, коти	Субклінічний мастит. Ексудативний епідерміт. Дерматит (рідко).
<i>S. delphini</i>	Дельфіни	Гнійні ураження шкіри.
<i>S. felis</i>	Коти	Отит, абсцеси, дерматит, цистит, кон'юнктивіт.
<i>S. coagulans</i>	Собаки	Зовнішній отит.

1.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus є одним з найбільш вивчених видів стафілококів і відомий своєю здатністю викликати різні інфекційні захворювання у людей та тварин.

Цей вид стафілокока має значний потенціал передачі між різними видами тварин і є розповсюдженим зоонозним збудником. Внаслідок генетичної різноманітності штамів *S. aureus*, існує сильна кореляція між філогенетичним походженням ізолятів *S. aureus* і тропізмом господаря. Однак *S. aureus* швидше ніж інші бактеріальні патогени може передаватися і пристосовуватися до різних видів тварин і людини. Ключовий елемент, що визначає властивості *S. aureus* це мобільні генетичні елементи, оскільки вони часто несуть специфічні для господаря гени виживання та вірулентності.

Мастит – це запалення молочної залози, яке може бути спричинене інтрамаммарними інфекціями. *S. aureus* в основному викликає контагіозні форми хвороби, коли один штам швидко поширюється по всьому молочному стаду. Інфекції спричинені *S. aureus* у молочної худоби найчастіше пов'язані з ураженням вимені, також можливі різноманітні шкірні інфекції, такі як імпетиго або фолікуліт.

Мастит також є основною хворобою, яку викликає *S. aureus* у овець та кіз. *S. aureus* викликає гострий гангренозний мастит до і після пологів і є дуже стійким під час лактації у кіз. Козині та овечі ізоляти *S. aureus* мають високий рівень спорідненості. *S. aureus* може колонізувати організм свиней, проте рідко викликає інфекції. Натомість шкірні інфекції такі як ексудативний епідерміс у свиней, набагато частіше спричинені *S. hyicus*, який виробляє специфічні для свиней ексфоліативні токсини (ExhA, ExhB, ExhC та ExhD).

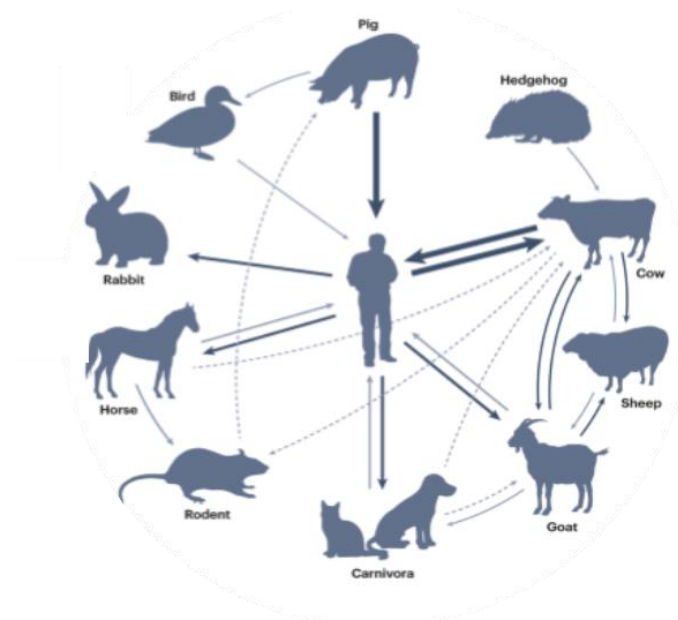


Рис. 1. **Напрями передача *S. aureus* між тваринами та людиною**

(Джерело: Park et al., 2021)

Адаптовані до птахів ізоляти *S. aureus* мають розширену оптимальну температуру росту 42 °С, що є середньою температурою тіла птахів, тоді як штами, адаптовані до ссавців, оптимально ростуть при 37 °С. *S. aureus* у

домашньої птиці є нормальною частиною флори, але також є найпоширенішим патогеном, виділеним з уражень, пов'язаних з інфекціями шкіри, кісток і суглобів. Він також поширений у птахівничих цехах.

S. aureus також є поширеним патогеном серед домашніх тварин-компаньйонів, таких як собаки та коти. У цих тварин він може викликати інфекції шкіри та м'яких тканин, такі як піодермія та отит. *S. aureus* є однією з основних причин маститу у сук. Також у котів та собак він може спричиняти інфекції сечовивідних шляхів. Слід зазначити що цей вид стафілококів не такий поширений як *S. pseudintermedius* у собак або *S. felis* серед котів.

Ізоляти *S. aureus* з тварин-компаньйонів тісно пов'язані з людськими штамми, що вказує на часту міжвидову передачу цього мікроорганізму між людьми та їх домашніми улюбленцями. Деякі дослідження виявили ідентичні ізоляти *S. aureus* у власників собак та котів і їх тварин. Це свідчить про можливість двосторонньої колонізації та передачі інфекції між людьми і компаньйонами.

1.3. *Staphylococcus pseudintermedius*

S. pseudintermedius – це бактерія, яка вважається умовно-патогенним мікроорганізмом у собак, що спричиняє широкий спектр інфекцій, таких як піодермія, бактеріємія, інфекції та ускладнення післяопераційного періоду.

S. pseudintermedius був вперше описаний у 2005 році після молекулярного аналізу ізолятів від кота, собаки, коня та папуги. Пізніше декілька груп дослідників довели, що всі їхні штами від собак, котів та людей які раніше були ідентифіковані як *S. intermedius* належать до роду *S. pseudintermedius*.

На сьогодні все частіше повідомляється про випадки колонізації людини та інфекції, викликані *S. pseudintermedius*.

Тісний контакт між тваринами-компаньйонами (особливо собаками та котами), їхніми власниками та іншими людьми, такими як ветеринари, збільшує ймовірність адаптації *S. pseudintermedius* в організмі людини. Інфекції спричинені *S. pseudintermedius* у людей пов'язані не тільки з укусами тварин, а й з протезними інфекціями, ураженням різних систем та органів.

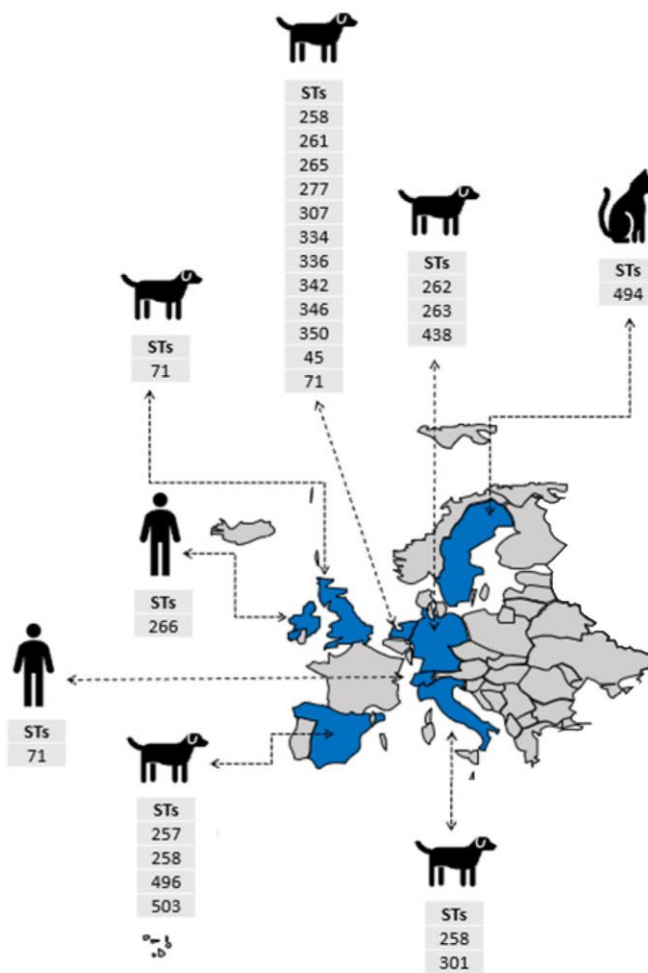


Рис. 2. Поширення генотипів *S. pseudintermedius*
(Джерело: Moses et al., 2023)

1.4. Інші коагулазопозитивні стафілококи

S. hyicus є збудником ексудативного епідерміту у свиней, генералізованої шкірної інфекції, що характеризується відшаруванням шкіри, надмірним виділенням сальних залоз і утворенням коричневого шару ексудату, який може покривати все тіло. Штами *S. hyicus* можна вважати патогенними або непатогенними відповідно до їх здатності індукувати ексудативний епідерміт у свиней і їх здатності продукувати ексfolіативні токсини, які є основними факторами вірулентності, необхідними для індукції захворювання.

S. coagulans (раніше *S. schleiferi subsp. coagulans*) вражає домашніх тварин та зустрічається як збудник піодермії, зовнішнього та середнього отиту у собак і кішок.

S. intermedius, *S. pseudintermedius* і *S. delphini* класифікуються як члени групи *S. intermedius* (SIG). Хоча *S. pseudintermedius* найпоширеніший збудник інфекцій у собак *S. delphini* та *S. intermedius* також можуть зустрічатися як збудник інфекційного процесу. *S. intermedius* є частиною нормальної ротової флори собак, також зустрічається у в ротовій порожнині та на поверхнях

птахів, норок, котів, лисиць, єнотів, сірих білок, кіз та коней. *S. intermedius* виявляли в молоці від хворих на мастит корів.

Хоча детальне біохімічне тестування може відрізнити *S. delphini* від *S. pseudintermedius* і *S. intermedius*, останні два види можна надійно розрізнити лише за допомогою молекулярних тестів.

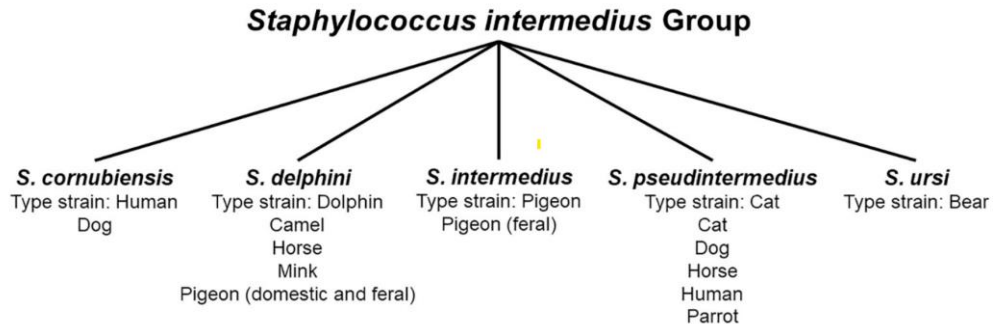


Рис. 3. Види стафілококів що входять до SIG
(Джерело: Carroll et al., 2021)

1.5. Коагулазонегативні стафілококи

Коагулазонегативні стафілококи (CoNS) – це різноманітна група бактерій роду *Staphylococcus*, у яких відсутній фермент коагулаза. Це умовно-патогенні мікроорганізми, здатні викликати цілу низку інфекцій, особливо в медичних установах. Деякі представники цієї групи мають потенціал міжвидової передачі, та можуть бути зоонозними агентами.

S. lugdunensis та *S. schleiferi* можуть ставати потенційними зоонозними патогенами. Ці види часто не враховуються в рутинних клінічних діагностичних протоколах. *S. lugdunensis* історично асоціюється із захворюваннями людини, який рідко викликає хвороби у тварин. *S. schleiferi*, з іншого боку, зазвичай асоціюється зі шкірними інфекціями у собак та котів, але нещодавно був ідентифікований і як патоген людини. *S. schleiferi*, так і *S. lugdunensis* продемонстрували здатність продукувати гени токсинів, включаючи стафілококові ентеротоксини та токсин синдрому токсичного шоку.

S. epidermidis, найбільш поширений і клінічно значущий вид стафілокока, має надзвичайну здатність утворювати біоплівки, які відіграють вирішальну роль у його колонізації та інфікуванні медичних виробів.

S. caprae, який часто зустрічається на шкірі тварин і людини, може викликати мастит у кіз і був пов'язаний з кістково-суглобовими інфекціями і бактеріємією у людей. *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* виділяють з молока хворих на мастит корів. Ці види зазвичай викликають субклінічний або легкий клінічний мастит, але також повідомлялося, що вони можуть викликати серйозні місцеві та системні інфекції. У рутинній діагностиці маститу CoNS зазвичай не ідентифікують на видовому рівні, а розглядають як єдину групу.

2. ПАТОГЕНЕЗ І ПАТОГЕННІСТЬ

2.1. Фактори патогенності

Стафілококи – це гноєтворні бактерії, що спричиняють утворення абсцесів і нагноєння. Після проникнення через уражену шкіру, патогенні види стафілококів, здатні спричиняти гнійні інфекції глибоких тканин і залишаються локалізованими. Гній складається з загиблих лейкоцитів, живих і мертвих бактерій. Спочатку абсцес оточений неущкодженими фагоцитуючими клітинами та нитками фібрину. Згодом навколо абсцесу формується фіброзна капсула.

Патогенні стафілококи виробляють велику кількість токсинів і ферментів але значення багатьох з них у патогенезі захворювання до кінця не вивчено. *Ентеротоксини* (А-Е) спричиняють токсикоінфекції (переважно ентеротоксин А). Вони діють шляхом рефлекторної стимуляції блювотного центру. *Ексфоліативний* токсин викликає стафілококовий синдром опшпареної шкіри у цуценят. *Епідермолітичні* токсини причетні до ексудативного епідерміту свиней та стафілококових захворювань шкіри у людей і собак. *Альфа-токсин* (гемолізін) асоціюється з гангренозним маститом у великої рогатої худоби. Цей токсин викликає порушення лізосомальних процесів у лейкоцитах, а також впливає на гладку мускулатуру, що призводить до звуження, паралічу і зрештою, некрозу стінок кровоносних судин. *Лейкоцидин* вбиває нейтрофіли і макрофаги великої рогатої худоби, кроликів і людини.

Таблиця 2

Фактори вірулентності стафілококів

Функції сполук	Фактори вірулентності
Адгезія	Фібронектин-зв'язуючий білок (FnBPA/B), фактор згортання крові (ClfA), еластин-зв'язуючий білок (Ebp), позаклітинний міжклітинний білок адгезії (Eap)
Фермент	Коагулаза, фактор Віллебранда (vWbp), стафілокіназа, термонуклеаза, ауреолізін, серинова протеаза, ексфоліативний токсин, стафопаїн, гіалуронат-ліаза, ліпаза
Ухилення від імунітету	Капсула, біоплівка, білок, що інгібує хемотаксис (CHIPS), стафілококовий білок А (білок А), другий імуноглобулін-зв'язуючий білок (Sbi)
Система секреції	Система секреції типу VII
Токсин	Фенолрозчинні модуліни (PSMs), гемолізینی (α -гемолізін, β -гемолізін і γ -гемолізін), лейкоцидини (наприклад, лейкоцидин Пантона-Валентина [PVL], LukMF'), суперантигени (SAg) (наприклад, стафілококовий ентеротоксин і токсин синдрому токсичного шоку)

2.2. Біоплівка як фактор патогенності

Стафілококи визнані найчастішими причинами інфекцій, пов'язаних з біоплівкою. Цей винятковий статус серед патогенів, асоційованих із біоплівкою, пояснюється тим фактом, що стафілококи є поширеними коменсальними бактеріями на шкірі та слизових оболонках.

Біоплівка – це організоване скупчення мікроорганізмів усередині матриці позаклітинної полімерної речовини, яку вони виробляють. Бактеріальні біоплівки зазвичай мають патогенну природу і можуть викликати внутрішньолікарняні інфекції.

Процес утворення біоплівки складається з декількох етапів, починаючи з прикріплення до живої чи неживої поверхні, що призведе до утворення мікроколонії, утворюючи тривимірні структури і закінчуючи, після дозрівання, від'єднанням. Під час формування біоплівки кілька видів бактерій спілкуються один з одним, використовуючи кворум-сенсинг. Утворення позаклітинних полімерних речовин (ЕПС) відбувається на етапі прикріплення біоплівки до поверхні.

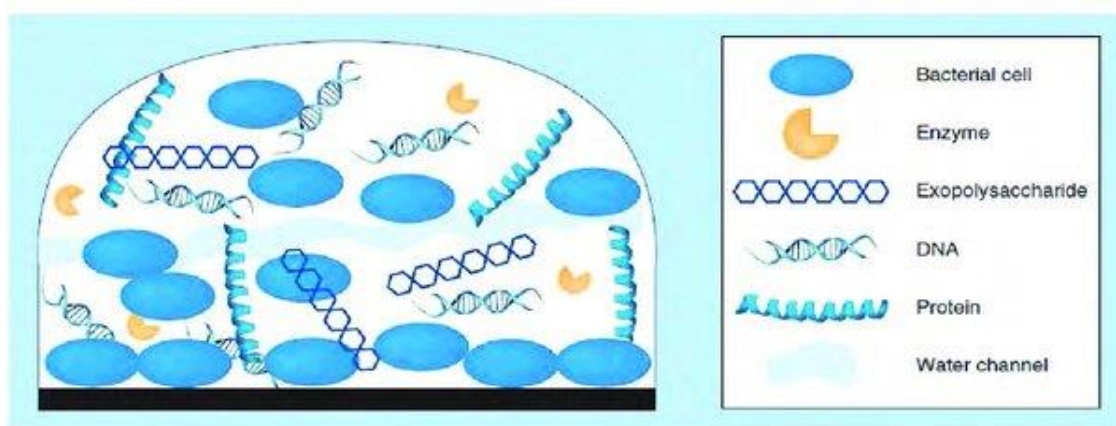


Рис. 4. Структура біоплівки
(Джерело: Sangwan et al., 2019)

Формування біоплівки стафілококами відбувається послідовно в кілька етапів. Спочатку бактерії прикріплюються до поверхні за допомогою спеціальних адгезивних факторів, таких як мікробні поверхневі адгезини. Вони забезпечують міцне з'єднання стафілококів з субстратом. На цьому етапі дуже важливо перервати процес адгезії, оскільки подальше закріплення бактерій стає практично незворотним. Приєднання стафілококів до неживих поверхонь відбувається значно ефективніше, ніж до тканин організму. Це пов'язано з тим, що імунна система здатна розпізнавати та знешкоджувати окремі планктонні клітини під час первинної адгезії.

Наступною стадією після незворотної адгезії є перша стадія дозрівання біоплівки стафілококів. Відбувається синтез та накопичення позаклітинної полісахаридної матриці, яка складає основу біоплівки. Стафілококи продукують полісахариди, білки та інші компоненти, що формують

просторову структуру біоплівки. На другій стадії дозрівання, біоплівка збільшується в розмірах завдяки активному росту та поділу бактеріальних клітин всередині неї. Завершальним етапом є дисперсія, коли біоплівка частково руйнується або відшаровується. Це відбувається тоді, коли кількість клітин сягає критичного рівня. Стафілококи синтезують речовини, які розчиняють компоненти полісахаридної матриці. Бактерії переходять у планктонний стан і розповсюджуються, колонізуючи нові поверхні.

2.3. Стафілококове харчове отруєння

Стафілококове харчове отруєння спричинене попередньо сформованим токсином, виробленим бактеріями коагулазопозитивних стафілококів, які потрапили в забруднену їжу.

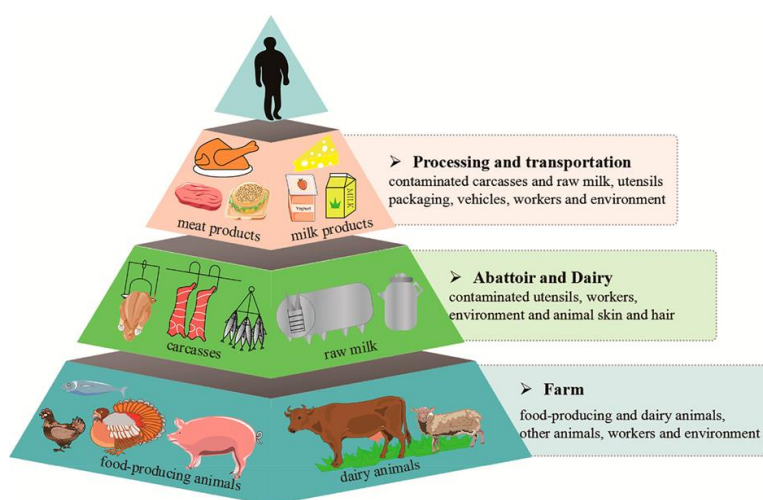


Рис. 5. Джерело ентеротоксинів продуктах харчування
(Джерело: Chunmei et al., 2021)

S. aureus зазвичай присутній на шкірі і може потрапити в їжу. Якщо їжу залишити при кімнатній температурі, бактерії можуть розмножуватися і виробляти ентеротоксин. Їжа, яка містить токсин стафілокока, може не виглядати зіпсованою.

Державні органи здійснюють контроль за поширенням стафілококів у харчових продуктах. Стандарт ISO 6888 установлює методику підрахунку коагулазопозитивних стафілококів, таких як *S. aureus*, в харчових продуктах та кормах.

Дотримання уніфікованих стандартних методик дозволяє отримувати надійні та порівнювані результати мікробіологічних досліджень стафілококів.

3. СТІЙКІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ

Стійкість до антимікробних засобів один з основних ризиків пов'язаних з розповсюдженням стафілококів в навколишньому середовищі. Стафілококи входять до списку ВООЗ з перспективних мікроорганізмів для розробки нових антибактеріальних засобів.

Стійкість до антимікробних препаратів виникає, коли стафілококи розвиваються так, щоб бути стійкими до ліків, які раніше були ефективні. Серед таких ліків – антибіотики, які призначені для убивання або пригнічення росту бактерій.

Застосування антимікробних препаратів у тварин може сприяти появі стійких бактерій, які можуть передаватися людям через харчовий ланцюг або прямий контакт. Це може призвести до зниження ефективності препаратів для лікування захворювань людини.

Глобальна загроза громадському здоров'ю полягає в зростанні кількості бактерій, стійких до декількох антибіотиків. Відсутність терапевтичних можливостей для лікування інфекцій у людей стає серйозною проблемою.

3.1. Метицилінрезистентні стафілококи

Метицилінрезистентні стафілококи (MPC) є одними з найпоширеніших сучасних патогенів. Вони належать до умовно-патогенної мікрофлори, тому добре адаптовані до тривалої колонізації організму людини чи тварини та до уникнення імунної відповіді.

В контексті ветеринарної медицини слід також враховувати тісний контакт домашніх тварин зі своїми власниками, що може сприяти передачі метицилінрезистентних штамів між людиною та твариною.

Стійкість *S. aureus* до метициліну (MRSA) вперше було встановлено у 1961 році. Перші повідомлення про MRSA у тварин датуються 1972 роком, коли такі штами були виявлені у собак. Це явище розвинулось в наслідок початку широкого застосування пеніциліну.

Стійкість до β -лактамних антибіотиків забезпечується в основному двома механізмами. Перший механізм стійкості виникає в результаті ферментативної деградації антибіотика під впливом ферменту β -лактамази. Бактерії, що виробляють цей фермент, розщеплюють β -лактамне кільце антибіотика, що призводить до втрати його антибактеріальної активності та робить його неефективним проти бактерій. β -лактамаза, вироблена стафілококами під впливом β -лактамних антибіотиків, починає виділяти фермент в позаклітинний простір. Ці ферменти гідролізують антибіотики та знижують кількість, нижче мінімальної інгібуючої концентрації, в наслідок чого вони втрачають свою ефективність проти бактерій.

Найчастіше резистентність виникає внаслідок мутацій існуючих ферментів β -лактамаз, що призводить до посилення їх активності. Продукція бета-лактамази опосередкована геном *blaZ*. Ці гени регулюються двома генами, відомими як *blaI* та *blaRI*.

Другий механізм резистентності – це цільова модифікація пеніцилін-зв'язуючих білків (ПЗБ). ПЗБ є білком, який входить до структури клітинної стінки бактерій і знаходиться на її поверхні. Ці білки є основними мішенями β -лактамних антибіотиків. Коли бактерії набувають специфічних генів стійкості, структура ПЗБ змінюється. Внаслідок цього β -лактамні антибіотики втрачають здатність ефективно зв'язуватися з ПЗБ, що знижує їхню здатність пригнічувати синтез клітинної стінки бактерій. Такі штами часто називають метицилінстійкими стафілококами (MPC).

Ген *mecA*, який кодує білок ПЗБ2а, є структурним компонентом генної касети *mec*, вбудованої у велику стафілококову касетну хромосому *mec* (SCC*mec*). Можливо, що цей ген був отриманий шляхом горизонтального перенесення від коагулазонегативного стафілокока. Порівняно з активними центрами нативних ПЗБ, активний центр ПЗБ2а розташований у вузькій розширеній щілині і його менше доступно для β -лактамів.

Стійкі до метицеліну штами стафілококів можуть бути пов'язані з лікарняним або позалікарняним середовищем. Госпітальні штами MPC на території ветеринарних та гуманних клінік. Тоді як позалікарняні штами часто пов'язані з неконтрольованим використанням антибіотиків в тваринництві. Навіть якщо штам належить до генотипу що нездатний до міжвидової передачі, він може передати гени антибіотикостійкості іншому зоонозному штамму. Якщо не застосувати заходи із зменшення та контролю розповсюдження стійких до метицеліну стафілококів, в наслідок селективного тиску вони можуть витіснити чутливі штами і надалі набуті множинної стійкості.

3.2. Стійкість до інших груп антибіотиків

Глікопептидні антибіотики діють шляхом блокування кінцевих етапів синтезу пептидоглікану, який є важливим компонентом клітинної стінки бактерій. Порушення формування клітинної стінки зрештою призводить до того, що бактеріальні клітинні стінки слабшають і лізуються під власним внутрішнім осмотичним тиском, що призводить до загибелі бактеріальної клітини.

Основним механізмом стійкості до глікопептидних антибіотиків, таких як ванкоміцин, є синтез специфічного білка – VanA. Він модифікує пептидний ланцюг пептидоглікану клітинної стінки порушує зв'язування антибіотиків з кінцевими амінокислотними залишками в пептидоглікані клітинної стінки стафілококів. В результаті, антибіотики не можуть інгібувати синтез пептидоглікану і стають неактивними.

Аміноглікозиди мають бактерицидну дію, пов'язану із пригніченням синтезу РНК в бактеріальних клітинах.

Механізм дії полягає інгібуванням РНК-полімерази і блокування елонгації РНК після синтезу короткого фрагмента довжиною декілька нуклеотидів. В результаті порушується нормальний синтез РНК і білків в бактерії, що призводить до її загибелі.

Стійкість до цієї групи антибіотиків відбувається шляхом активації виділення ферментів або інактивації мішені антибіотиків. В наслідок впливу антибіотиків стафілококи збільшують синтез ферментів, що діють на молекулу антибіотика.

Фторхінолони, мають бактерицидну дію, пов'язану з інгібуванням ферментів ДНК-гірази, які необхідні для реплікації бактеріальної ДНК.

Завдяки високій специфічності до бактеріальних ферментів цей антибіотик проявляє низьку токсичність щодо організму хазяїна.

Мутації в генах, які кодують ДНК-гіразу та топоізомеразу IV, можуть викликати зміни в структурі цих білків. Ці мутації можуть призвести до виникнення нових амінокислотних послідовностей в активних центрах ферментів, що впливає на їхню функцію.

Резистентність формується поетапно і формування клінічно значущої резистентності відбувається у випадку виникнення мутацій у генах, що кодують обидва ферменти.

Макролідні антибіотики мають бактериостатичну дію, пов'язану з порушенням синтезу білка в бактеріальних клітинах. Механізм їх дії полягає у зв'язуванні з 50S субодиницею рибосом бактерій, що призводить до блокування виходу з рибосоми. Це порушує процес подовження пептидного ланцюга під час трансляції і відповідно, синтез білка в бактеріях. Внаслідок інгібування синтезу білка порушуються основні метаболічні процеси бактеріальної клітини, що в кінцевому підсумку призводить до її загибелі.

Стафілококи набувають стійкості до макролідних антибіотиків шляхом модифікації бактеріальної рибосоми та виведення молекул антибіотика із бактеріальної клітини за допомогою транспортних білків. Модифікація рибосомального сайту-мішені викликає резистентність широкого спектра до всіх поколінь макролідних антибіотиків, тоді як виведення антибіотиків з бактеріальної клітини має менший вплив на розвиток стійкості.

Тетрацикліни мають бактериостатичну дію, пов'язану з порушенням синтезу білка в бактеріальних клітинах.

Механізм дії тетрациклінів полягає у їх зв'язуванні з 30S субодиницею бактеріальних рибосом, що блокує доступ тРНК до рибосоми. Це унеможливорює процес трансляції, внаслідок чого порушується подовження пептидного ланцюга та синтез білка.

Стійкі до тетрацикліну штами стафілококів виробляють білки рибосомального захисту, які зв'язуються з комплексом рибосома-тетрациклін, запобігаючи що інгібує дії антибіотика. Ці ферменти часто кодуються генами резистентності, набутими шляхом вертикального перенесення.

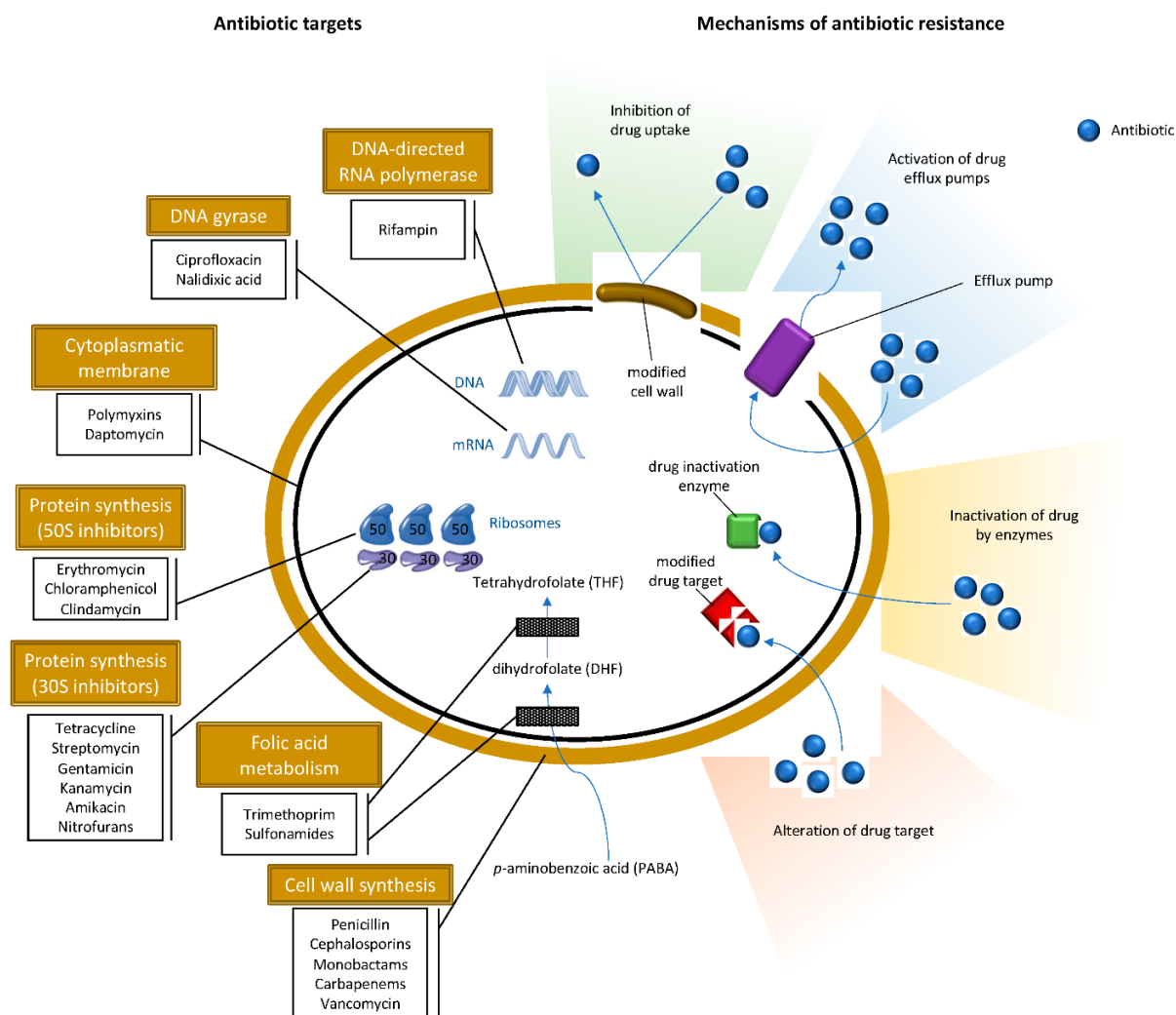


Рис. 6. Механізми дії різних груп антибіотиків
(Джерело: Silva et al., 2020)

Сульфаніламід та триметоприм мають бактеріостатичну дію. Механізм дії цих препаратів полягає у блокуванні ферментів, які беруть участь в метаболізмі фолієвої кислоти. Внаслідок цього гальмується біосинтез. Резистентність до сульфаніламідів і триметоприму в бактеріях може виникати в результаті набуття генів, які кодують дигідрофолатредуктазу і дигідрооптероатсинтетазу, стійких до інгібіції цими антибіотиками. Ці гени ферментів можуть виробляти модифіковані версії ферментів, які залишаються функціональними навіть при наявності сульфаніламідів і триметоприму.

4. МІКРОБІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СТАФІЛОКОКІВ

4.1. Стафілококи в порівнянні з іншими грампозитивними коками

Мікрококи – це аеробні, грампозитивні коки розміром від 0,5 до 2,0 мкм в діаметрі. Вони зустрічаються парами, тетрадами або скупченнями, але не ланцюжками. Вони є каталазопозитивними та часто оксидазопозитивними (що відрізняє їх від *Staphylococcus. spp.*), хоча ця реакція може бути слабкою. Колонії мікрококів можуть бути білими, але часто пігментованими, пігментація варіює від яскраво-жовтого до кремового, кремового або рожевого кольору (*M. roseus*). Мікроорганізми мають оптимальну температуру росту від 25 до 37 °С. Мікрококи є галотолерантні і ростуть на 5 % сольовому розчині.

Стрептококи – це грампозитивні кокоподібні бактерії, які зустрічаються парами або ланцюжками. Ці види каталазонегативні (що відрізняє їх від видів *S.*) і більшості з них потрібні збагачені середовища, такі як кров'яний агар. Традиційно мікробіологи класифікували ці бактерії на підкласи, досліджуючи їх зовнішній вигляд на кров'яному агарі; виникають три характерні моделі, які називаються альфа, бета і гамма гемоліз.

Ентерококи – це грампозитивні факультативно анаеробні коки з короткими та середніми ланцюжками. Як і стрептококи вони не виробляють фермент каталазу. Ентерококи можуть рости в середовищі з вмістом хлориду натрію до 6,5 %, та жовчного ескуліну. Ця характеристика відрізняє їх від інших грампозитивних коків.

4.2. Відбір зразків та ізоляція збудника

Клінічний матеріал з вогнищ інфекції може включати ексудат, гній з абсцесів, молоко, зіскрібки шкіри, сечу та уражені тканини. Для збереження життєздатності бактерій не потрібно вживати особливих запобіжних заходів, оскільки стафілококи відносно стійкі до висихання і зміни температури.

Ізоляція: первинним середовищем для посіву зразків є поживний агар або кров'яний агар. Чашки Петрі з середовищем культивують в аеробних умовах при 35–37 °С протягом 24–48 годин. На кров'яному агарі рясний ріст стафілококів зазвичай проявляється протягом 18–24 годин. Зразки із забруднених джерел також можуть бути посіяні на селективне середовище, яке пригнічує ріст грамнегативних мікроорганізмів, але дозволить рости стафілококам і деяким іншим грампозитивним кокам, наприклад, маніто-сольовий агар і середовище Берда-Паркера. Мазок з колоній, забарвлений за Грамом, виявить грампозитивні коки, хаотично розподілені в полі зору.

Культуральні характеристики: більшість колоній стафілококів мають діаметр від 1 до 3 мм протягом 24 годин і від 3 до 8 мм після 72 годин інкубації на повітрі при температурі 34–37 °С.

Типовий вигляд колоній більшості видів CoNS – не пігментовані, гладкі, цілісні, блискучі та непрозорі. Рідкісні сильні продуценти слизу мають мукоїдну морфологію колоній. Діаметр колоній досягає 3–6 мм після 3 днів інкубації.

Вони круглі, гладенькі, блискучі та на кров'яному агарі мають тенденцію виглядати значними та непрозорими (білими) порівняно з меншими, напівпрозорими (сірими) колоніями бета-гемолітичних стрептококів.

Пігментація: штами золотистого стафілококу від домашніх тварин майже завжди не пігментовані (білі), тоді як людські ізоляти зазвичай пігментовані, від кремово-жовтого до оранжевого кольору. Колонії *S. pseudintermedius* і *S. hyicus* також не пігментовані. Деякі з коагулазонегативних стафілококів виробляють пігмент, особливо штами *S. chromogenes*, колонії яких мають оранжево-жовтий колір. Вважається, що посилення пігменту у стафілококів індукується додаванням до середовища молока, жиру або моноацетату гліцерину.

Колонії *S. chromogenes*, *S. devriesei*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*, *S. warneri* та *S. xylosus* більш-менш регулярно мають колір від сірого до жовтого, жовтого або жовто-оранжевого. Інші види CoNS можуть мати пігментацію, яка зазвичай має жовтуватий відтінок.

Гемоліз: стафілококові гемолізینی (альфа, бета, дельта і гамма) можуть вироблятися окремо, в комбінації або не вироблятися взагалі. Гемолізینی відрізняються біохімічно та за ступенем впливом на еритроцити різних видів тварин. У ветеринарній діагностиці краще використовувати кров'яний агар, приготований з еритроцитами овець або биків, оскільки еритроцити обох видів тварин чутливі до альфа-гемолізинів і бета-гемолізинів.

S. aureus та *S. pseudintermedius* зазвичай є гемолітичними та викликають як альфа так і бета гемоліз. Альфа-лізін відповідає за вузьку зону чистого гемолізу безпосередньо навколо колонії, а бета-лізін – за ширшу зону неповного (часткового) гемолізу за межами зони, спричиненої альфа-лізином. Інші представник групи SIG також викликають гемоліз еритроцитів, тоді як *S. hyicus* є негемолітичним. Гемолітична активність у коагулазонегативних стафілококів варіабельна і часто проявляється повільно.

Вироблення коагулази: тест на коагулазу зазвичай добре корелює з патогенністю. Деякі патогенні стафілококи можуть бути негативними при використанні тесту плазмокоагуляції на склі, але позитивними на пробірковий тест (напр. *S. pseudintermedius*), це пов'язано з різними ферментними системами що викликають згортання плазми крові.

Плазма кролика містить фібриноген, який перетворюється на фібрин під дією ферментів стафілококової коагулази. “Зв'язана” коагулаза (фактор згортання) виявляється за допомогою предметного тесту, а “вільна” коагулаза – за допомогою пробіркового тесту. Хоча тест у пробірці є остаточним, тест на предметних скельцях можна використовувати як швидкий скринінговий тест на *S. aureus*.

4.3. Видові характеристики

S. aureus subsp. anaerobius не утворюють каталази і краще розвивається в анаеробних умовах. Через 48 годин при посіві крові колонії мають розмір від 0,5 до 2 мм, круглі, опуклі, гладкі, непігментовані, з рівними краями і гемолітичні. Гемоліз можна легко побачити після інкубації пластин при 4 °С. Цей організм буде рости анаеробно лише після першого виділення. Він позитивний до коагулази та гіалуронідази.

S. aureus навколо колоній часто мають типову подвійну зону гемолізу. Ізоляти від тварин зазвичай не пігментовані. Тести на каталазу та коагулазу позитивні. Коагуляція зазвичай спостерігається після чотирьох годин інкубації при 35 °С. Бета-галактозидазний тест, тест на виявлення продукції ацетоїну, стійкість до поліміксину Б і ферментація мальтози можуть бути використані для диференціації цього виду від *S. pseudintermedius*.

S. hyicus не утворює пігмент та не викликає гемоліз еритроцитів. Тест на каталазу позитивний, а тест на коагулазу варіабельний. У позитивних до коагулази ізолятів коагуляція спостерігається лише після 18–24 годин інкубації при 35 °С. Ідентифікація *S. hyicus* зазвичай базується на наступних тестах: відсутність гемолізу, відсутність бета-галактозидази, не виробляє ацетоїн, манітол не ферментує і виробляє гіалуронідазу. Тести на гіалуронідазу та бацитрацин можна використовувати для диференціації *S. hyicus* від *S. chromogenes*.

S. pseudintermedius утворює колонії розміром 1–2 мм у діаметрі, гладкі, злегка випуклі, непрозорі та не пігментовані. На кров'яному агарі викликає бета-гемоліз. Тести на каталазу і коагулазу позитивні, коагуляція зазвичай спостерігається після чотирьох годин інкубації при 35 °С. Бета-галактозидазний тест, ферментація трегалози і відсутність ферментації ксилози можуть бути використані для диференціації цього виду від інших стафілококів. Однак остаточна ідентифікація найбільш надійна за допомогою молекулярних методів. Важливо зазначити, що лабораторні методи, особливо ті, що базуються на фенотипових характеристиках, можуть не відрізнити види стафілококів, що входять до групи SIG один від одного та від *S. aureus*.

S. coagulans має колонії подібні до *S. pseudintermedius*: Каталазна та пробіркова коагулазна проби позитивні. Ізоляти стійкі до бацитрацину, не ферментують мальтозу і трегалозу, утворюють ацетоїн з глюкози (позитивний тест Фогеса-Проскауера).

S. felis утворює не пігментовані колонії, навколо яких можна виявити слабкий гемоліз. Тест на каталазу позитивний, а тест на коагулазу, негативний. Вони чутливі до новобіюцину та оксидазонегативні. Ізоляти *S. felis* дуже схожі на *S. simulans*. Ферментація манози, лужна фосфатаза і чутливість до бацитрацину можуть допомогти в їх диференціації. Відомо, що цей організм викликає отит, абсцес, дерматит, цистит і кон'юнктивіт у котів.

4.4. Біохімічні набори

Використання готових біохімічних наборів має значні переваги. Біохімічні панелі ефективно зменшують обсяг ручної праці лабораторних фахівців, оскільки в одній системі поєднано дослідження різних показників. Крім того, використання таких панелей сприяє економії часу та ресурсів лабораторії. Немає необхідності окремо закуповувати реагенти для кожного дослідження та проводити аналізи послідовно.

Біохімічні тест-системи, такі як API Staph, є ефективним методом швидкої диференціації стафілококів у лабораторній практиці.

Принцип методу полягає в аналізі ферментативної активності бактерій щодо набору субстратів. У тест-системі API Staph використовується 20 мікропробірок з дегідратованими субстратами. Після засіву пробірок суспензією досліджуваної культури та інкубації, за зміною забарвлення реагентів оцінюється здатність бактерій утилізувати певні субстрати.

На основі отриманого біохімічного профілю ідентифікація виду стафілокока проводиться автоматизовано за допомогою програмного забезпечення. Перевагами методу є висока швидкість, стандартизація процедури та можливість одночасно дослідити значну кількість зразків.



Рис. 7. Тест набір API Staph 20

Повністю позитивні тести (вгору) і всі негативні тести (внизу)
(Джерело: www.tgw1916.net)

Системи WELL D-ONE, виробництва CPM SAS (Італія), надають можливість отримання швидких результатів мікрокультуральним методом. Кожна система представляє собою поліпропіленову плашку в індивідуальній вакуумній упаковці з 32 конічними лунками. Ці лунки містять селективне поживне середовище, хромогени, антибіотики та інгібітори неспецифічного росту мікроорганізмів.

Мікрокультуральні системи для визначення патогенних організмів містять спеціальні поживні та селекційні середовища. Вони дозволяють одночасно визначити основний перелік збудників протягом 18–24 годин (залежно від системи). Використання не вимагає спеціально обладнаної мікробіологічної лабораторії, лише термостат і дозатор.



Рис. 8. Система Neonatal Fast Well D-ONE
Повністю позитивний тест
(Джерело: labstar.com.ua)

4.5. Хромогенні середовища

Хромогенні середовища – це мікробіологічні середовища для культивування та ідентифікації мікроорганізмів, які містять ферментні субстрати, з'єднані з хромогенами. При взаємодії з ферментами бактерій субстрат набуває певного кольору та осідає всередині колонії. Внаслідок цього колонія отримує специфічне забарвлення, що відповідає кольору хромогена. Для виділення *S. aureus* одним із перших хромогенних середовищ було CHROMagar *S. aureus*, зареєстроване в 2000 році. Це середовище використовує субстрат фосфатази для виділення *S. aureus* у вигляді рожевих колоній.

Ще два хромогенних середовища, Sa Select та chromID *S. aureus* (також відомий як *S. aureus* ID), були оцінені для клінічних зразків. Система chromID *S. aureus* використовує α -глюкозидазу *S. aureus*, що призводить до утворення зелених колоній.

Ці хромогенні середовища мають високу специфічність (>90 %) для виявлення *S. aureus* та особливо корисні для зразків з полімікробною флорою.

Принцип дії хромогенної технології полягає в поєднанні виявлення точної активності ферментів і локального фарбування, що осаджується в колонії, що дозволяє легко диференціювати мікроорганізми завдяки забарвленню вирощених бактерій.

Ця технологія базується на розчинній безбарвній молекулі, яка називається хромоген, що складається з субстрату, спрямованого на певну ферментативну активність і хромофору.

Коли фермент організму-мішені розщеплює безбарвний кон'югат хромогену, хромофор вивільняється. У своїй некон'югованій формі хромофор проявляє свій характерний колір і завдяки зниженій розчинності, утворює осад.

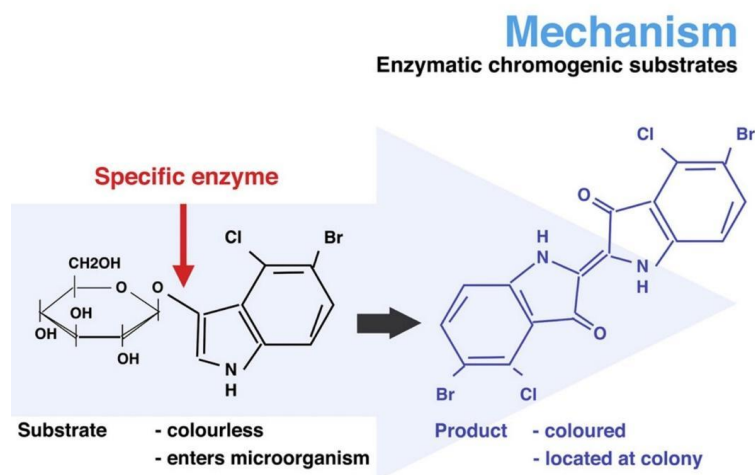


Рис. 9. **Активация хромогенных ферментів**
(Джерело: www.chromagar.com)

Результатом є дуже специфічна та відмінна кольорова диференціація, яка чітко розрізняється неозброєним оком за звичайних умов освітлення.



Рис. 10. **Ріст стафілококів на поверхні CHROMagar™ Staphylococcus**
S. aureus – від рожевого до лілового; *S. epidermidis* – від безбарвного до рожевого; *S. saprophyticus* – бірюзово-блакитний.
(Джерело: www.chromagar.com)

4.6. Визначення стійкості до антибіотиків

Визначення стійкості до антибіотиків базується на стандартах, розроблених двома провідними організаціями – Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) та European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

CLSI – це організація у США, яка встановлює порогові значення чутливості до антибіотиків, що використовуються в клінічних лабораторіях Північної Америки та деяких інших країн. EUCAST розробляє аналогічні стандарти для Європи.

Обидві організації регулярно оновлюють свої рекомендації щодо методів визначення стійкості та порогових значень чутливості на основі накопичених даних та нових досліджень. Загалом їхні стандарти є досить схожими, проте існують деякі відмінності для окремих антибіотиків та мікроорганізмів.

Ключові відмінності між методологіями дискової дифузії Інституту клінічних і лабораторних стандартів (CLSI) і Європейського комітету з тестування на антимікробну чутливість (EUCAST), наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Відмінності в концентрації антибіотику в різних стандартах

Методологічна невідповідність		CLSI	EUCAST
Температура інкубації		35 ± 2 °C	35 ± 1 °C
Тривалість інкубації		16–18	16–20 год
Вміст антимікробного диска (мкг, якщо не вказано інше)	Амоксицилін-клавуланова кислота	20–10	20–10 та 2–1
	Ампіцилін	10	10 і 2
	Гентаміцин ^d	120	30
	Лінезолід	30	10
	Нітрофурантоїн	300	100
	Пеніцилін Г	10 одиниць	1 одиниця
	Піперацилін	100	30
	Піперацилін–тазобактам	100–10	30–6
	Ванкоміцин	30	5

Для визначення стійкості бактерій до антибіотиків використовують агар Мюллера-Хінтона. Це щільне поживне середовище з низьким вмістом пептонів, призначене для культивування невибагливих бактерій.

Для визначення стійкості до антибіотиків необхідно спочатку отримати чисту культуру мікроорганізму.

Після 18-24 годин культивування з поверхні агару відбирають декілька колоній, які вносять у пробірку зі стерильним фізіологічним розчином. Концентрація суспензії повинна візуально відповідати розведенню 0,5 за шкалою МакФарланда.

Для посіву на поверхню агару стерильний ватний тампон на паличці занурюють у суспензію, обережно віджимають об стінку пробірки. Суспензію рівномірно наносять на агар штрихувальними рухами. Цю процедуру потрібно повторити тричі, кожного повертаючи чашку на 60°.

Посів висушують протягом 5-15 хвилин. Антибіотичні диски наносять стерильним пінцетом. Відстань між дисками - не менше 24 мм, для пеніцилінів та цефалоспоринів - 30 мм.

4.7. Вибір антибіотика для ідентифікації метицилін стійких стафілококів

Історія визначення резистентності стафілококів до антибіотиків відзначена послідовним застосуванням різних засобів, спрямованих на виявлення метицилін-резистентних штамів. Починаючи з використання метициліну, що стало важливим кроком у визначенні стійкості до β -лактамних антибіотиків, виробники антибіотиків та клініцисти шукали більш ефективні та надійні методи.

У розвитку методів важливою стала альтернатива метициліну – оксацилін. Проте, сучасні вимоги до точності та вірогідності діагностики метицилін-резистентності призвели до рекомендацій застосовувати цефокситин замість оксациліну. Цей перехід визначений рядом переваг, що полегшують інтерпретацію та забезпечують надійність результатів.

Використання цефокситину замість оксациліну рекомендується чинними міжнародними та національними стандартами для скринінгу та підтвердження метицилін-резистентності у стафілококів.

Зміна скринінгового антибіотика при тестуванні *S. aureus* в першу чергу пов'язана з тим, що низка досліджень вказала на низьку специфічність виявлення метицилін-резистентних ізолятів (МРС) методиками з використанням оксациліну. Крім того, навколо диска з оксациліном не утворюється чіткої зони затримки росту. Натомість цефокситин має високий рівень специфічності та викликає утворення чіткої зони гальмування росту.

З іншого боку, зона затримки росту *S. pseudintermedius* навколо цефокситину не корелює з наявністю генів стійкості до метициліну. Тому цей препарат не може застосовуватися до цього патогену.

4.8. Використання хромогенних середовищ для діагностики метицилін стійкого золотистого стафілокока

Швидка лабораторна діагностика має вирішальне значення для раннього виявлення стійких до метициліну стафілококів, а отже ефективного лікування та профілактики інфекцій викликаних такими бактеріями

На відміну від традиційних методів, хромогенні середовища прості у використанні, не вимагають тривалих протоколів. В таких середовищах міститься мінімальна інгібуюча концентрації скринінгово антибіотику оксациліну, через це на поверхні агару можуть рости тільки стійкі до всіх β -лактамних антибіотиків штами. Виявлення ферментів притаманних *S. aureus* відразу спрощує видову диференціацію бактерій. Проте направленість на виявлення золотистого стафілокока обмежує використання цих середовищ для діагностики інших стійких представників родини.

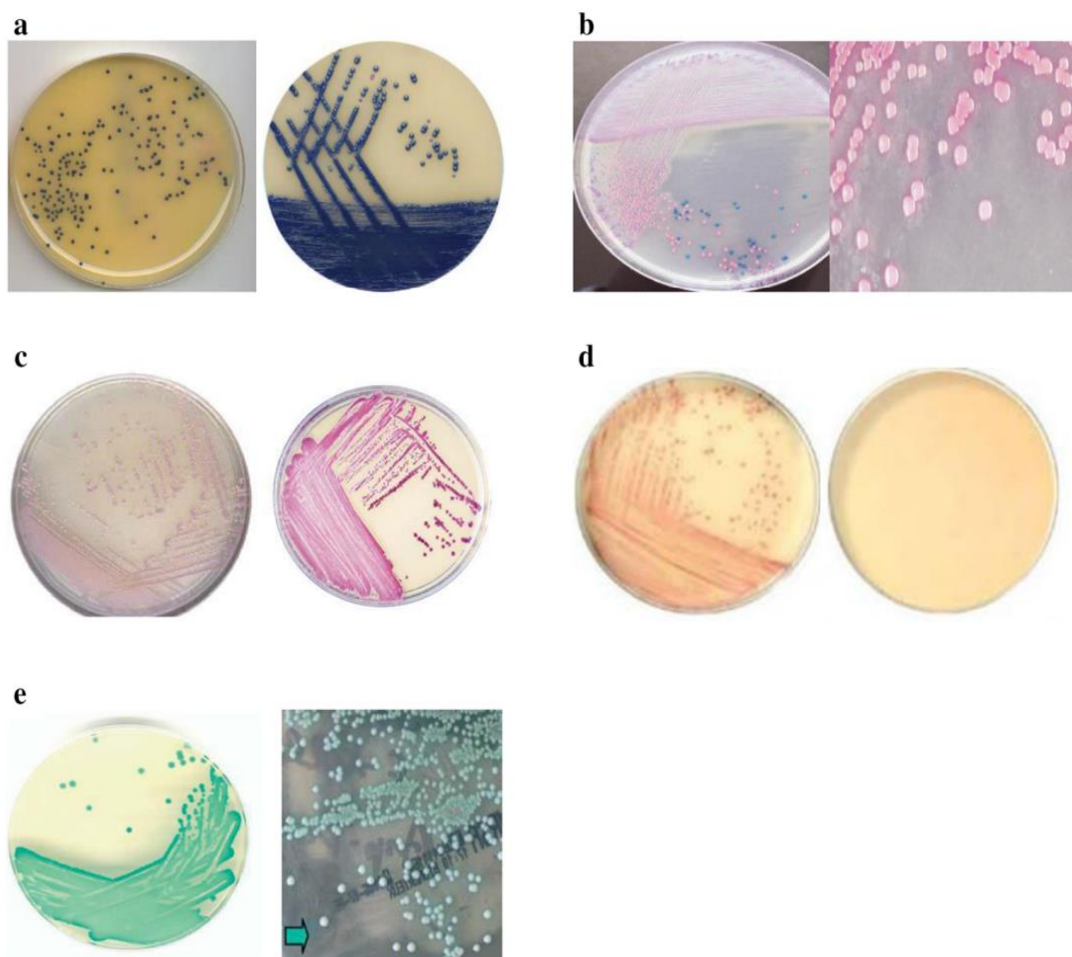


Рис. 11. Морфологія колоній MRSA на різних хромогенних середовищах
 а. Oxoid Brilliance™ MRSA. б. CHROMagar™ MRSA.
 с. BBL™ CHROMagar™ MRSA. д. MRSASelect. е. chromID™ MRSA.

(Джерело: Xu et. al. 2016)

4.9. Вивчення біоплівкоутворюючих властивостей

Фарбування біоплівки є непрямим методом оцінки її щільності. Суть методу полягає в тому, що чим більше позаклітинної полімерної речовини утворилося в пробірці, тим більше барвника вона може поглинути. Після екстракції барвника з позаклітинного матриксу вимірюється його концентрація, за якою оцінюється щільність біоплівки. Це дозволяє умовно поділити досліджувані ізоляти на групи за інтенсивністю утворення біоплівки, проте не може бути єдиним кількісним показником. Тому для комплексної оцінки біоплівкоутворюючих властивостей доцільно використовувати декілька методів дослідження.

Спочатку потрібно культивувати культуру *Staphylococcus* на поживному агарі або в бульйоні близько 12–14 годин. Отриману бульйонну культуру розвести до концентрації 1:100 у свіжому середовищі. Агарову культуру ресуспендувати у буферному розчині до 0,5 за стандартом Макфарланда. Триптичний соєвий бульйон є найчастіше використовуваним лабораторним

культуральним середовищем для аналізу утворення біоплівки. До цього середовища (яке вже містить 2,5 г/л глюкози та 5,0 г/л NaCl) часто додають додаткову кількість глюкози (0,25 %, 0,4 %, 0,5 % та 1,0 %). Для кількісних аналізів зазвичай використовують 4–8 повторних лунок для кожної стафілококової культури.

Первинний посів. У кожен лунку планшетки необхідно додати 100–300 мкл бульйонної культури або мікробної суспензії із стерильним бульйоном. Інкубувати мікропланшет протягом 4–24 годин при 37 °С.

Видалення планктонних культур. Після інкубації потрібно видалити планктонні клітини, перевернувши планшет і струсивши рідину. Процес промивання потрібно повторити тричі. Цей крок допомагає видалити неприкріплені клітини та компоненти середовища, які можна забарвити на наступному етапі і значно зменшує фонове фарбування.

Фіксація біоплівки. Після промивання планшет потрібно висушити протягом 10–30 хвилин, в методиках деяких авторів висушування планшетки проходить протягом ночі. Потім потрібно зафіксувати біоплівку. Для цього можна застосувати хімічний або фізичний метод. За хімічного методу в кожен лунку потрібно додати 125 мкл метилового або етилового спирту та витримати експозицію 10–30 хв. Після цього вилучити спирт з лунки та висушити планшкетку. За фізичного способу фіксації планшкетку потрібно помістити у термостат та витримати за температури 60 °С протягом години.

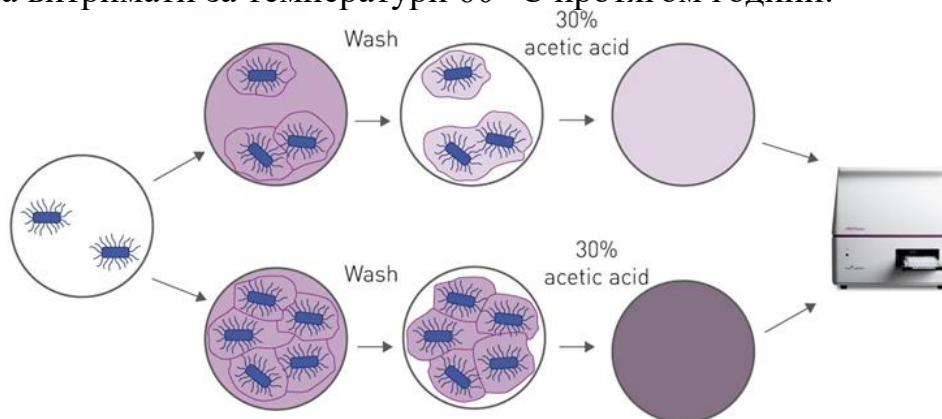


Рис. 12. **Непрямий метод вивчення щільності біоплівки**

Джерело (www.bmglabtech.com)

Фарбування біоплівки. У кожен лунку планшетки потрібно додати 125 мкл 0,1 % розчину кристалічного фіолетового. Під час приготування розчину одягати рукавички та лабораторний халат. Бути обережним, зважаючи генціанвіолет, оскільки порошок гігроскопічний і легко забруднює одяг, шкіру тощо. Після цього потрібно витримати мікропланшет при кімнатній температурі протягом 10–15 хв. Промити пластину 3–4 рази водою, зануривши її у ванну з водою, як описано вище, струсити і енергійно промокнути стопкою паперових рушників, щоб позбавити пластину усіх зайвих клітин і барвника. Перевернути мікропланшет догори дном і висушити

протягом кількох годин. Для якісних аналізів лунки можна сфотографувати, коли вони висохнуть.

Кількісна оцінка біоплівки. Додати 125 мкл 30 % оцтової кислоти або суміш 96 % етилового спирту із цетомом у концентрації 8:2 в кожен лунку планшета для мікротитрації, щоб розчинити генціанвіолет. Інкубувати мікропланшет при кімнатній температурі протягом 10–15 хв. Перенести 125 мкл солюбілізованого генціанвіолет в нову чашку для мікротитрації з плоским дном. Визначити поглинання в планшет-рідері при 550 нм, використовуючи 30 % оцтову кислоту у воді як негативний контроль.

4.10. Національні стандарти, що регламентують мікробіологічну діагностику *Staphylococcus spp*

В Україні на сьогодні діють стандарти для визначення стафілококів у продуктах харчування, косметичці та миючих засобах. Більшість стандартів належать до категорії ГОСТів, що дійсні лише на території СНД. Ці стандарти були розроблені на основі радянських нормативних документів. Згідно них потрібно використовувати сольовий бульйон для первинного накопичення бактерій та селективні середовища Байрд-Паркера, молочно-сольовий агар або яєчно-жовтковий-сольовий агар. Для ідентифікації коагулазопозитивних стафілококів потрібно застосовувати реакцію коагулази і реакцію ферментації мальтози в анаеробних умовах для диференціації *S. aureus* від інших коагулазопозитивних стафілококів.

Також дійсні ДСТУ на основі міжнародних стандартів ISO та IDF. ISO 22718 регламентує виявлення *Staphylococcus aureus* у косметичних засобах. ISO 6888 визначає підрахунок коагулазопозитивних стафілококів у продуктах харчування.

Згідно них потрібно використовувати сольовий бульйон для первинного накопичення бактерій та селективні середовища Байрд-Паркера та реакцію коагулази. В останніх редакціях стандарту агар Байрд-Паркера змінено на міно-сольовий агар. Для ідентифікації коагулазопозитивних видів потрібно використовувати реакцію коагуляції плазми крові.

Стандарт, який використовує лабораторія має бути визначений в технічному регламенті виробника продукту. Якщо такий стандарт не визначено, то лабораторія обирає метод дослідження згідно з ДСТУ продукту.

Для виявлення бакетрій що викликають хвороби у тварин, національні стандарти не розроблені. В такому випадку, згідно з ISO 17025 лабораторії для виконання досліджень можуть розробляти власні методики. З метою обґрунтування власних методик лабораторія може посилатися на наукову літературу, яка підтверджує їхню адекватність, ефективність, точність, повторюваність, відтворюваність та простоту застосування.

Таблиця 4

Список діючих стандартів (згідно з каталогом ДП «УкрНДНЦ»)

Позначення	Сфера застосування	Рік набуття чинності
------------	--------------------	----------------------

ДСТУ 3031-95 (ГОСТ 30279-95)	Шампуні та піномийні засоби. Мікробне забруднення. Метод виявлення <i>Staphylococcus aureus</i>	1996-07-01
ДСТУ IDF 138:2003	Сухе молоко. Визначення <i>Staphylococcus aureus</i> . Методика підрахунку колоній за температури 37°C	2005-01-01
ДСТУ ISO 22718:2010	Засоби косметичні. Мікробіологія. Метод виявлення <i>Staphylococcus aureus</i>	2012-01-01
ДСТУ EN ISO 6888-3:2019 (EN ISO 6888-3:2003, IDT; ISO 6888-3:2003, IDT)	Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахунку коагулазопозитивних стафілококів (<i>Staphylococcus aureus</i> та інших видів). Частина 3. Виявлення та MPN-техніка для малих чисел	2019-09-01
ДСТУ EN ISO 6888-3:2019 (EN ISO 6888-3:2003, IDT; ISO 6888-3:2003, IDT)/Поправка № 1:2022 (EN ISO 6888-3:2003/AC:2005, IDT)	Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахунку коагулазопозитивних стафілококів (<i>Staphylococcus aureus</i> та інших видів). Частина 3. Виявлення та техніка MPN для низької кількості	2023-12-31
ДСТУ EN ISO 6888-1:2022 (EN ISO 6888-1:2021, IDT; ISO 6888-1:2021, IDT)	Мікробіологія харчового ланцюга. Горизонтальний метод підрахунку коагулазопозитивних стафілококів (<i>Staphylococcus aureus</i> та інших видів). Частина 1. Метод із використанням агаризованого середовища Берда-Паркера	2023-12-31
ДСТУ EN ISO 6888-2:2022 (EN ISO 6888-2:2021, IDT; ISO 6888-2:2021, IDT)	Мікробіологія харчового ланцюга. Горизонтальний метод підрахунку коагулазопозитивних стафілококів (<i>Staphylococcus aureus</i> та інших видів). Частина 2. Метод із використанням агарового середовища з фібриногеном плазми кролика	2023-12-31
ДСТУ EN ISO 22718:2022 (EN ISO 22718:2015, IDT; ISO 22718:2015, IDT)	Косметика. Мікробіологія. Виявлення <i>Staphylococcus aureus</i>	2023-12-31
ГОСТ 30347-97	Молоко и молочные продукты. Методы определения <i>Staphylococcus aureus</i>	1999-07-01
ГОСТ 7702.2.4-93	Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Метод выявления и определения количества <i>Staphylococcus aureus</i>	1997-01-01
ГОСТ 10444.2-94	Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества <i>Staphylococcus aureus</i>	1998-01-01
ГОСТ 30347-97	Молоко и молочные продукты. Методы определения <i>Staphylococcus aureus</i>	1999-07-01

5. МОЛЕКУЛЯРНО ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СТАФІЛОКОКІВ

5.1. Полімеразна ланцюгова реакція

Виділення ДНК з бактеріальної культури включає кілька послідовних етапів. Спочатку вирощують та збирають культуру бактерій. Після цього клітини розриваються, щоб вивільнити їх вміст, включаючи ядро, мітохондрії, білки та інші компоненти.

Отриману масу клітин піддають подальшій обробці з метою видалення всіх компонентів, окрім ДНК. Цей етап зазвичай включає застосування різних хімічних і фізичних методів, таких як лізувальні розчинники, тепловий шок або механічне руйнування клітин.

Після лізації зразка, додають буферний зв'язуючий розчин із етанолом або ізопропанолом. Зразок у зв'язуючому розчині переносять у колонку, яку покладають у центрифугу або приєднують до вакууму. Під час центрифугування розчин проходить через силікатну мембрану колонки, де нуклеїнові кислоти зв'язуються з кремнеземною мембраною.

Для промивання додають новий буфер і центрифугують або вакуумують через мембрану, щоб видалити зв'язуючі солі та інші забруднення. Це повторюється кілька разів, із збільшенням відсотка етанолу або ізопропанолу для забезпечення ефективності очищення.

Після видалення зайвих компонентів залишається екстрагована суміш, яка містить ДНК разом з іншими клітинними компонентами. Застосовують спеціальні методи для очищення та відділення ДНК від інших молекул. Це може включати використання хімічних реагентів, гелевої фільтрації або центрифугування.

Оптимізація протоколу ПЛР має важливе значення для отримання стабільних результатів. Праймер та цільові послідовності зонда повинні бути специфічними для досліджуваного організмів і зберігатися в різних типах або штаммах.

Потенціал ПЛР для досягнення набагато більшої чутливості, ніж традиційні методи виділення та виявлення може бути серйозно обмежений через варіабельність послідовностей. Не кожен ПЛР-тест є успішним. Хибнонегативні результати можуть бути результатом варіації послідовності місця приєднання ПЛР-праймерів.

Хибнонегативні результати також можуть бути пов'язані з нездатністю оптимізувати умови ПЛР. Після того, як підбрані відповідні праймери і зонди, найбільш важливими параметрами, що впливають на ефективність ПЛР, є температура відпалу, режим циклізації та склад буфера. Оператор може контролювати параметри циклу і кількість циклів. Така гнучкість корисна при оптимізації ПЛР-реакцій.

ПЛР аналіз ДНК часто вимагає зосередження на одній або кількох конкретних ділянках геному. Це також часто стосується ситуацій, коли лише одна або декілька копій молекули ДНК доступні для подальшого аналізу. Цих

кількостей недостатньо для більшості процедур, таких як електрофорез у гелі. Полімеразна ланцюгова реакція – це техніка, яка використовується для швидкого збільшення кількості копій однієї конкретної ділянки ДНК для подальшого аналізу

Денатурація (94 °C): зразок нагрівається в маленькій пластиковій трубці всередині термоциклера (який здатний швидко змінювати температуру дуже точно). Нагрівання зразка до 94 °C спричиняє денатурацію водневих зв'язків, що утримують подвійну спіраль ДНК, тому нитки розділяються.

Відпал (54–60 °C): зразок охолоджують, щоб праймери могли відпалити (пару основ) з їхньою комплементарної послідовності. Через правила парування основ праймери можуть відпалюватися лише в певній точці, яка містить їх комплементарну послідовність основ. Це дозволяє вченим вибирати, яку ділянку ДНК буде ампліфіковано.

Елонгація (72 °C): зразок нагрівають до оптимальної температури для Taq полімерази. Taq полімераза відходить від вільного 3'-кінця обох праймерів, утворюючи подвійну спіраль.

5.2. Праймери націлені на фрагменти гена термонуклази

Ген *nuc*, який кодує фермент термонуклеазу, слугує надійною та цінною мішенню для видової ідентифікації коагулазо-позитивних стафілококів (CoPS) у ветеринарії.

Ген *nuc* демонструє високий рівень збереження серед видів стафілококів, що забезпечує його присутність у всіх видах CoPS, проаналізованих в дослідженнях. Однак він також демонструє помірний ступінь різноманітності, що дозволяє диференціювати різні види в межах роду *Staphylococcus*.

Крім того, аналіз послідовності гена *nuc* дозволяє ідентифікувати окремі кластери в межах видів стафілококів. Наприклад, послідовність нуклеотидів *S. delphini* групи В демонструє більш близьку спорідненість з *S. pseudintermedius*, ніж з *S. delphini* групи А, що підкреслює унікальний еволюційний шлях, пройдений *S. delphini* групи В серед стафілококів.

5.3. Інші досліджувані цільові гени

Методи генотипування, такі як секвенування генів *tuf*, *hsp60*, *sodA* та *groV*, надають цінну інформацію про спорідненість і різноманітність штамів стафілококів. Вони перевершують традиційні фенотипічні методи в диференціації близькоспоріднених видів.

Ген *tuf* дозволяє точну ідентифікацію видів стафілококів, включаючи підвиди. Ген *hsp60* демонструє добре збережені послідовності в межах виду. Ген *sodA* виявився більш дискримінативним, ніж 16S рДНК. Ген *groV* показав чіткі кластери, що представляють різні види стафілококів.

Таким чином, секвенування цих генів дозволяє точну ідентифікацію стафілококів на рівні виду і підвиду, що є важливим для епідеміології та вивчення патогенності.

Таблиця 4

**Праймери для диференціації коагулазопозитивних стафілококів
Sasaki et. al., (2010)**

Назва	Послідовність	Розмір продукту	Вид який ідентифікується
au-F3	TCGCTTGCTATGATTGTGG	359	<i>S. aureus</i>
au-nucR	GCCAATGTTCTACCATAGC		
in-F	CATGTCATATTATTGCGAATGA	430	<i>S. intermedius</i>
in-R3	AGGACCATCACCATTGACATAT TGAAACC		
sch-F	AATGGCTACAATGATAATCACT AA	526	<i>S. coagulans</i>
sch-R	CATATCTGTCTTTCGGCGCG		
dea-F	TGAAGGCATATTGTAGAACAA	661	<i>S. delphini</i> group A
dea-R	CGRTACTTTTCGTTAGGTCTG		
hy-F1	CATTATATGATTTGAACGTG	793	<i>S. hyicus</i>
hy-R1	GAATCAATATCGTAAAGTTGC		
pse-F2	TRGGCAGTAGGATTCGTTAA	926	<i>S. pseudintermedius</i>
pse-R5	CTTTTGTGCTYCMTTTTGG		
deb-F	GGAAGRITTCGTTTTTCCTAGAC	1,135	<i>S. delphini</i> group B
deb-R4	TATGCGATTCAAGAACTGA		

5.4. Дослідження геному

Мультилокусне типування послідовностей (MLST) – це широко поширений метод типування на основі послідовностей ДНК, який ґрунтується на аналізі відносно консервативних генів, які кодують основні білки. Для *S. aureus* рівень розрізнення, наданий MLST, є достатнім для отримання відносно детальної картини глобального розповсюдження організму.

Для *S. aureus* зазвичай аналізують 7 господарських генів. Специфічні варіанти кожного гена називають алелями, а комбінація алелей утворює профіль послідовності або ST (sequence type).

MLST дозволяє визначити генетичне споріднення між штамми *S. aureus*, провести епідеміологічний моніторинг їх поширення та відстежити еволюційні зв'язки. Штами з близьким ST, швидше за все, мають спільне походження, тоді як штамми зі значними відмінностями навряд чи пов'язані між собою. MLST є надійним та високовідтворним стандартизованим методом генотипування *S. aureus*.

Для проведення MLST послідовно виконують ряд етапів. Спочатку з досліджуваного штаму *S. aureus* виділяють хромосомну ДНК. Далі, за

допомогою ПЛР з використанням специфічних праймерів, ампліфікують ділянки 7 господарських генів: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmK*, *pta*, *tpi*, *uqiL*. Після цього проводять секвенування отриманих ПЛР-продуктів для визначення нуклеотидної послідовності кожного локусу. Отримані послідовності порівнюють з відомими алельними варіантами цих генів у *S. aureus*, представленими в спеціалізованих MLST-базах даних.

На основі визначених специфічних алелей 7 локусів встановлюють алельний профіль досліджуваного штаму. За наявними в базі даних sequence type (ST) профілями призначають ST досліджуваного штаму. Порівняння отриманого ST з іншими ST у базах даних та побудова філогенетичних дерев дозволяє проаналізувати генетичні зв'язки між штамами та зробити відповідні висновки.

Випадково ампліфікована поліморфна ДНК (RAPD) відома як довільна полімеразна ланцюгова реакція (AP-PCR), є швидким методом, що використовується для виявлення геномних поліморфізмів. Він передбачає ампліфікацію геномної ДНК за допомогою коротких довільних праймерів, що призводить до появи чітких смуг на електрофорезі в агарозному гелі. RAPD забезпечує високу дискримінаційну здатність, але його відтворюваність і міжлабораторна узгодженість можуть бути складними.

Гель-електрофорез в імпульсному полі (PFGE) еталонною методикою для визначення типу стафілококів в епідеміологічних дослідженнях. Він полягає в розщепленні геномної ДНК рідкісними рестрикційними ферментами і розділенні отриманих фрагментів за допомогою PFGE. Аналіз паттернів PFGE дозволяє створювати референтні бази даних і порівнювати їх з новими штамами для ідентифікації. PFGE має високу дискримінативність, але може мати обмеження в довгострокових епідеміологічних дослідженнях.

SPA-типування фокусується на поліморфних прямих повторів, знайдених в гені стафілококового протеїну A (*sra*). Кількість і варіації повторів короткої послідовності (SSR) в межах гена *sra* генерують унікальні патерни. *sra*-типування широко використовується для визначення метицилін-резистентного *S. aureus* (MRSA) і демонструє збіг з MLST.

Типування SCC_{mec} фокусується на елементі стафілококової касетної хромосоми *mec* (SCC_{*mec*}), який несе ген *mecA*, що відповідає за резистентність до бета-лактамів. Типування SCC_{*mec*} визначає комбінацію типів генного комплексу *ccr* і класу генів *mec*, надаючи інформацію про генетичну організацію детермінант резистентності.

5.5. MALDI-TOF MS

Метод MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) використовується для диференціації та ідентифікації бактерій, включаючи стафілококи.

Відбір зразка: зразок, який містить стафілококи, піддається підготовці для аналізу MALDI-TOF MS. Зазвичай це включає відновлення клітин та їх обробку матрицею.

Лазерне випромінювання та іонізація: лазерне випромінювання спрямоване на зразок, оброблений матрицею. Під впливом лазерного випромінювання відбувається іонізація молекул, утворюючи іони.

Полетовий мас-аналіз: іони розганяються в електричному полі, та їхні часи польоту вимірюються. Мас-спектр залежить від мас-заряду іонів та часу їхнього польоту.

Аналіз мас-спектра: отриманий мас-спектр порівнюється з базою даних мас-спектрів відомих видів бактерій, включаючи стафілококи. Такий порівняльний аналіз дозволяє ідентифікувати конкретний вид стафілококів у зразку.

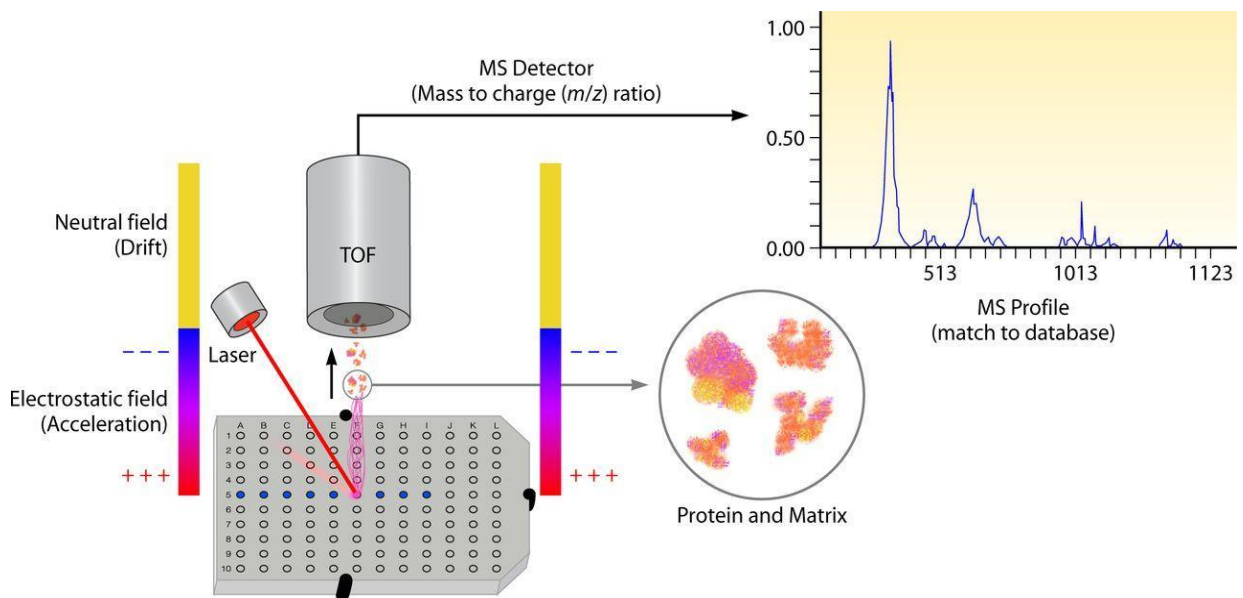


Рис. 11. Принцип дії MALDI-TOF MS
(Джерело: Clark et. al., 2013)

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Зоценко В.М., І.О.Рубленко, Андрійчук А.В., Білан А.В, Тарануха С.І. (2017) Ветеринарна мікробіологія: посібник. Біла Церква, 184 с.
2. Салманов А.Г., Щеглов Д.В., Артьоменко В.В., Мамонова М.Ю., Ушкалов В.О. Стимування антимікробної резистентності на підходах «Єдине здоров'я»: Монографія. –К.:АграрМедіаГруп. – 2022. – 380 с.
3. Фурзікова Т.М., Сергійчук М.Г., Власенко В.В., Швець Ю.В., Позур В.К. (2006). Мікробіологія. Практикум, ред. Київ: Фітосоціоцентр.
4. Blackburn, C. de W. (2006). Food spoilage microorganisms. Woodhead publ.
5. Bond, R., & Loeffler, A. (2012). What's happened to *Staphylococcus intermedius* ? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *Journal of Small Animal Practice*, 53(3), 147–154. DOI:10.1111/j.1748-5827.2011.01165.x
6. Carroll, K. C., Burnham, C. D., & Westblade, L. F. (2021). From canines to humans: Clinical importance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *PLoS pathogens*, 17(12), e1009961. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009961>
7. Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629–641. DOI:10.1038/nrmicro2200
8. Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., & Wolk, D. M. (2013). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: A Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 547–603. DOI:10.1128/CMR.00072-12
9. Chunmei Liu, Yong Shen, Meng Yang, Kunmei Chi, and Na Guo. Hazard of Staphylococcal Enterotoxins in Food and Promising Strategies for Natural Products against Virulence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2022 70 (8), 2450-2465 DOI: 10.1021/acs.jafc.1c06773
10. De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), e00181-19. DOI:10.1128/CMR.00181-19
11. Garcia, B. L. N., Fidelis, C. E., Freu, G., Granja, B. de M., & dos Santos, M. V. (2021). Evaluation of Chromogenic Culture Media for Rapid Identification of Gram-Positive Bacteria Causing Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 662201. DOI:10.3389/fvets.2021.662201
12. Hetem, D. J., Rooijackers, S. H. M., & Ekkelenkamp, M. B. (2017). *Staphylococci and Micrococci*. In *Infectious Diseases* (pp. 1509-1522.e2). Elsevier. DOI:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00176-3
13. Kahlmeter, G., Giske, C. G., Kirn, T. J., & Sharp, S. E. (2019). Point-Counterpoint: Differences between the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical and Laboratory Standards Institute Recommendations for Reporting Antimicrobial Susceptibility Results. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(9), e01129-19. DOI:10.1128/JCM.01129-19
14. Liu, C., Shen, Y., Yang, M., Chi, K., & Guo, N. (2022). Hazard of Staphylococcal Enterotoxins in Food and Promising Strategies for Natural Products

against Virulence. *Journal of agricultural and food chemistry*, 70(8), 2450–2465. DOI:10.1021/acs.jafc.1c06773

15. Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology E-Book*. Elsevier Health Sciences.

16. Moses, I. B., Santos, F. F., & Gales, A. C. (2023). Human Colonization and Infection by *Staphylococcus pseudintermedius*: An Emerging and Underestimated Zoonotic Pathogen. *Microorganisms*, 11(3), 581. DOI:10.3390/microorganisms11030581

17. Nesse, L. L., Osland, A. M., & Vestby, L. K. (2023). The Role of Biofilms in the Pathogenesis of Animal Bacterial Infections. *Microorganisms*, 11(3), 608. DOI:10.3390/microorganisms11030608

18. Opal, S. M., & Pop-Vicas, A. (2015). Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (pp. 235-251.e3). Elsevier. DOI:10.1016/B978-1-4557-4801-3.00018-7

19. Park, S., & Ronholm, J. (2021). *Staphylococcus aureus* in Agriculture: Lessons in Evolution from a Multispecies Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(2), e00182-20. DOI:10.1128/CMR.00182-20

20. Prax, M., Lee, C. Y., & Bertram, R. (2013). An update on the molecular genetics toolbox for staphylococci. *Microbiology*, 159(Pt_3), 421–435. DOI:10.1099/mic.0.061705-0

21. Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: Formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1701–1718. DOI:10.1007/s42770-021-00624-x

22. Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., & Hiramatsu, K. (2007). Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2770–2778. DOI:10.1128/JCM.00360-07

23. Sangwan, S., Poonia, P., & Tanwar, H. (2019). Anti-Biofilm Enzymes: A Strategy to Remove Biofilms. 17. 35-37.

24. Savini, V. (2018). *Pet-to-man travelling staphylococci: A world in progress*. Academic press, an imprint of Elsevier.

25. Silva, V., Capelo, J. L., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Lineages in Wild Animals in Europe: A Review. *Antibiotics*, 9(3), 122. DOI:10.3390/antibiotics9030122

26. Tille, P. (2013). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology—E-Book* (13th ed.). Mosby.

27. Xu, Z., Hou, Y., Peters, B. M., Chen, D., Li, B., Li, L., & Shirtliff, M. E. (2016). Chromogenic media for MRSA diagnostics. *Molecular biology reports*, 43(11), 1205–1212. DOI:10.1007/s11033-016-4062-3

28. www.uas.gov.ua

29. www.analisisavanzados.es

30. www.biomerieux.com

31. www.chromagar.com

32. www.oxoid.com

33. www.tgw1916.net

ДОДАТОК 1

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТЕСТИ ДЛЯ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СТАФІЛОКОКІВ

Тест на каталазу

Мета: Цей тест дозволяє диференціювати каталазопозитивні види мікроорганізмів та стафілококів від каталазонегативних видів стрептококів або ентерококів.

Принцип роботи: Аеробні та факультативно-анаеробні організми в процесі нормального метаболізму продукують два токсини: перекис водню (H_2O_2) та супероксидний радикал (O_2). Ці бактерії мають два ферменти, які детоксикують продукти нормального метаболізму. Один з цих ферментів, каталаза, здатний перетворювати перекис водню на воду і кисень. Про наявність цього ферменту в бактеріальному ізоляті свідчить те, що невеликий посівний матеріал, внесений у перекис водню (30 % для слайд-тесту), викликає швидке виділення бульбашок кисню. Нестача каталази проявляється у відсутності або слабкому утворенні бульбашок.

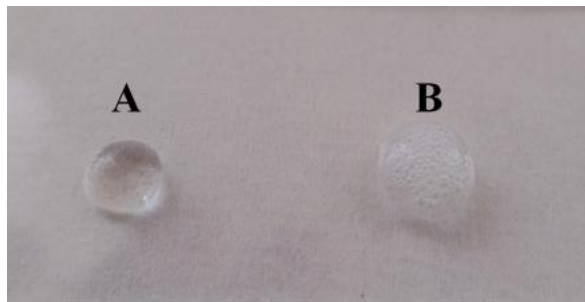


Рис. 12. Реакція виявлення каталази
А. Негативна реакція В. Позитивна реакція

Порядок виконання:

1. За допомогою бакпетлі або стерильної дерев'яної палички необхідно перенести частину колонії на поверхню чистого, сухого предметного скла.
2. Нанести краплю 30 % перекису водню (H_2O_2) на бактеріальну масу.
3. Спостерігайте за появою бульбашок кисню (Рис. 12).

Очікувані результати:

Позитивний: Утворюється велика кількість бульбашок (Рис. 12, В).

Негативний: Бульбашок не утворюється або утворюється мало (Рис. 12, А).

Обмеження: Деякі організми (ентерококи) виробляють пероксидазу, яка повільно каталізує розщеплення H_2O_2 , тому тест може бути слабо позитивним. Ця реакція не є справді позитивним тестом. Хибнопозитивні результати можуть виникати, якщо зразок забруднений кров'яним агаром.

Тест на коагулазу

Механізм утворення згустку відрізняється для різних коагулазопозитивних стафілококів. Різниця полягає в наявності зв'язуючого білка фон Віллебранда (vWbp) як основного медіатора згортання у коагулазопозитивних стафілококів (CoPS), тоді як класична коагулаза (Coa) виявляється тільки в *S. aureus*.

vWbp (віролюдинний білок *W*): Функція: vWbp взаємодіє з віролюдинним фактором (vWF), який є важливим для адгезії та агрегації тромбоцитів. В результаті цієї взаємодії відбувається активація тромбоцитів та викликана згортання плазми крові.

Coa (коагулазний білок *A*): Функція: Coa взаємодіє з протромбіном, приводячи до перетворення його у тромбін. Тромбін є ключовим фактором в системі згортання крові, викликаючи перетворення фібриногену у фібрин, що утворює згусток.

Мета: Тест використовується для диференціації більш патогенних, коагулазопозитивних стафілококів від коагулазонегативних стафілококів.

Принцип роботи: Коагулазопозитивні стафілококи виробляють дві форми коагулази – зв'язану та вільну. Зв'язана коагулаза, або “фактор згортання”, зв'язана зі стінкою бактеріальної клітини і безпосередньо реагує з фібриногеном. Це призводить до осадження фібриногену на стафілококових клітинах, що спричиняє злипання клітин при змішуванні бактеріальної суспензії з плазмою крові. Наявність зв'язаної коагулази корелює з вільною коагулазою, позаклітинним білковим ферментом, який викликає утворення згустку при інкубації колоній CoPS з плазмою.

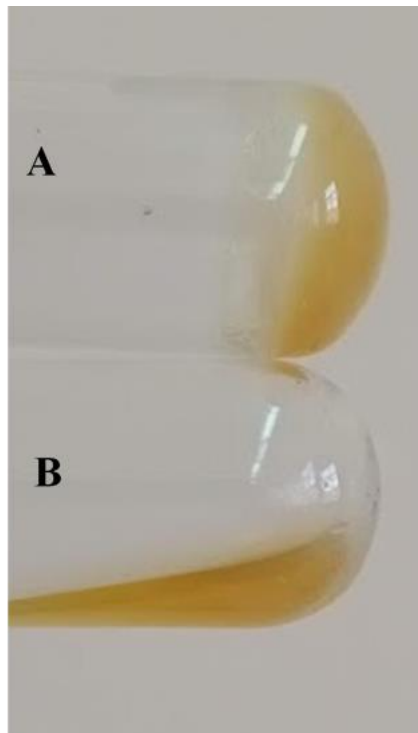


Рис. 13. Реакція виявлення коагулази
А. Позитивна реакція В. Негативна реакція

Хід виконання:

1. Необхідно емульгувати кілька колоній в 0,5 мл розведеної кролячої плазми.
2. Інкубувати пробірку при 35–37 °С протягом 4 годин.
3. Перевірка на утворення згустку.

Очікувані результати:

Позитивний: Згусток будь-якого розміру (Рис. 13, А).

Негативний: Згусток відсутній (Рис.13, В).

Обмеження: Результати тесту можуть бути позитивними протягом 4 годин, а потім повертаються до негативних через 24 години. Якщо результат негативний через 4 години, необхідно інкубувати при кімнатній температурі протягом ночі і знову перевірити на утворення згустку.

Гідроліз ДНК (ДНКази тест-агар)

Призначення: Цей тест використовується для диференціації організмів на основі продукції дезоксирибонуклеази.

Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) – це великий полімер нуклеотидів, який занадто великий, щоб проникнути в клітинну мембрану. Щоб використовувати зовнішню ДНК, бактеріальні клітини виділяють екзоферменти (ДНКази) поза клітиною, які гідролізують ДНК на нуклеотиди.

ДНКази – це позаклітинні ендонуклеази, які розщеплюють ДНК і вивільняють нуклеотиди та фосфат. ДНКази агар містить ДНК, поживні речовини для бактерій і метиловий зелений як індикатор. Метиловий зелений – це катіон, який зв'язується з негативно зарядженою ДНК.

Принцип: У ДНКази агарі без індикатора гідроліз ДНК спостерігається шляхом просвітлення агару після додавання HCL (олігонуклеотиди розчиняються в кислоті, але солі ДНК нерозчинні). Кислота осаджує негідролізовану ДНК, роблячи середовище непрозорим. Тому колонії, що продукують ДНКази, гідролізують ДНК і створюють чисту зону навколо росту.

Хід виконання: Виконати посів на ДНКази агар досліджуваній мікроорганізм і зробити посів для виділення. 2. Інкубуйте в аеробних умовах при 35–37 °С від 13 до 24 годин.

Очікуваний результат: Налийте 1N соляну кислоту на пластину на глибину кількох міліметрів, щоб відокремити ДНК, яка не розщепилася. Залиште чашку з агаром для тестування ДНКази на кілька хвилин. Вилийте зайву соляну кислоту і подивіться на неї на темному тлі.



Рис. 14. Позитивна реакція виявлення ДНКазі після додавання **HCl**

Позитивний тест – після додавання 1N HCl навколо лінії росту осаджується негідролізоване ДНК та утворюється прозора зона, але решта пластини все ще каламутна.

Негативний тест – коли додається 1N HCl, навколо лінії росту немає чіткої ділянки, і вся пластинка каламутна.

Тест Фогеса-Проскауера (VP)

Призначення: Виявлення перетворення глюкози в ацетоїн.

Принцип: VP визначає здатність організму перетворювати кислотні продукти в ацетоїн і 2,3-бутандіол. Організми, здатні використовувати VP шлях, виробляють меншу кількість кислоти під час ферментації глюкози і тому не змінюють колір при додаванні індикатора метилового червоного. Додають вторинний реагент, альфа-нафтол, а потім гідроксид калію (KOH); на позитивний результат тесту вказує комплекс червоного кольору.



Рис. 15. Результати тесту Фогеса-Проскауера
А. Негативна реакція В. Позитивна реакція

Тест VP (Фогеса-Проскауера)

1. Додайте 0,6 мл (6 крапель) розчину А (альфа-нафтол) і 0,2 мл (2 краплі) розчину В (КОН) до 1 мл бульйону MRVP.
2. Після додавання кожного реагенту добре збовтати.
3. Спостерігайте протягом 5 хвилин.

Очікувані результати:

Позитивний: Червоний колір, що свідчить про вироблення ацетоіну (Рис. 15, В).

Негативний: Жовтий колір (Рис. 15, А).

Мікродазний тест (модифікована оксидаза)

Призначення: Цей тест використовується для диференціації грампозитивних, каталазопозитивних коків (мікрококів від стафілококів).

Принцип: Мікрооксидазний тест – це швидкий метод диференціації стафілококів від мікрококів за допомогою виявлення ферменту оксидази. У присутності атмосферного кисню фермент оксидаза реагує з оксидазним реагентом і цитохромом С з утворенням забарвленої сполуки – індофенолу.

Спосіб 1. За допомогою дерев'яної палички-аплікатора потрібно нанести невелику кількість декількох колоній 18–24-добової чистої культури, вирощеної на кров'яному агарі, на невелику ділянку мікродазного диска або визначену зону тест смужки.

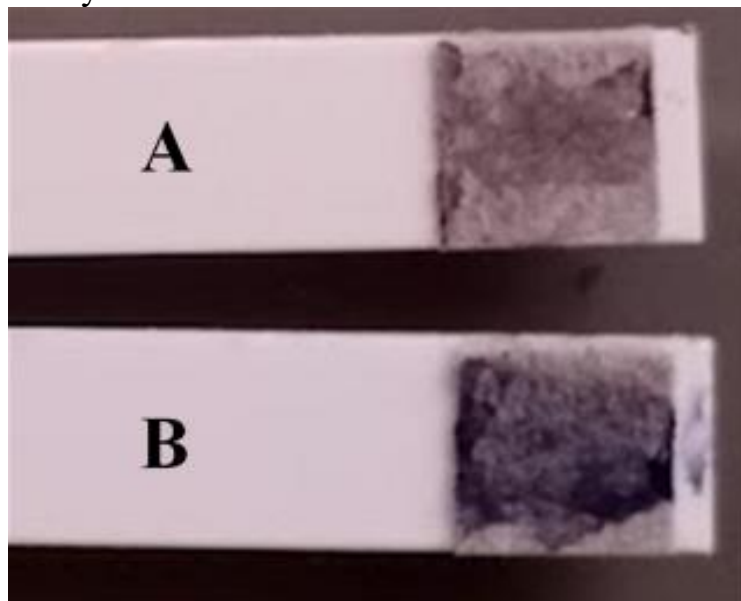


Рис. 16 Реакція виявлення оксидази
А. Негативна реакція В. Позитивна реакція

Очікувані результати:

Позитивний: Поява забарвлення від блакитного до фіолетово-блакитного (Рис. 16, В).

Негативний: Відсутність зміни кольору (Рис. 16, А).

Обмеження: Стафілококи повинні давати негативну зміну кольору, за винятком *S. sciuri*, *S. lentus* та *S. vitulus*.

ДОДАТОК 2

МІКРОБІОЛОГІЧНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ СТАФІЛОКОКІВ

Агар Байрд Паркера

Компанія Baird-Parker розробила це агарове середовище на основі телурит-гліцинової формули Зебовіца та ін. і підвищила його надійність у виділенні коагулазопозитивних стафілококів з харчових продуктів. Берд-Паркер додав емульсію яєчного жовтка як діагностичний агент і піруват натрію для захисту пошкоджених клітин і сприяння їх відновленню.

Селективні агенти: гліцин, літій і телурит були ретельно збалансовані, щоб пригнічувати ріст більшості бактерій, присутніх у продуктах харчування, не пригнічуючи при цьому коагулазопозитивні стафілококи. Емульсія яєчного жовтка робить середовище кремово-жовтим і непрозорим. Коагулазопозитивні стафілококи відновлюють телурит, утворюючи чорні/сірі блискучі колонії, які через 48 годин утворюють прозорі зони навколо колоній, спричинені протеолізом яєчного жовтка. Ця прозора зона з типовими чорно-сірими колоніями є діагностичною для коагулазо-позитивних стафілококів. При подальшій інкубації більшість штамів коагулазопозитивних стафілококів утворюють непрозорі ореоли навколо колоній; вважається, що це пов'язано з дією ліпази. Не всі штами коагулазопозитивних стафілококів продукують обидві реакції.

Деякі штами коагулазонегативного стафілококу дають як прозорі зони, так і непрозорі ореоли, але досвідчені працівники можуть відрізнити їх від інших організмів за довшим часом інкубації. Деякі продукти, особливо сир, можуть утворювати типові чорно-сірі колонії коагулазопозитивних стафілококів, але без типової реакції на яєчний жовток. Це можна підтвердити за допомогою пробіркового коагулазного тесту.

Характеристика росту. Атипові колонії мають такий самий розмір, як і типові, але можуть бути блискучого чорного кольору з вузьким білим краєм або без нього; прозора зона або ореол непрозорості також можуть бути відсутніми або ледь помітними. Сірі колонії без прозорої зони також можна вважати атиповими.

Всі типові та атипові колонії вважайте коагулазопозитивними стафілококами, незалежно від негативних реакцій на середовищі, і проводьте подальші дослідження. Колонії деяких контамінуючих мікроорганізмів, що ростуть у безпосередній близькості до коагулазопозитивних колоній, можуть частково перетравлювати реакцію коагулазного ореолу.

Маніто-сольовий агар

Селективне середовище, приготоване відповідно до рекомендацій Чепмена для виділення імовірно патогенних стафілококів. Більшість інших бактерій пригнічуються високою концентрацією солі. Передбачувані коагулазопозитивні стафілококи утворюють колонії, оточені яскраво-жовтими зонами, в той час як непатогенні стафілококи утворюють колонії з червонувато-фіолетовими зонами. Манніто-сольовий агар рекомендується для виявлення та підрахунку коагулазопозитивних стафілококів у молоці, харчових продуктах та інших зразках.

Додавання 5 % об'ємної емульсії яєчного жовтка до маніто-сольового агару дозволяє виявити ліпазну активність стафілококів, а також ферментацію маніту. Висока концентрація солі в середовищі очищає емульсію яєчного жовтка, і виробництво ліпази виявляється у вигляді жовтої непрозорої зони навколо колоній стафілококів, які виробляють цей фермент.

Коагулазопозитивні стафілококи утворюють колонії з яскраво-жовтими зонами, тоді як коагулазонегативні стафілококи оточені червоною або фіолетовою зоною.

Деякі штами золотистого стафілококу можуть демонструвати уповільнену ферментацію маніту. Негативні пластини слід повторно інкубувати протягом ночі перед викиданням.

Імовірний стафілокок повинен бути підтверджений за допомогою коагулазного тесту.

Колумбійський кров'яний агар

Колумбійський кров'яний агар – це універсальне поживне середовище, яке зазвичай використовується в мікробіологічних лабораторіях. Він походить від традиційного кров'яного агару, який зазвичай готують на основі казеїнового гідролізату або м'ясного поживного середовища. Вибір основи в Колумбійському кров'яному агарі дає чіткі переваги для росту та ідентифікації бактерій.

У разі використання гідролізату казеїну це середовище сприяє швидкому утворенню великих колоній, що полегшує спостереження та аналіз. З іншого боку, при використанні м'ясного поживного середовища, Колумбійський кров'яний агар демонструє чітко окреслені зони гемолізу і забезпечує чудову диференціацію колоній.

Основу кров'яного агару готують із зневодненого порошку, стерилізують і охолоджують до 50–54 °C звичайним способом. До охолодженої агарової основи додають стерильну кров у співвідношенні 5–10 % і добре перемішують перед розливанням у планшети. Якщо стерильна кров зберігалася в холодильнику, перед додаванням в агарове середовище її слід підігріти до 37 °C, щоб уникнути термічного шоку для еритроцитів

Агар з ДНК

Векман і Кетлін припустили, що активність ДНК можна використовувати для ідентифікації патогенних стафілококів після того, як вони встановили тісну кореляцію з виробленням коагулази. Джефріс включили ДНК в агарове середовище, щоб забезпечити простий метод виявлення ДНК-азної активності. Організми наносять на поверхню агарового середовища та інкубують. Зростання на поверхні агару потім заливають 1N соляною кислотою. Полімеризована ДНК випадає в осад у присутності 1N HCl і робить середовище непрозорим. Якщо організми виробляють ферменти ДНК-ази в кількості, достатній для гідролізу ДНК, то навколо колоній спостерігаються прозорі зони.

Модифікація середовища полягає в додаванні маніту (1 % об'ємних одиниць) і фенолового червоного або бромтимолового синього (0,0025 % об'ємних одиниць) як індикатора ферментації маніту. Реакція pH навколо колоній повинна бути виміряна до того, як планшет буде залитий кислотою.

Звичайна соляна кислота є бактерицидною, і організми не можуть бути відновлені з поверхні агару після затоплення. Включення в середовище барвників, які можуть розрізнити гідроліз ДНК, є подальшою модифікацією, яка дозволяє уникнути використання кислоти. Толуїдиновий синій і метиловий зелений утворюють кольорові комплекси з полімеризованою ДНК; ці кольори змінюються в міру гідролізу ДНК.

Позитивна та негативна реакція гідролізу ДНК на різних модифікаціях ДНК агару.

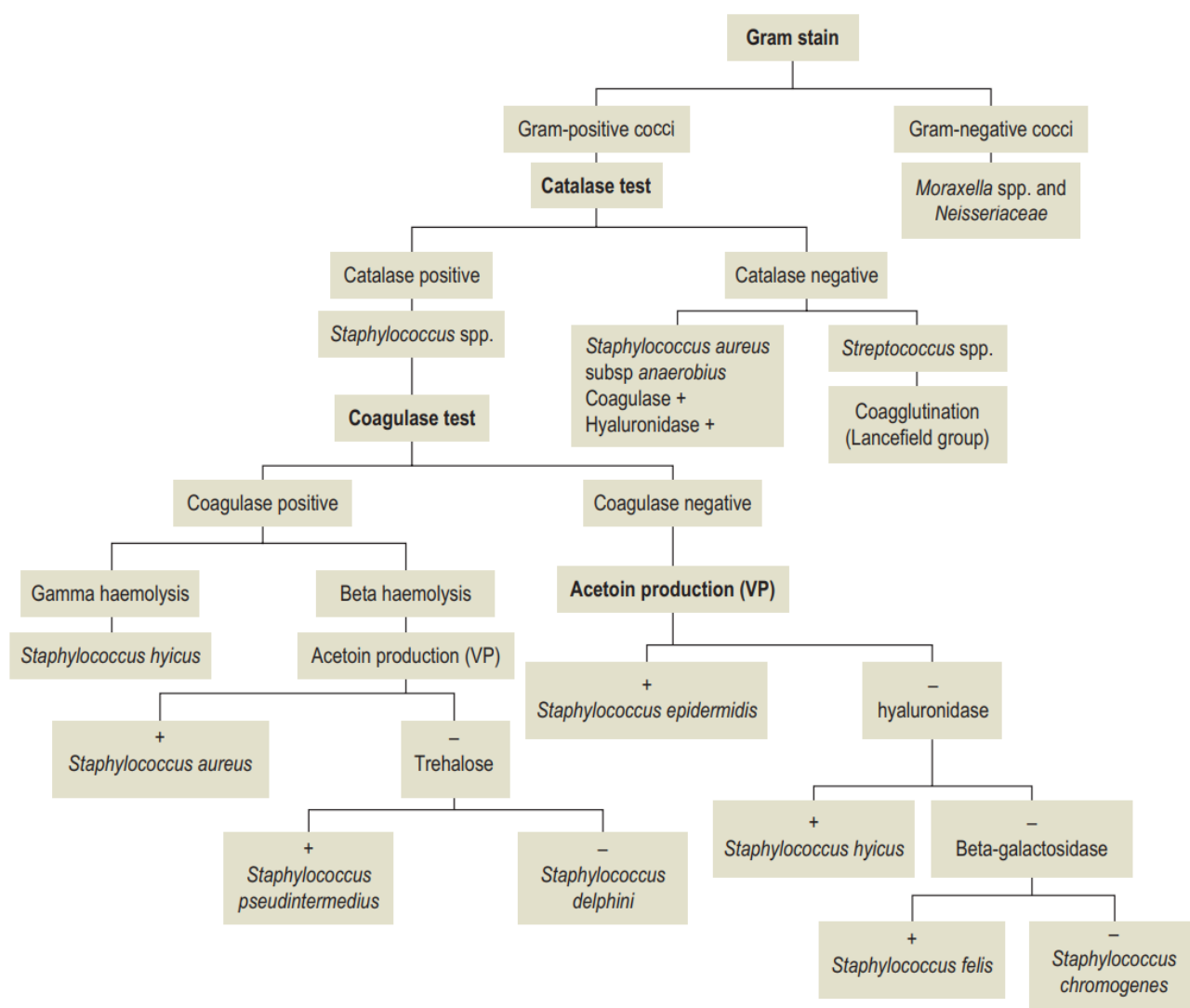
Таблиця 5

Інтерпретація результатів виявлення ДНКаз на різних модифікаціях ДНК агару

Зміни середовища	Інтерпретація результату
1 Індикатор манітолу / pH	
Жовтий, з жовтими зонами	Ферментує маніт
Збереження кольору середовища	Не ферментує маніт
2 Толуїдин синій:	
Рожеві зони в синьому середовищі	ДНКаза +
Без зон зміни кольору	ДНКаза –
3 Метиловий зелений:	
Майже безбарвні зони	ДНКаза +
Без зон зміни кольору	ДНКаза –
4 Проявлення сірчаною кислотою:	
Зони просвітлення середовища	ДНКаза +
Без зон просвітлення	ДНКаза –

ДОДАТОК 3

ПРИКЛАДИ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ СХЕМ ІДЕНТИФІКАЦІЇ СТАФІЛОКОКІВ



**Схема 1. Виявлення стафілококів, що найчастіше зустрічаються в
ветеринарній медицині**
(Джерело: Markey et al., 2013)

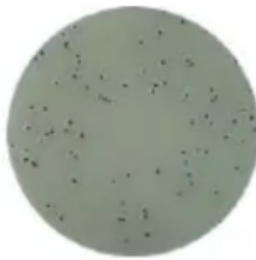
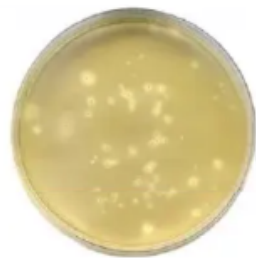
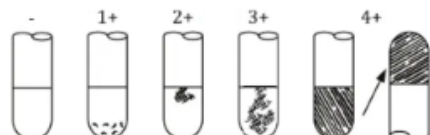
Метод з використанням агару BairdParker ISO 6888-1	Метод з використанням агару RPF ISO 6888-2
Внесення зарзку	
Внести на поверхню чашки 0,1 мл зразка, якщо він рідкий, або 0,1 мл розведеної суспензії (10^{-1}) для твердих продуктів. Інкубувати при температурі від 35 до 37°C протягом 24 ± 2 год	У чашку Петрі внести 1 мл початкової суспензії зразка, якщо він рідкий, або 0,1 мл початкової суспензії, якщо зразок твердий. Додати достатню кількість розплавленого агару RPF у кожен чашку Петрі, щоб досягти висоти середовища близько 3 мм. Інкубувати при температурі від 35 до 37°C протягом 24 ± 2 год.
Інтерпретація позитивного результату	
Досліджуються пластинки з щонайменше 15 характерними колоніями (чорними, блискучими, опуклими та галоподібними).	Опуклі чорні або сірі (іноді білі) колонії, оточені ореолом осаду, що свідчить про активність коагулази.
Додавтова реакція виявлення коагулази	
Візьміть 5 колоній (характерних або нехарактерних, якщо присутні лише характерні колонії) і висійте в пробірці з мозково-серцевим бульйоном. Інкубуйте при 35 або 37°C. Інкубувати при температурі від 35 до 37°C протягом 24 ± 2 год	 Ріст коагулазопозитивних стафілококів на середовищі Байд-Паркера  Ріст коагулазопозитивних стафілококів на середовищі з плазмою кроля
Додайте по 0,1 мл з кожної пробірки до 0,3 мл розведеної плазми крові кролика. Інкубувати при температурі від 35 до 37°C протягом 4-6 годин	
Після інкубування визначити утворення згустку	
	

Схема 3. Ідентифікація *S. aureus* та інших коагулазопозитивних стафілококів в продуктах харчування та кормах для тварин згідно ISO 6888.

(Джерело: www.analisisavanzados.es)

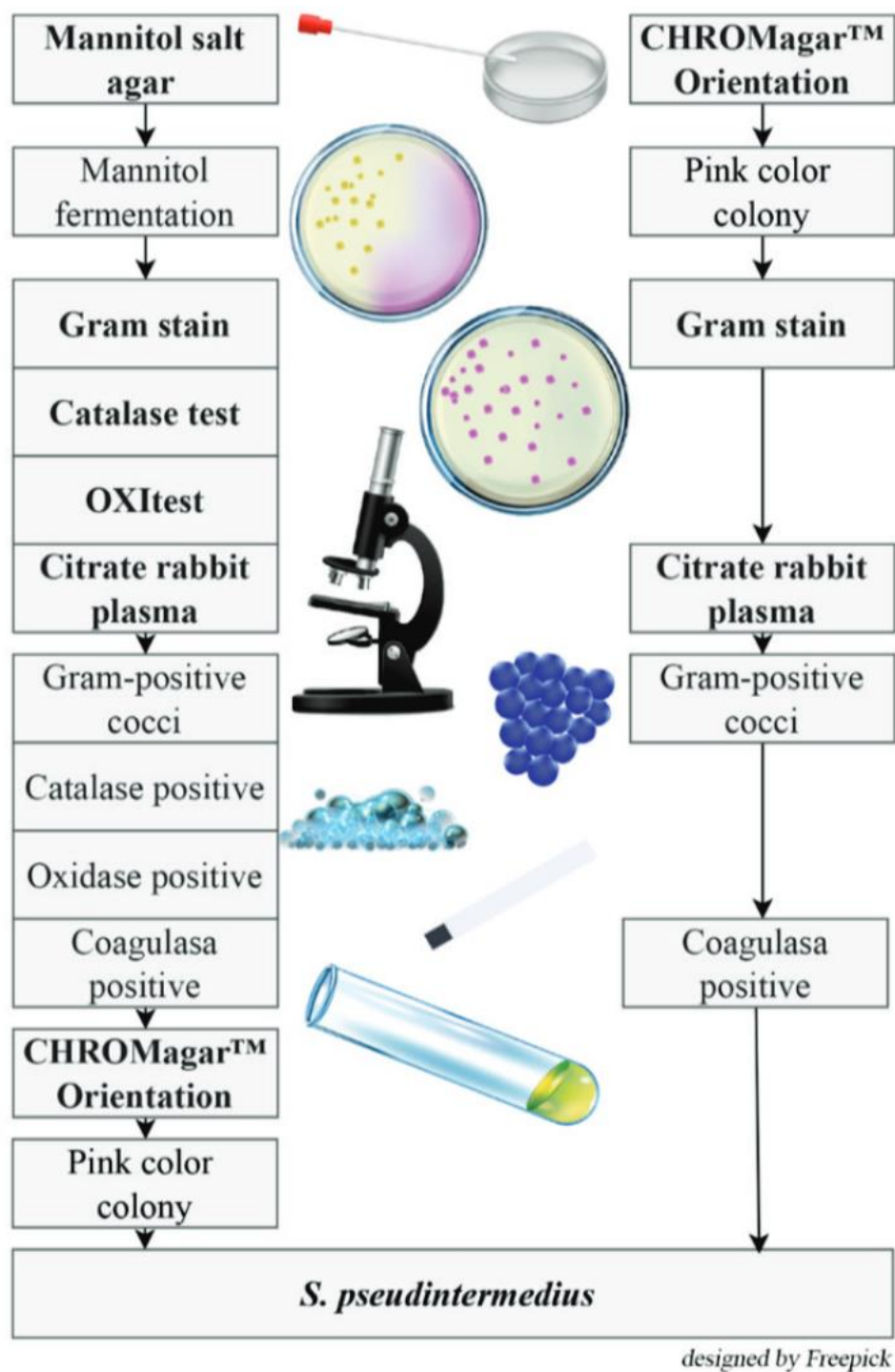


Схема 4. Використання хромогенного середовища для диференціації *S. aureus* та *S. pseudintermedius*
(Джерело: Оригінальна схема)

**СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ВИВЧЕННЯ СТАФІЛОКОКІВ:
МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ
ДІАГНОСТИКИ**

Методичні рекомендації

Шевченко Максим Віталійович
Андрійчук Андрій Віталійович
Тарасов Олександр Анатолійович
Мазур Тетяна Григорівна
Богатко Надія Михайлівна
Савченко Михайло Олександрович
Наумчук Вікторія Сергіївна
Петрук Ірина Петрівна
Царенко Тарас Михайлович