

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ШЕВЧЕНКО МАКСИМ ВІТАЛІЙОВИЧ

УДК 636.09:616.98:579.861.2:577.21(043.3)

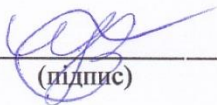
***STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* ТА**
***STAPHYLOCOCCUS AUREUS*: ПОШИРЕНІСТЬ У ТВАРИН,**
МІКРОБІОЛОГІЧНА І МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА
ХАРАКТЕРИСТИКА ТА АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ

Спеціальність: 211 – “Ветеринарна медицина”

Галузь знань: 21 – “Ветеринарна медицина”

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



(підпис)

Максим ШЕВЧЕНКО

Науковий керівник:

Тарас ЦАРЕНКО, завідувач кафедри
епізоотології та інфекційних хвороб,
кандидат ветеринарних наук, доцент

Біла Церква – 2024

АНОТАЦІЯ

Шевченко М.В. “*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність” – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина (21 – Ветеринарна медицина). Білоцерківський національний аграрний університет, Біла Церква, 2024.

Дисертація присвячена вивченню поширеності мікроорганізмів виду *Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus* серед собак, котів та корів в Україні, визначенню стійкості цих бактерій до антибіотиків, здатності до утворення біоплівки та наявності генів, пов'язаних із факторами патогенності.

В результаті дослідження препаратів-мазків, відібраних від клінічно здорових собак, встановлено, що *Staph. pseudintermedius* колонізує (24,1 %) носову порожнину та (7,6 %) вушний канал обстежених тварин.

Визначено види коагулазопозитивних стафілококів які брали участь в інфекційних процесах у собак та котів. *Staph. pseudintermedius* є одним з основних збудників, який виявляли у 23,4 % собак та 12,5 % котів, хворих на дерматологічні та ранові інфекції. Досліджено, що він є найпоширеніший стафілокок серед собак – 58 % від усіх виявлених представників роду *Staphylococcus*. У котів 30,8 % стафілококових інфекцій також спричинені цим видом бактерій. *Staph. aureus* у досліджених тварин зустрічається значно рідше, оскільки його виявлено у 5,2 % собак та 6,3 % котів.

У великої рогатої худоби *Staphylococcus spp.* є одним із найпоширеніших родів мікроорганізмів, що викликали внутрішньомамарні інфекції. Вони викликали інфекції самостійно і в асоціації з іншими мікроорганізмами. *Staph. aureus* виявлено у 33,3 % хворих тварин, а інші види стафілококів лише у 16,6 %. За клінічної форми маститу *Staph. aureus* зустрічався значно частіше, ніж інші стафілококи.

Проведено вивчення морфологічних та культуральних властивостей ізолятів стафілококів, отриманих від тварин. Усі виділені *Staphylococcus spp.* росли на селективних середовищах із концентрацією солі 4,5 %. *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* ферментували маніт, викликали згортання плазми крові кроля, були каталазопозитивними та оксидазонегативними. Оскільки досліджені мікроорганізми мають схожі морфологічні та культуральні властивості, провели низку мікробіологічних тестів для їх диференціації. Згідно з результатами наших досліджень 30,0 % штамів *Staph. pseudintermedius* спричиняли слабопозитивний результат реакції виявлення ацетоїну. Натомість, тест із використанням поліміксину Б дозволяв диференціювати всі досліджувані штами *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*.

Було вивчено чутливість та специфічність мікробіологічних схем діагностики з використання хромогенних середовищ. Колонії *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* мали відмінності під час культивування на хромогенних середовищах. На поверхні комерційного середовища CHROMagar Orientation колонії *Staph. aureus* набували жовтого кольору, тоді як *Staph. pseudintermedius* – рожевого. Схеми з використанням CHROMagar Orientation мали вищий рівень чутливості, порівняно зі схемою з використанням маніто-сольового агару.

Використання комбінації мікробіологічних та молекулярно-генетичних методів дозволило значно розширити інформацію про потенційні ризики, які становить кожен конкретний ізолят за рахунок виявлення притаманних йому генів патогенності.

Для видової диференціації польових штамів ми використовували реакцію класичної ПЛР. Проте умови реакції залежать від набору реактивів, які використовує кожна окрема лабораторія. Оптимізація протоколу ПЛР полягала в підборі оптимальної температури для етапу відпалу праймерів, щоб вони утворювали лише специфічний продукт ампліфікації із цільовою ділянкою ДНК стафілококів. Також було встановлено високу аналітичну

чутливість реакції ПЛР. Аналітичної чутливості методу було достатньо для виявлення генетичного матеріалу ізольованого з бактеріальній суспензії, що відповідає стандарту каламутності 0,5 за МакФарланда, розведеної в 10 разів.

Секвенування методом Сенгера ділянки гена стафілокової термонуклеази дозволило вивчити генетичні послідовності отриманих нами ізолятів та порівняти з послідовностями відомих штамів. Отримані нуклеотидні послідовності, мали високий відсоток ідентичності до послідовностей, внесених до бази даних GenBank, що підтримується Національним центром біотехнологічної інформації. Ідентифікацію чистих культур *Staph. pseudintermedius* проведено методом MALDI-TOF MS. За результатами мікробіологічних досліджень, ПЛР та MALDI-TOF MS було підтверджено остаточну видову належність отриманих нами ізолятів до *Staph. pseudintermedius*.

Важливою проблемою сучасної ветеринарії та медицини є поширення штамів бактерій, стійких до антибіотиків. Для аналізу поширення стійких штамів стафілококів, виділених від собак та котів протягом 2016 – 2020 років в різних країнах Європи, ми провели мета-аналіз даних, наведених у літературі. Загалом дані щодо стійкості до антибіотиків характеризувалися значною гетерогенністю між результатами різних дослідницьких груп. За даними літератури, найвищий рівень стійкості серед європейських ізолятів *Staph. pseudintermedius* виявлено до еритроміцину (52,9 %), тетрацикліну (43,8 %) та пеніциліну (34,8 %). *Staph. aureus* найчастіше проявляв стійкість до пеніциліну (66,9 %) та тетрацикліну (55,0 %).

За результатами нашого дослідження *Staph. aureus* від інфекційно хворих котів та собак найчастіше проявляли стійкість до пеніциліну (50,0 %), в свою чергу *Staph. pseudintermedius* – до триметоприму з сульфаметоксазолом (36,8 %), пеніциліну (18,2 %) та еритроміцину (18,2 %). Бактерії роду *Staph. aureus* ізольовані з молока від хворих на мастит корів найчастіше проявляли стійкість до ампіциліну (60,0 %) та тетрацикліну (23,3 %).

Найбільше занепокоєння викликає стійкість бактерій до антибіотиків з групи β -лактамів. Серед ізолятів виділених від собак та котів з інфекціями не виявили метицилінрезистентних стафілококів, однак виділили один ізолят метицилінрезистентного *Staph. pseudintermedius* (MRSP) з носової порожнини здорового собаки. Серед усіх *Staph. aureus*, виділених від корів, частка ізолятів метицилінрезистентного *Staph. aureus* (MRSA) становила 23,3 %. Паралельно з визначенням стійкості до антибіотиків було проведено дослідження на виявлення генів *mecA*, що кодують стійкість до метициліну.

Різні штами стафілококів відрізняються за факторами патогенності. Тому важливо детально охарактеризувати кожен окремий ізолят, щоб мати можливість прогнозувати його патогенний потенціал та ризик міжвидової передачі.

В експерименті було визначено потенціал до утворення біоплівки ізолятами стафілококів. Слабку здатність до утворення біоплівок мали 45,5 % *Staph. pseudintermedius* та 33,3 % *Staph. aureus*, помірну – 31,9 % та 50 % відповідно, сильну – 22,7 % та 16,7 % відповідно. Оскільки стафілококи відрізнялися за щільністю сформованої біоплівки, було вивчено поширення генів міжклітинної адгезії. Гени *icaA* та *icaD* у різних комбінаціях було виявлено у 96,7 % ізолятів *Staph. pseudintermedius*.

Комбінація генів визначає здатність штамів стафілококів уникати імунної відповіді та розпочинати інфекційний процес. Ген двокомпонентного стафілококового лейкотоксину *lukF* виявляли у 100 % досліджених бактерій, ген другого компоненту *lukS* – у 90,0 % ізолятів. Ген ексфоліативного токсину знаходили в усіх проаналізованих *Staph. pseudintermedius*.

Встановлено наявність численних факторів, що сприяють колонізації організму стафілококами у собак і котів та сприяє прояву інфекційного процесу. Практичне значення отриманих результатів підтверджено розробкою методичних рекомендацій, спрямованих на диференціацію коагулазопозитивних стафілококів між собою.

Отримані результати є важливими для оцінки поширеності стафілококів серед тварин в Україні. Дані про стійкість до антибіотиків і поширення факторів патогенності необхідні для визначення рівня небезпеки окремих штамів стафілококів. Діагностичні алгоритми та підходи до комплексного використання молекулярно-генетичних і мікробіологічних методів, розроблені в рамках виконання дисертаційної роботи, можуть бути використані в лабораторіях ветеринарної медицини та МОЗ.

Ключові слова: мікроорганізми, *Staphylococcus*, ПЛР, молоко, чутливість, антибіотики, стійкість до метициліну, біоплівка, тварини, діагностика, мікрофлора, собаки, коти

ANNOTATION

Shevchenko M.V. “*Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus aureus*: prevalence in animals, microbiological and molecular genetic characteristics and antibiotic resistance” - Qualifying scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 211 - Veterinary Medicine (21 - Veterinary Medicine). Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, 2024.

The dissertation is devoted to the study of the prevalence of microorganisms of the species *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus aureus* among dogs, cats and cows in Ukraine, determination of the resistance of these bacteria to antibiotics, the ability to form biofilms and the presence of genes associated with pathogenicity factors.

As a result of the study of smear preparations taken from clinically healthy dogs, it was found that *Staph. pseudintermedius* colonizes (24,1%) the nasal cavity and (7,6%) the ear canal of the examined animals.

The species of coagulase-positive staphylococci involved in infectious processes in dogs and cats were identified. *Staph. pseudintermedius* is one of the main pathogens, which was detected in 23,4 % of dogs and 12,5 % of cats with dermatological and wound infections. It was found that it is the most common

Staphylococcus among dogs – 58,0 % of all detected representatives of the genus *Staphylococcus*. In cats, 30,8% of staphylococcal infections are also caused by this type of bacteria. *Staph. aureus* is much less common in the studied animals, as it was detected in 5,2% of dogs and 6,3% of cats.

In cattle, *Staphylococcus spp.* is one of the most common genera of microorganisms that caused intra-mammary infections. They caused infections independently and in association with other microorganisms. *Staph. aureus* was detected in 33,3% of the diseased animals, and other types of staphylococci in only 16,6%. In the clinical form of mastitis, *Staph. aureus* was much more common than other staphylococci.

The morphological and cultural properties of staphylococcal isolates obtained from animals were studied. All isolated *Staphylococcus spp.* grew on selective media with a salt concentration of 4,5 %. *Staph. aureus* and *Staph. pseudintermedius* fermented mannitol, caused coagulation of rabbit plasma, were catalase-positive and oxidase-negative. Since the studied microorganisms have similar morphological and cultural properties, a number of microbiological tests were performed to differentiate them. According to the results of our studies, 30,0 % of *Staph. pseudintermedius* strains caused a weakly positive acetone detection reaction. In contrast, the test using polymyxin B allowed to differentiate all tested strains of *Staph. pseudintermedius* and *Staph. aureus*.

The sensitivity and specificity of microbiological diagnostic schemes using chromogenic media were studied. Colonies of *Staph. aureus* and *Staph. pseudintermedius* had differences during cultivation on chromogenic media. On the surface of the commercial CHROMagar Orientation medium, *Staph. aureus* colonies turned yellow, while *Staph. pseudintermedius* colonies turned pink. The schemes using CHROMagar Orientation had a higher level of sensitivity compared to the scheme using mannitol salt agar.

The use of a combination of microbiological and molecular genetic methods allowed us to significantly expand information about the potential risks posed by each specific isolate by identifying its inherent pathogenicity genes.

For species differentiation of field strains, we used a classical PCR reaction. However, the reaction conditions depend on the set of reagents used by each individual laboratory. The PCR protocol was optimized by selecting the optimal temperature for the primer annealing step so that they would form only a specific amplification product with the target DNA region of staphylococci. The high analytical sensitivity of the PCR reaction was also established. The analytical sensitivity of the method was sufficient to detect genetic material isolated from a bacterial suspension that meets the McFarland turbidity standard of 0.5 diluted 10 times.

The Sanger sequencing of the staphylococcal thermonuclease gene allowed us to study the genetic sequences of the isolates we obtained and compare them with those of known strains. The obtained nucleotide sequences had a high percentage of identity to the sequences included in the GenBank database maintained by the National Center for Biotechnology Information. Identification of pure cultures of *Staph. pseudintermedius* was performed by MALDI-TOF MS. Based on the results of microbiological studies, PCR and MALDI-TOF MS, the final species affiliation of the isolates obtained by us to *Staph. pseudintermedius* was confirmed.

An important problem of modern veterinary medicine is the spread of antibiotic-resistant bacterial strains. To analyze the spread of resistant strains of staphylococci isolated from dogs and cats during 2016-2020 in different European countries, we conducted a meta-analysis of the data presented in the literature. In general, antibiotic resistance data were characterized by significant heterogeneity between the results of different research groups. According to the literature, the highest level of resistance among European isolates of *Staph. pseudintermedius* was found to erythromycin (52,9 %), tetracycline (43,8 %) and penicillin (34,8 %). *Staph. aureus* was most often resistant to penicillin (66,9 %) and tetracycline (55,0 %).

According to the results of our study, *Staph. aureus* from infected cats and dogs were most often resistant to penicillin (50,0 %), while *Staph. pseudintermedius* was resistant to trimethoprim with sulfamethoxazole (36,8%), penicillin (18,2 %)

and erythromycin (18,2%). Bacteria of the genus *Staph. aureus* isolated from milk from cows with mastitis most often showed resistance to ampicillin (60%) and tetracycline (23,3%).

The greatest concern is the resistance of bacteria to antibiotics from the β -lactam group. No methicillin-resistant staphylococci were found among the isolates from dogs and cats with infections, but one isolate of methicillin-resistant *Staph. pseudintermedius* (MRSP) was isolated from the nasal cavity of a healthy dog. Among all *Staph. aureus* isolated from cows, the proportion of methicillin-resistant *Staph. aureus* (MRSA) isolates was 23,3 %. In parallel with the determination of antibiotic resistance, a study was conducted to identify *mecA* genes encoding methicillin resistance.

Different strains of staphylococci differ in pathogenicity factors. Therefore, it is important to characterize each individual isolate in detail to be able to predict its pathogenic potential and the risk of interspecies transmission.

The experiment determined the potential for biofilm formation by staphylococcal isolates. Weak biofilm formation ability was observed in 45,5 % of *Staph. pseudintermedius* and 33,3 % of *Staph. aureus*, moderate – 31,9 % and 50,0 %, respectively, and strong – 22,7 % and 16,7 %, respectively. Since staphylococci differed in the density of the formed biofilm, the distribution of intercellular adhesion genes was studied. The *icaA* and *icaD* genes in various combinations were detected in 96,7 % of *Staph. pseudintermedius* isolates.

The combination of genes determines the ability of staphylococcal strains to avoid the immune response and initiate the infectious process. The gene of the two-component staphylococcal leukotoxin *lukF* was detected in 100% of the studied bacteria, the gene of the second component *lukS* - in 90,0% of the isolates. The exfoliative toxin gene was found in all analyzed *Staph. pseudintermedius*.

The presence of numerous factors contributing to the colonization of the body by staphylococci in dogs and cats and promoting the manifestation of the infectious process was established. The practical significance of the results obtained was

confirmed by the development of methodological recommendations aimed at differentiating coagulase-positive staphylococci among themselves.

The results are important for assessing the prevalence of staphylococci among animals in Ukraine. Data on antibiotic resistance and the spread of pathogenicity factors are necessary to determine the level of danger of individual strains of staphylococci. The diagnostic algorithms and approaches to the integrated use of molecular genetics and microbiological methods developed in the framework of the dissertation can be used in the laboratories of veterinary medicine and the Ministry of Health.

Key words: microorganisms, *Staphylococcus*, PCR, milk, sensitivity, antibiotics, resistance to methicillin, biofilm, animals, diagnostics, microflora, dogs, cats.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. **Шевченко, М. В.**, Савченко, М. О., Ярчук, Б. М., Сахнюк, Н. І. та Царенко Т. М. (2021). Коагулазопозитивні стафілококи у собак та їх антимікробна резистентність (систематичний огляд). Науковий вісник ветеринарної медицини, 1, 104–118. DOI: 10.33245/2310-4902-2021-165-1-104-118 (здобувач провів аналіз літературних джерел, систематизував дані сформував висновки та брав участь у написанні статті, 0,63 д.а.).

2. **Шевченко, М. В.**, Тишківська, Н. В., Андрійчук, А. В., Мартиненко, О. А. та Царенко, Т. М. (2022) Внутрішньолабораторна апробація протоколу ПЛР для молекулярно-генетичної ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus spp.* Науковий вісник ветеринарної медицини, 2, 81–91. DOI: 10.33245/2310-4902-2022-173-1-81-91 (здобувач визначив оптимальні умови та апробував протокол ПЛР сформулював висновки та брав участь у написанні статті, 0,42 д.а.).

3. **Шевченко, М. В.**, Тарасов, О. А., Андрійчук, А. В., Гончаренко, В. П. та Царенко, Т. М. (2023). Оптимізація лабораторних ПЛР-протоколів для

точної ідентифікації *S. aureus* та *S. pseudintermedius* у собак. Ветеринарна біотехнологія, 43, 175–185. DOI: 10.31073/vet_biotech43-17 (здобувач визначив оптимальні умови та апробував протокол ПЛР, проаналізував генетичну послідовність стафілококів, порівняв її з базами даних та сформулював висновки, 0,42 д.а.).

4. **Шевченко, М. В.** та Андрійчук, А. В. (2023). Антибіотикорезистентність ізолятів *Staphylococcus spp.* та *Streptococcus spp.*, що спричиняють мастит на молочних фермах України. Науковий вісник ветеринарної медицини, 1, 81–88. DOI: 10.33245/2310-4902-2023-180-1-81-88 (здобувач провів мікробіологічні дослідження, систематизував дані та брав участь у написанні статті, 0,3 д.а.).

5. **Shevchenko M.** & Tsarenko T. (2023) Microbiological and molecular genetic characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*. *Nauk. visn. vet. med.* 135–144. DOI: 10.33245/2310-4902-2023-184-2-135-144 (здобувач провів морфологічні та культуральні дослідження сформулював висновки та брав участь написанні статті 0,3 д.а.).

Статті в наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of Science Core Collection:

6. **Shevchenko, M.,** Andriichuk, A., Goncharenko, V., & Dovhal. O. (2023) Mastitis prevention and control: Integration of microbiological and management approaches. *Scientific Horizons.* 26 (7), 19–33. DOI: 10.48077/scihor7.2023.19 (здобувач брав участь у мікробіологічних дослідженнях, систематизував дані та брав участь у написанні статті, 0,63 д.а.).

7. **Shevchenko, M.,** Andriichuk, A., Bilyk, S., Dovhal, O., Mazur, T., & Tsarenko, T. (2023). Biofilm forming ability of coagulase-positive staphylococci isolated from animals in Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems,* 14(4), 576–580. DOI: 10.15421/022384 (здобувач вивчив біоплівкоутворювальні

властивості стафілококів, систематизував дані та брав участь у написанні статті, 0,33 д.а.).

8. **Shevchenko, M.**, Andriichuk, A., Naumchuk, V., Petruk, I., Bilyk, S., & Tsarenko, T. (2023). Zoonotic *Staphylococcus spp.* among domestic animals in Ukraine: Antibiotic resistance and diagnostic approaches. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(3), 378–385. DOI: 10.15421/10.15421/022356 *(здобувач брав участь у мікробіологічних дослідженнях, систематизував дані та брав участь у написанні статті, 0,21 д.а.).*

Матеріали науково-практичних конференцій:

9. **Шевченко, М. В.** та Царенко Т. М. (2021). Коагулазопозитивні стафілококи за концепцією “Єдине здоров’я”. Біобезпека, захист та благополуччя тварин: тези доповідей Міжнародної науково-практичної конференції. Київ. 129–131 *(здобувач провів аналіз літературних джерел та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.).*

10. **Шевченко, М. В.** Виявлення колонізації собак бактеріями роду *Staphylococcus spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції. Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин: матеріали II Науково-практичної міжнародної дистанційної конференції. Харків. 63–65.

11. **Шевченко, М. В.** та Царенко, Т. М. (2022). Оптимізація протоколу визначення *Staphylococcus spp.* методом ПЛР. Ветеринарна медицина: сучасні виклики і актуальні проблеми науки, освіти та продовольчої безпеки: матеріали Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції. Житомир. 256–258 *(здобувач провів оптимізацію протоколу дослідження та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.).*

12. **Шевченко, М. В.** та Царенко, Т. М. (2022). Ідентифікація коагулазопозитивних стафілококів (CoPS) мікробіологічними методами. Єдине здоров’я – 2022: матеріали Міжнародної наукової конференції. Київ.

304-306 (здобувач вивчив діагностичні протоколи та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.).

13. **Шевченко, М. В.,** Андрійчук, А. В. та Царенко, Т. М. (2022). Використання ПЛР для виявлення метицилінрезистентних штамів стафілококів. Досягнення та перспективи ветеринарної науки: тези доповідей Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції молодих вчених. Полтава. 113–115 (здобувач провів дослідження генів стійкості до метициліну *tesA* та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.).

14. **Шевченко, М. В.,** Андрійчук, А. В. та Царенко, Т. М. (2022). Ідентифікація родин *Staphylococcus spp.* групи КПС мікробіологічними методами. Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту: матеріали міжнародної науково-практичної конференції. Біла Церква. 48–50 (здобувач провів дослідження стафілококів мікробіологічними методами та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.).

15. **Шевченко, М. В.,** Білик, Б. П. та Царенко, Т. М. (2022). Диференціація *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* методом ПЛР. Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини. Житомир. 303–305 (здобувач провів дослідження стафілококів методом ПЛР та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.).

16. **Шевченко, М. В.,** Андрійчук, А. В., Білик, Б. П. та Царенко, Т. М. (2022). Бактеріальні збудники нозокоміальні інфекцій в ветеринарній медицині. Біобезпека, захист та благополуччя тварин: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. Київ. 136–139 (здобувач провів аналіз літературних джерел та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.).

17. **Шевченко, М. В.,** Савченко, М. О., Андрійчук, А. В., Довгаль, О. В., Білик С. А. та Царенко Т. М. (2023). Контамінація серветок для вимені та її вплив на розповсюдження інфекційних маститів. III Міжнародна науково-практична конференції “Актуальні аспекти розвитку науки і освіти”. Одеса.

152–155 (здобувач провів дослідження стафілококів мікробіологічними методами та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.).

18. **Шевченко, М. В.**, Савченко, М. О., Андрійчук, А. В., Довгаль, О.В., Білик, С. А. та Царенко, Т. М. (2023). Секвенування фрагмента *nis* гена *S. pseudintermedius*. Міжнародна науково-практична конференція “Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту”. Біла Церква. 75–76 (здобувач провів дослідження стафілококів мікробіологічними методами та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.).

Методичні рекомендації:

19. **Шевченко, М. В.**, Андрійчук, А. В., Тарасов, О. А., Мазур, Т. Г., Богатко, Н. М., Наумчук, В. С., Петрук, І. П., Савченко, М. О., Царенко, Т. М. (2024). Сучасні підходи до дослідження стафілококів: мікробіологічні та молекулярно-генетичні методи діагностики. Біла Церква. 46 с. (Здобувач брав безпосередню участь у проведенні досліджень, підготовці та написанні рекомендацій 1,9 д.а.).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ОДИНИЦЬ І СКОРОЧЕНЬ	17
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	26
1.1. Характеристика роду <i>Staphylococcus spp.</i>	26
1.2. Фактори патогенності та вірулентності <i>Staphylococcus spp.</i>	27
1.3. Ідентифікація та диференціація коагулазопозитивних стафілококів.....	30
1.4. Поширення стафілококів серед людей	33
1.5. Поширення стафілококів серед тварин.....	34
1.6. Стафілококи в навколишньому середовищі	36
1.7. Стійкість до метициліну	37
1.8. Біоплівки як фактор патогенності стафілококів.....	41
Висновки до розділу 1.....	44
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	46
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	65
3.1. Поширення стафілококів у клінічно здорових та інфекційно хворих тварин.....	65
3.1.1. Поширення стафілококів у собак та котів	65
3.1.2. Поширення стафілококів у корів	68
3.2. Культуральні та біохімічні особливості коагулазопозитивних стафілококів.....	70
3.2.1. Культуральні та біохімічні особливості стафілококів, ізольованих від собак та котів.....	70
3.2.2. Культуральні та біохімічні особливості стафілококів, ізольованих від хворих на мастит корів	76
3.2.3. Порівняльна характеристика мікробіологічних підходів до виявлення та ідентифікації стафілококів	77
3.3. Стійкість стафілококів до антибіотиків.....	82

3.3.1. Стійкість до антибіотиків у коагулазопозитивних стафілококів, ізольованих від собак та котів	82
3.3.2. Систематичний огляд та <i>мета-аналіз</i> стійкості <i>Staph. aureus</i> та <i>Staph. pseudintermedius</i> до антибіотиків.....	86
3.3.3. Стійкість до антибіотиків стафілококів ізольованих від хворих на мастит корів.....	90
3.4. Активність утворення біоплівки ізолятами <i>Staph. pseudintermedius</i> та <i>Staph. aureus</i>	91
3.5. Молекулярно-генетична характеристика стафілококів	98
3.5.1. Ідентифікація та диференціація <i>Staph. pseudintermedius</i> та <i>Staph. aureus</i> методом ПЛР.....	99
3.5.2. Секвенування гена термонуклеази <i>Staph. pseudintermedius</i> за Сенгером.....	104
3.5.3. Поширення гена стійкості до метициліну серед ізолятів <i>Staph. pseudintermedius</i> та <i>Staph. aureus</i>	108
3.5.4. Поширення генів позаклітинного адгезину серед ізолятів <i>Staph. pseudintermedius</i>	110
3.5.5. Поширення генів ексфоліативного та лейкоцитарного токсину серед ізолятів <i>Staph. pseudintermedius</i>	111
Висновки до розділу 3.....	113
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	
ДОСЛІДЖЕННЯ	116
ВИСНОВКИ	133
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	136
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	137
ДОДАТКИ	176

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ОДИНИЦЬ І СКОРОЧЕНЬ

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДНКаза – фермент дезоксирибонуклеаза

ІПНКСВМ – Інститут післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини

ІФА – імуноферментний аналіз

КНС – коагулазонегативні стафілококи

КПС – коагулазопозитивні стафілококи

ЛПК – ліофілізована плазма кроля

мкг – мікрограм

мкл – мікролітр

мкм – мікрометр

МСА – маніто-сольовий агар

П – помірно чутливий до антибіотиків ізолят

п. н. – пар нуклеотидів

ПЗБ – пеніцилін-зв'язувальний білок

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

р – достовірна вірогідність

Р – резистентний до антибіотиків ізолят

Ч – чутливий до антибіотиків ізолят

СС – клональний комплекс

ChrO – CHROMagar Orientation

СІ – достовірний інтервал

CLSI – Інститут клінічних та лабораторних стандартів

E. coli – *Escherichia coli*

ЕUCAST – Європейський комітет з тестування чутливості до антимікробних препаратів

F – критерій порівняння дисперсій груп

Н₀ – нульова гіпотеза

MALDI-TOF MS – метод матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації

MRSA – метицилінрезистентний *Staph. aureus*

MRSP – метицилінрезистентний *Staph. pseudintermedius*

OD – оптична густина

SCC_{mec} – стафілококова касетна хромосома *mec*

SD – стандартне відхилення

SIG – група *Staphylococcus intermedius*

ST – секвенс тип

Staph. spp. – вид *Staphylococcus*

Str. – *Streptococcus*

W – критерій порівняння рангових сум

χ^2 – критерій відповідності емпіричного розподілу

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Стафілококи – різноманітна група мікроорганізмів, що можуть колонізувати організм тварин та людини і викликати інфекцій різних систем та органів. Усі види стафілококів поділяють на дві групи залежно від того, чи виробляють вони фермент коагулазу. Коагулазонегативні стафілококи (КНС) мають менший ступінь патогенності і зазвичай викликають локалізовані інфекції. Коагулазопозитивні стафілококи (КПС) зазвичай асоціюються з більшим ступенем патогенності та ризиками, які вони несуть для здоров'я. Два види, що входять до групи КПС – *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius*, найбільш поширені стафілококи, які викликають інфекції у тварин [1].

Staph. aureus – це зоонозний збудник, що має значний потенціал до міжвидової передачі. Важливу роль у цьому відіграє еволюційна динаміка, оскільки вона впливає на генетичну мінливість та адаптацію мікроорганізмів до нових господарів. Існує значна кількість досліджень, спрямованих на вивчення поширення та факторів, які впливають на міжвидову передачу *Staph. aureus*. Проте залишається ряд відкритих питань, на які ще потрібно дати відповідь [2–5].

Останнім часом зростає кількість досліджень, що вивчають поширення та патогенний потенціал *Staph. pseudintermedius*. Цей стафілокок переважно колонізує організм собак, проте з'являється дедалі більше повідомлень про інфекції людей, спричинені цим мікроорганізмом. *Staph. pseudintermedius* асоціюється не лише з інфікуванням ран, отриманих внаслідок укусів собак, але й з іншими ендогенними та екзогенними інфекціями. Фактори, які визначають вірулентність *Staph. pseudintermedius*, вимагають додаткових досліджень [6–10].

Стафілококи здатні набувати стійкості до антибактеріальних препаратів, що ускладнює лікування викликаних ними інфекцій. Особливо гостро постає питання резистентності до β -лактамних антибіотиків. Метицилінрезистентні *Staph. pseudintermedius* (MRSP) та *Staph. aureus* (MRSA) є важливими

збудниками нозокоміальних інфекцій. Люди, які постійно контактують з тваринами можуть бути колонізовані клональними лініями MRSA з високим потенціалом міжвидової передачі. Водночас, інформації про небезпечні штами MRSP менше, хоча вони також можуть викликати колонізацію людей, які тісно взаємодіють з тваринами [11–13].

Через схожість культуральних та біохімічних ознак *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* їх легко сплутати під час визначення видової приналежності цих бактерій. Точна ідентифікація цих патогенів має важливе значення при оцінці ризиків, пов'язаних з поширенням антибіотикорезистентних штамів. Проблема з вивченням патогенних *Staph. pseudintermedius* частково зумовлена помилковою ідентифікацією його як *Staph. aureus*. Для ефективного вирішення цього завдання необхідно розробляти нові схеми мікробіологічної діагностики та впроваджувати в лабораторну практику молекулярно-генетичні методи [14–16].

В останні роки в Україні активно вивчаються проблеми, пов'язані з поширенням стафілококів, їх стійкість до антибіотиків та фактори, що визначають інфекційний потенціал. Козицька Т. І. та Вішован Ю. Ю. у своїх дослідженнях висвітлюють аспекти поширення генів стійкості до метициліну та рівня біоплівкоутворювальних властивостей [17,18].

Питання поширення та точної діагностики *Staph. pseudintermedius* серед популяції тварин в Україні має значення для формування системи контролю захворювань. Означені питання мають високу актуальність та стали основою формування мети і завдань дисертаційних досліджень.

Мета та завдання дослідження. Мета дослідження – вивчити поширення бактерій виду *Staph. aureus* і *Staph. pseudintermedius* серед тварин, провести мікробіологічну та молекулярно-генетичну характеристику ізолятів та визначити їх стійкість до антибіотиків.

Для досягнення мети були поставлені **завдання**:

– встановити поширення коагулазопозитивних стафілококів у клінічно здорових собак;

- вивчити участь бактерій родини *Staphylococcus spp.* в інфекціях собак, котів та корів;
- встановити культурально-морфологічні та біологічні особливості ізолятів *Staphylococcus spp.* виділених від тварин;
- визначити стійкість отриманих ізолятів до антибіотиків;
- виявити поширення метицилінрезистентних штамів стафілококів;
- вивчити рівень біоплівкоутворювальних властивостей КПС, отриманих від хворих та клінічно здорових тварин;
- проаналізувати гени патогенності та біоплівкоутворювальних властивостей в ізолятів *Staph. pseudintermedius*;
- оптимізувати та апробувати протоколи ідентифікації стафілококів з молекулярно-генетичних методів досліджень;
- удосконалити схеми мікробіологічної діагностики *Staph. pseudintermedius* з використанням хромогенних середовищ.

Об'єкт дослідження – бактерії виду *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*, мікробіологічні та молекулярно-генетичні особливості ізолятів, стійкість до антибіотиків та методи діагностики.

Предмет дослідження – собаки, коти та корови, ізоляти бактерій, гени стійкості до метициліну, біоплівка, протоколи проведення ПЛР, хромогенні мікробіологічні середовища, генетична послідовність консервативного гена *Staph. pseudintermedius*.

Методи досліджень. Епізоотологічні – визначення поширення бактерій *Staphylococcus spp.* серед клінічно здорових та хворих тварин. Бактеріологічні культурально-морфологічні, ферментативні, визначення чутливості до антибіотиків, визначення щільності утворення біоплівки. Молекулярно-генетичні – класична полімеразна ланцюгова реакція для виявлення генів патогенності та генів асоційованих з утворенням біоплівки, полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі для виявлення генів стійкості до антибіотиків, секвенування за Сенгером.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше в Україні проведено визначення поширення колонізації порожнини носа та зовнішнього вуха бактеріями *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* у клінічно здорових собак. Встановлено, що *Staph. pseudintermedius* колонізували носову порожнину (24,1 %) собак частіше ($p < 0,001$), ніж зовнішнє вухо (7,6 %).

Вивчено види стафілококів, що беруть участь в інфекціях різних ділянок тіла собак і котів. Встановлено, що *Staph. pseudintermedius* частіше приймає участь в інфекціях собак та котів ($p < 0,001$), ніж *Staph. aureus*. Виявлено метицилінстійкий *Staph. pseudintermedius* у носовій порожнині 1,7 % клінічно здорових собаки. Описано культуральні характеристики росту *Staph. pseudintermedius* на комерційному середовищі CHROMagar Orientation (Франція).

У 2022–2023 рр. проведено моніторинг поширення стафілококів серед молочних стад. Визначено, що *Staph. aureus* є найпоширенішим (33,3 %) видом бактерій, який зустрічається у молоці корів, хворих на клінічний та субклінічний мастит.

Визначено що, ізоляти *Staphylococcus* від тварин-компаньйонів найчастіше (32,1 %) проявляли стійкість до комбінації триметоприму та сульфаметоксазолу, метицилінстійких штамів серед них не було. Бактерій *Staph. pseudintermedius* ($11 \pm 8,7$ мм) та *Staph. aureus* ($12 \pm 6,2$ мм) мають статистично однакові ($p = 0,9$) зони затримки росту навколо диску з цим антибіотиком. Бактерії виду *Staph. aureus*, отримані від великої рогатої худоби, найчастіше були стійкими до бензилпеніциліну (60,0 %). MRSA ізоляти були присутні у молоці 7,7 % досліджених корів.

Вивчено утворення біоплівки коагулазопозитивними стафілококами ізольованими від різних видів тварин (собак, котів та корів) в Україні. Встановлено, що по 20,0 % ізолятів *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus* утворюють біоплівку високої щільності.

Отримано нові дані щодо поширення генів ексфоліативного токсину *siet*, лейкоцитарного токсину *LukF* і *LukS* та генів міжклітинного андезину *icaA*, та *icaD* серед ізолятів *Staph. pseudintermedius* в Україні.

Вперше проведено секвенування гена термонуклеази методом Сенгера в ізолятах *Staph. pseudintermedius*, які циркулюють в Україні. Підтверджено високий ступінь подібності отриманих послідовностей до тих, що внесені до геномної бази даних Gen Bank.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Матеріали дисертаційної роботи є частиною наукових тем кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Білоцерківського національного аграрного університету: “Молекулярна діагностика та генотипування збудників інфекційних хвороб тварин” № держреєстрації 0121U110290 та “Вивчення ролі умовно патогенних мікроорганізмів в етіології та патогенезі хвороб тварин” № держреєстрації 0121U110291. Частково дослідження були профінансовані за рахунок гранту BioUkraine (Small research grant of the US-Ukraine foundation biotech initiative, no 21, 2021).

Практичне значення отриманих результатів. Представлені практичні рекомендації з використання молекулярно-генетичних методів та хромогенних середовищ за лабораторних дослідженнях стафілококів. Описано культуральні особливості росту *Staph. pseudintermedius* на середовищі CHROMagar Orientation та запропоновано схему ідентифікації стафілококів із застосуванням хромогенних середовищ у ветеринарній лабораторній практиці. Обґрунтовано використання ДНК, ідентифікованої методом секвенування в якості позитивного контролю в реакції ПЛР, та чистої культури, підтвердженої за допомогою MALDI-TOF MS, в якості позитивного контролю в мікробіологічних дослідженнях. Опубліковано методичні рекомендації з вивчення поширення стафілококів серед тварин.

Матеріали дисертації, результати досліджень та розроблені методичні рекомендації використовуються під час проведення наукових досліджень у лабораторіях “Лабораторія зоонозних інфекцій та оцінки ризиків” та

“Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин” Інституту ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук, та у навчальному процесі в університетах України.

Особистий внесок здобувача. Автор особисто здійснив пошук інформації та аналіз літератури за темою дисертаційної роботи. Провів мікробіологічні та молекулярно-генетичні дослідження, систематизував і описав отримані дані.

Постановка мети та завдань, планування експериментальних досліджень, обговорення результатів та формування висновків були проведені під керівництвом наукового керівника, кандидата ветеринарних наук, доцента Царенка Т. М.

Культури стафілококів, ізольовані від хворих тварин, досліджені в рамках наукового співробітництва з Волинською регіональною державною лабораторією державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів.

Секвенування гена послідовності виконано в співпраці зі спеціалістами компанії “Експлоген” (Львів, Україна), здобувач самостійно провів біоінформаційний аналіз отриманих генетичних послідовностей.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися, обговорювалися і були схвалені на міжнародних, державних наукових і науково-практичних конференціях: Міжнародна науково-практична конференція “Біобезпека, захист та благополуччя тварин” (Київ, 27 травня 2021 р.); Науково-практична міжнародна дистанційна конференція “Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин” (Харків, 17 березня 2022 р.); Всеукраїнська науково-практична конференція “Ветеринарна медицина: сучасні виклики і актуальні проблеми науки, освіти та продовольчої безпеки: матеріали” (Житомир, 9–10 червня 2022 р.); Міжнародна наукова конференція

“Єдине здоров’я – 2022” (Київ, 22–24 вересня 2022 р.); Міжнародна науково-практична конференція “Досягнення та перспективи ветеринарної науки” (Полтава, 20 жовтня 2022 р.); Міжнародна науково-практична конференція “Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту” (Біла Церква, 20 жовтня 2022 р.); “Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини” (Житомир, 12-13 жовтня 2022 р.); Міжнародна науково-практична конференція “Біобезпека, захист та благополуччя тварин” (Київ, 21 листопада 2022 р.); III Міжнародна науково-практична конференція “Актуальні аспекти розвитку науки і освіти” (Одеса, 9–10 листопада 2023 р.); Міжнародна науково-практична конференція “Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту” (Біла Церква, 20 жовтня 2023 р.).

Публікації. Результати дисертаційної роботи опубліковано в 19 наукових працях, зокрема: 3 статті у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та Web of Science; 5 статей у виданнях, що належать до переліку наукових фахових видань України, з них 4 – у Науковому віснику ветеринарної медицини Білоцерківського національного аграрного університету та 1-а у Науковому бюлетені “Ветеринарна біотехнологія”; 10 публікацій у матеріалах і тезах конференцій; одні методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів виконання роботи, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і 10 додатків. Дисертацію викладено на 214 сторінках комп’ютерного тексту, ілюстровано 24 таблицями та 20 рисунками. Список використаних джерел містить 273 найменування.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика роду *Staphylococcus spp.*

Staphylococcus spp. – це рід грампозитивних сферичних бактерій діаметром від 0,5 до 1 мкм, які діляться в трьох вимірах утворюючи характерні скупчення, які при мікроскопії схожі на “виноградне гроно”. Ці нерухомі бактерії, факультативні анаероби, що не утворюють спор та капсул. *Staphylococcus* разом з іншими родами, *Bacillus*, *Gemella*, *Listeria* і *Planococcus*, входять до родини *Staphylococcaceae*, порядку *Bacillales* [19, 20].

З 1962 року, коли було описано 3 види стафілококів проведено масштабний перегляд таксономії цього роду. Розвиток молекулярно-генетичних методів надав інструменти розширення відомостей про ці мікроорганізми. Лише за останні чотири роки було описано 5 нових видів стафілококів [21–25]. Загалом на сьогодні відомо понад 60 видів [26].

Відповідно до особливостей гена 16S RNA стафілококи умовно можна поділити на 15 філогенетичних груп. Комплексна оцінка еволюційних зв'язків між різними видами стафілококів допомагає в розумінні закономірностей отримання та втрати генетичних факторів, що визначають патогенний та зоонозний потенціал [27].

Коагулазопозитивні стафілококи (КПС) – це коменсальні бактерії, що є частиною нормальної мікрофлори шкіри та носової порожнини, однак вони можуть викликати опортуністичні інфекції у тварин і людей [28].

У ветеринарній бактеріології важливе значення мають дев'ять видів КПС, що найчастіше зустрічаються у різних видів тварин. *Staphylococcus aureus* [29] входить до філогенетичної групи *epidermidis* та є поширеним стафілококом, який виявляють у людей, тварин і птиці. *Staphylococcus hyicus* [30] можна визначити як коагулазозалежний вид, оскільки не всі штами можуть викликати згортання плазми крові [8]. Цей стафілокок належить до генетичної групи *hyicus* та, в основному, зустрічається у свиней. *Staph. intermedius* [31], *Staph. pseudintermedius* [32],

Staph. delphini [33], *Staph. coagulans* (раніше *Staph. schleiferi subsp. coagulans*) [34, 35], *Staph. lutrae* [36], *Staph. agnetis* [37] та *Staph. cornubiensis* [38] належать до філогенетичної групи *intermedius*. Ця група включає найбільшу кількість коагулазопозитивних видів та, в основному, зустрічається у тварин. Через високу спорідненість ці бактерії важко відрізнити за допомогою мікробіологічних методів [8].

Залежно від наявності спільних отологічних факторів стафілококи можна розділити на три групи спорідненості: А, В та С. Отологічні гени або білки виконують схожі функції в різних організмах, а їх порівняння може розкривати еволюційні та функціональні аспекти бактерій. Група А та В охоплюють *Staph. aureus* та ряд коагулазонегативних стафілококів, що найчастіше ідентифікують як збудники хвороб у людей [39]. Також стафілококи цих груп є поширеними збудниками, що колонізують організм корів та викликають інфекції у цього виду тварин [40]. Своєю чергою, до групи С входять ті самі види, що входять до групи *Staphylococcus intermedius* (SIG) [41].

1.2. Фактори патогенності та вірулентності *Staphylococcus spp.*

Впродовж тривалої еволюції разом із ссавцями-господарями стафілококи набули численних факторів, що допомагають їм уникати дії імунної системи та ефективно руйнувати тканини організму господаря з метою отримання поживних речовин.

Staph. aureus використовує численні стратегії для адаптації до організму господаря, зокрема мутації в ключових генах патогенності та приховані хромосомні перебудови, що сприяють інвазивності та стійкості інфекції. Штами *Staph. aureus*, що специфічні до певного господаря, мають ряд пристосувань, які допомагають уникати вродженого імунітету саме цього виду тварин [42].

Під час колонізації адаптовані та первинні штами конкурують між собою за життєвий простір та ресурси [43].

Велика кількість детермінант стафілокової вірулентності та патогенності містяться у додатковому геномі, що значною мірою представлений мобільними генетичними елементами. З 90 ідентифікованих генів патогенності *Staph. aureus* лише 35 були спільними для всіх досліджених штамів [44, 45]. Для виду *Staph. pseudintermedius* ситуація протилежна: більшість штамів мають подібні гени патогенності. Однак, слід зазначити, що сам факт наявності певних генетичних елементів у геномі бактерій не означає обов'язкової експресії кодованих ними факторів [46]. Різні фактори патогенності бактерії відповідають за окремі аспекти взаємодії з організмом господаря.

Пороутворювальні токсини впливають на мембрани клітин господаря. Гемолізینی руйнують еритроцити та викликають їх гемоліз. Стафілококи виділяють α , β та γ гемолізینی, які відрізняються за хімічною структурою та механізмом дії. Альфа-гемолізін, або альфа-токсин – один з основних стафілококових токсинів, що мають цитотоксичний ефект. Окрім КПС, цей гемолізін можуть виробляти близько 30 % *Staph. epidermedius* та 80 % *Staph. hemoliticus*. Бета-гемолізін – це фосфоліпаза С, унікальна для тваринних штамів стафілококів. Бета-токсин потенціює дію альфа-токсину. Бета-гемоліз також викликають переважна кількість коагулазопозитивних стафілококів та деякі коагулазонегативні види [47–49].

Лейкотоксин Пантон-Валентайна, який притаманний лише *Staph. aureus*, та двокомпонентний лейкотоксин спрямовані на руйнування мембран лейкоцитів [50–52].

Водночас, різноманітні ферменти, такі як каталаза та гіалуронідаза, інактивують фактори впливу імунних клітин. Ексфоліативний токсин впливає на цілісність епітеліальної тканини та спрощує проникнення до організму [53]. Фактори, що викликають аглютинацію різних білків, маскують бактеріальні антигени та забезпечують адгезію на поверхнях організму [54]. Коагуляція плазми крові притаманна найбільш патогенним видам стафілококів [55, 56].

Механізми, які лежать в основі утворення згустку відрізняються між *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius*.

У золотистого стафілокока присутні два гени: ген *coa*, що кодує класичну стафілококову коагулазу, та ген *vwb*, що кодує зв'язуючий білок фон Віллебранда. У інших видів, які входять до групи КПС, присутній лише ген *vwb*. Відмінності у будові та розташуванні гена *vwb* в геномі вказують на можливість його незалежного набуття різними видами стафілококів та мутації, спрямовані на збільшення його специфічності до господаря у різних стафілококів [57].

Механізми регуляції експресії генів, що кодують фактори патогенності, є складними та розгалуженими. Частина регуляторних систем є вузькоспеціалізованою і забезпечує відповідь на конкретні умови в організмі господаря. В той же час інші системи, такі як кворум система *agr*, *SaeRS*, *SarA*, *Rot*, *ArlRS* і *MgrA*, мають більш глобальний вплив на регуляцію експресії декількох генів [58].

Важливим фактором, що обумовлює ризики для здоров'я, пов'язані з коагулазопозитивними стафілококами, є продукція ними ентеротоксинів. Це група з понад 20 екзотоксинів, що мають схожі функції та входять до складу різних мобільних генетичних елементів. Часто стафілококи містять більше одного гена, що кодує ентеротоксини, з них найбільш поширені *SEA* і *SEB* [59– 61].

Staph. pseudintermedius, так само як *Staph. aureus*, продукує ентеротоксини. Штами, ізольовані від людей, містять більше різних генів, які кодують синтез ентеротоксинів, ніж штами, виділені від собак [62–64].

Окрім спричинення токсикоінфекцій, ентеротоксини виконують функцію суперантигенів, викликаючи надмірну активацію Т-лімфоцитів, тим самим знижуючи специфічність імунної відповіді [65].

1.3. Ідентифікація та диференціація коагулазопозитивних стафілококів

Для виділення та ідентифікації стафілококів використовують селективні поживні середовища, які містять більше 4 % концентрацію хлориду натрію. Така висока концентрація солі пригнічує ріст більшості негалофільних (не солестійких) мікроорганізмів [66].

Консервативними ознаками для всього роду *Staphylococcus* є наявність ферменту каталази та відсутність цитохромоксидази. Тести, спрямовані на виявлення цих ферментів, прості та швидкі у виконанні, тому широко застосовуються в рутинній мікробіологічній діагностиці. Виявлення каталази дозволяє диференціювати стафілококи від інших родів грампозитивних коків – *Enterococcus* та *Streptococcus*. Натомість наявність цитохромоксидази характерна лише для роду *Micrococcus spp.*

У клінічних лабораторіях для первинного посіву матеріалів від хворих тварин можуть використовувати кров'яний агар. Це середовище містить еритроцити тварин, зазвичай барана, які руйнуються під впливом бактеріальних гемолізинів. *Staph. aureus* продукує альфа- і бета-гемолізин, утворюючи подвійну зону гемолізу тоді як *Staph. pseudintermedius* продукує лише бета-гемолізин, спричинюючи утворення прозорої зони гемолізу без зеленуватого відтінку [67].

Слід зазначити, що деякі штами *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* можуть не викликати гемоліз при культивуванні на кров'яному агарі [68,69].

Реакція коагуляції плазми крові використовується для виявлення більш патогенних, коагулазопозитивних стафілококів. Є два методи постановки реакції: швидкий тест на склі та коагуляція плазми в пробірці. За допомогою першого методу можна виявити фактор злипання *Staph. aureus*, що зв'язаний з бактеріальною мембраною. Інші КПС переважно негативні в цій реакції. Вільна коагулаза – це фермент, що виділяють стафілококи під час інкубації з плазмою крові в пробірці. Цей фермент викликає перетворення фібриногену в фібрин, у результаті чого утворюється гелеподібний згусток [70].

Для диференціації *Staph. aureus* від інших коагулазопозитивних стафілококів, що мають ветеринарне значення, потрібно використовувати низку біохімічних реакцій. Бактерії групи SIG, на відміну від інших КПС, виробляють β -галактозидазу та не виробляють ацетоїн [71].

Проте поширений метод виявлення наявності β -галактозидази з використанням субстрату о-нітрофеніл- β -D-галактопіранозиду (ONPG) не підходить для диференціації стафілококів, оскільки *Staph. aureus* дає хибнопозитивний результат при взаємодії з цим субстратом [72]. Також деякі штами *Staph. pseudintermedius* можуть бути позитивними в реакції, спрямованій на виявлення продукції ацетоїну [73].

Staph. aureus відрізняється від видів *Staph. coagulans* та *Staph. pseudintermedius* рівнем чутливості до антибіотика поліміксин Б. При постановці тесту на чутливість до антибіотиків з дифузиею в агар *Staph. aureus* буде утворювати меншу зону затримки росту навколо диску з препаратом [71]. *Staph. hyicus* відрізняється від інших КПС відсутністю ферментації мальтози [74] та наявністю ліполітичної активності у полісорбаті, хоча ця особливість варіюється між штамми [75]. *Staph. coagulans*, своєю чергою, не ферментує трегалозу [32].

За повідомленнями Börjesson S. та інші через схожість культуральних та біохімічних особливостей частина ізолятів *Staph. pseudintermedius*, що надходила до лабораторії, де використовували стандартні діагностичні протоколи, були помилково ідентифіковані як *Staph. aureus* [15].

Для ефективної і точної ідентифікації та диференціації стафілококів ліпше застосовувати комбінацію різних методів досліджень. Молекулярно-генетичні методи можна використати для прямого виявлення збудника в патологічному матеріалі або для підтвердження видової належності чистої культури. Різні авторські колективи розробили родоспецифічні та видоспецифічні праймери, спрямовані на ділянки консервативних генів, наприклад: *agr*, *tuf*, *nuc* та 16S rRNA [16, 76–78].

Sasaki T. та інші розробили набір праймерів для постановки мультиплексної реакції, спрямованої на виявлення найпоширеніших коагулазопозитивних стафілококів [16].

Матрично-активована лазерна десорбція/іонізація, ще один чутливий та специфічний метод, проте його можна застосувати лише до чистої культури. На відміну від ПЛР, де для виявлення кожного виду необхідний набір окремих праймерів, цей метод дозволяє визначати будь який вид, що внесений до бази даних. Проте використання цих методів, збільшує вартість одного дослідження. Незважаючи на низьку чутливість мікробіологічних методів, використання фенотипових і швидких біохімічних тестів для ідентифікації ізолятів *Staph. aureus* може бути виправдано з огляду на собівартість [14].

Окрім видової різноманітності стафілококів вони мають складну генетичну структуру, яка розвивалася в процесі еволюції. Через це різні штами одного виду можуть значно відрізнитися генетично, тобто мати виражену клональність [79].

Для характеристики штамів стафілококів можна застосовувати різні методи. Мультиплексне секвенування тандемних повторів (MLST), надає важливу інформацію про генетичне різноманіття різних ізолятів та спрощує їх порівняння. Цей метод ґрунтується на аналізі набору з 7 видоспецифічних генів, які присутні у всіх представників виду та мають високий рівень поліморфізму між різними штамами. Ізоляти з ідентичними генетичними послідовностями всіх семи алелей вважаються клонами, тобто мають однакову геномну структуру. Такі штами відносять до одного секвенс-типу (sequence type, ST). Послідовності, які відрізняються одонуклеотидним поліморфізмом менш ніж трьох локусах, вважаються близькоспорідненими і об'єднуються в клональні комплекси (clonal complexes, CC). Клональні комплекси позначаються номером ST того штаму, який вперше був віднесений до даного комплексу [80, 81].

На сьогодні розроблено методики для вивчення послідовностей двох коагулазопозитивних стафілококів – *Staphylococcus aureus* [82] та

Staph. pseudintermedius [83]. Інші коагулазопозитивні види вивчені менш детально через те, що в базах даних наявна невелика кількість відсеквенованих повних геномів.

Різноманіття клональних ліній пояснює широке поширення *Staph. aureus* між різними видами тварин та його зоонозний потенціал. Хоча, *Staph. aureus* розглядають як багатовидовий патоген, окремі фенотипи мають більшу пристосованість до конкретного виду тварин. Існує три основні докази того, що певні штами *Staph. aureus* локально адаптовані до певних таксонів ссавців, а не однаково здатні колонізувати всіх господарів. По-перше, спостерігається філогенетична кластеризація штамів у межах одного виду тварин. По-друге, виявлено наявність генів, специфічно адаптованих до конкретного організму-носія. По-третє, під час адаптації до нового господаря відбувається інактивація або втрата генів, які були важливими для взаємодії з первинним господарем [3].

На відміну від *Staph. aureus*, різні генотипи *Staph. pseudintermedius* не мають чітко визначених факторів патогенності, що пов'язані з певним господарем. Гени, що забезпечують адаптацію *Staph. pseudintermedius*, часто зазнають змін під тиском навколишнього середовища. Тому окремі клональні лінії не асоційовані з ефективністю поширенням в конкретній екологічній ніші [84].

1.4. Поширення стафілоkokів серед людей

Staph. aureus – це видоспецифічний для людини стафілоkok, що колонізує понад 30 % людської популяції. Постійними носіями є 20 % здорового дорослого населення, а також >30 % мають періодичну колонізацію [5].

Фактори, що допомагають *Staph. pseudintermedius* колонізувати людину, вивчені недостатньо. Загалом колонізація людей *Staph. pseudintermedius* рідкісна, зазвичай короткотривала та найчастіше виявляється у власників домашніх тварин [7, 8]. Ряд дослідників висловлюють думку, що

пристосування *Staph. pseudintermedius* до людини може бути пов'язане, в першу чергу, з набуттям генів мультирезистентності до антибіотиків [85]. Передача збудника, найімовірніше відбувається за тісного контакту з твариною або фекально-оральним шляхом [10]. Існує, ризик інфікування господарів собак, навіть без сприятливих умов, таких як імунодефіцит [7].

Лікарі ветеринарної медицини мають дещо вищі ризики бути колонізованими *Staph. pseudintermedius* [64].

Оскільки коагулазопозитивні стафілококи часто колонізують пащу тварин, укуси собак та котів можуть ускладнюватись розвитком стафілококових інфекцій [86–88].

Інший представник групи SIG – *Staph. intermedius* також має потенціал до колонізації та інфікування людей. Бактерії SIG у людей часто виявляють у полімікробних інфекціях. Також за стафілококових інфекцій збудниками у картках пацієнтів рідко відмічається контакт з собаками. Проте це може свідчити, що на цей аспект у гуманній медицині звертають недостатню увагу [89, 90].

1.5. Поширення стафілококів серед тварин

У процесі еволюції *Staph. aureus* перейшов від людей до тварини. Молекулярне датування показало, що передача *Staph. aureus* від людини до великої рогатої худоби відбулася після одомашнення, ще за 5500 до нашої ери [91–93].

В подальшому індустріалізація тваринництва призвела до збільшення контактів між тваринами. А застосування великої кількості антибіотиків підвищило селективний тиск на бактерії [92].

Передача штамів *Staph. aureus* від людини до тварини, та в зворотному напрямку займає менший проміжок часу, ніж в інших бактеріальних патогенів. Стафілококи які перейшли від первинного до вторинного господаря, часто мають мобільні генетичні елементи, що не притаманні клональним лініям, асоційованим з первинним господарем. Тобто для ефективної міжвидової

передачі *Staph. aureus* має набути нових генетичних факторів, що будуть сприяти адаптації до вторинного господаря [5]

До великої рогатої худоби найліпше адаптовані клональні комплекси CC8, CC97, CC133 і CC151 [3, 93–96]. Стафілококи, в основному викликають ураження молочної залози корів [97].

Клональні комплекси CC97 та CC133 мають високий зоонозний потенціал та визначається як найбільш поширений генотип, ідентифікований у 15 різних країнах. Ці штами часто колонізують організм людей, які постійно контактують з великою рогатою худобою [98, 99]. Навпаки, штами CC151 переважно пов'язані з коровами і раніше не були виявлені серед людей. Штами, що входять до цього клонального комплексу, поширені серед поголів'я корів в американських і європейських країнах та часто спричиняють спалахи маститу великої рогатої худоби [91].

Штами *Staph. aureus*, що були отримані від корів, демонструють вищу здатність ферментувати лактозу, основний дисахарид, що міститься в коров'ячому молоці [92]. Проте на сьогодні немає чіткої моделі розподілу генів адгезії або синтезу токсинів серед різних клональних ліній *Staph. aureus*, асоційованих з великою рогатою худобою [99].

Штами *Staph. aureus* які поширені серед котів та собак, переважно асоційовані з людиною [100]. Собаки та коти в домогосподарствах перебувають у тісному контакті з їхніми господарями, що спричиняє потенційну передачу *Staph. aureus* між домашніми тваринами та їхніми власниками. Ізоляти, отримані від людей та собак в одному домогосподарстві демонструють схожі генотипові профілі [101, 102]. Золотистий стафілокок, що колонізує котів, також має людське походження. Цей збудник частіше зустрічається у домашніх, ніж у безпритульних тварин [103–105].

Найпоширеніші клональні комплекси, що можна виявити у тварин-компаньйонів (CC22, CC5, CC8, CC59 і CC398), поширені серед популяції людей, що вказує на односторонню передачу від людини до тварини [7, 106–108].

Загалом собаки та коти більш сприйнятливі до колонізації *Staph. pseudintermedius* та *Staph. coagulans*. Вони перебувають в інших філогенетичних групах, ніж *Staph. aureus* та споріднені до нього види, що асоційовані з людьми [109].

Staph. pseudintermedius – найпоширеніший коагулазопозитивний стафілокок, що зустрічається у собак [110]. Ступінь колонізації різних ділянок тіла тварин відрізняється [111].

Staph. pseudintermedius необхідний компонент здорової мікробіоти собак. Проте не відомо, які фактори призводять до того, що умовно-патогенні штами *Staph. pseudintermedius* розпочинають інфекційний процес [112].

ST45, ST71, ST496, ST258 та ST64 – найпоширеніші клональні лінії *Staph. pseudintermedius*, що виявляють у собак по всьому світі. В небагатьох дослідженнях, пов'язаних з вивченням генетичного профілю людських ізолятів, найчастіше визначали клон ST71. Також це найбільш домінуючий клон, що зустрічається у собак по всьому світі [10].

Коагулазопозитивні стафілококи можуть викликати ураження як поверхневих, так і глибоких шарів шкіри. Розвитку бактеріальної піодермії у собак сприяють як фактори господаря, так і особливості будови собачої шкіри [113]. Бактерії цієї групи найчастіше виявляють інфекції зовнішнього та середнього вуха [114–116], кон'юнктиви [117], сечових шляхів, респіраторного тракту та можуть викликати мастити у сук [112, 118].

1.6. Стафілококи в навколишньому середовищі

Бактерії *Staphylococcus spp.* – найпоширеніші збудники нозокоміальних інфекцій. Джерелом таких стійких штамів є інфіковані тварини під час лікування [119].

Колонізовані стафілококами поверхні в лікарнях ветеринарної та гуманної медицини є основним джерелом передачі та поширення стійких до антибіотиків штамів коагулазопозитивних стафілококів [41, 120–123].

Також ці бактерії виявляють у формі біоаерозолів. При вдиханні повітря, бактерії осідають у легенях та носовій порожнині працівників, колонізуючи їх [124].

Крім цього, цей збудник можна виявити у стічних лікарняних водах [125]. Поверхневі води є одним з важливих факторів поширення антибіотикостійких стафілококів [102]. Клональні лінії *Staph. aureus*, що були виявлені у воді, зазвичай мають тваринне походження [126].

Окрім лікарень, стафілококи поширюються на тваринницьких комплексах та птахофабриках [127–129]. *Staph. aureus* виявляють у повітрі та на робочих поверхнях підприємств з переробки продукції тваринництва. Невеликі виробництва з ручною працею мають вищий рівень виявлення стафілококів порівняно з великими автоматизованими підприємствами [130].

1.7. Стійкість до метициліну

Staphylococcus spp. універсальні та адаптивні бактерії які спроможні набувати стійкості до антибіотиків [131].

Стійкість бактерій до антибіотиків може забезпечуватись за рахунок спонтанних мутацій у хромосомах або придбання екзогенного ДНК через мобільні генетичні елементи внаслідок вертикального або горизонтального переносу генів [132].

Для захисту від впливу антибіотиків бактерії можуть перешкоджати потраплянню препарату в середину клітини, активно виводити молекули антибіотиків у навколишнє середовище, виробляти ферменти для інактивації препаратів або змінювати білки-мішені, які беруть важливу участь у процесах метаболізму [133].

Staph. aureus входить до групи збудників ESKAPE, що вважаються найбільш поширеними збудниками лікарняних інфекцій у всьому світі [134–136]. *Staph. pseudintermedius* має менше значення у розвитку інфекцій людей, проте має велике значення у етіології нозокоміальних хвороб [137].

В контексті стафілококів найбільш небезпечним вважається набуття стійкості до β -лактамних антибіотиків. Штами, які мають високий потенціал до міжвидової передачі, можуть отримати гени стійкості в організмі одного виду тварин та викликати інфекції в іншого виду тварин [138].

Стійкість до β -лактамних антибіотиків виникає внаслідок активації специфічних та неспецифічних механізмів. Ці препарати впливають на пеніцилін-зв'язувальний білок (ПЗБ), який є необхідним компонентом для утворення клітинної стінки після поділу бактерій [139].

Неспецифічна стійкість формується за рахунок ефлюксних помп. У *Staph. aureus* описано понад 15 таких помп, їх гени закодовані в хромосомах та плазмідах. Механізми виведення антибіотиків у *Staph. pseudintermedius* менш досліджені, проте гени, з ними асоційовані, дуже схожі на відповідні гени золотистого стафілокока [132, 138].

Найвищий рівень стійкості стафілококів формується до антибіотиків пеніцилінової групи. Бактерії виробляють ферменти, які розщеплюють β -лактамне кільце антибіотиків, внаслідок чого вони втрачають свою антибактеріальну активність [140]. Такі ферменти називаються β -лактамазами або пеніциліназами. Після потрапляння антибіотику в місце інфекції, стафілококи починають продукувати ці ферменти в навколишнє середовище та активно руйнувати антимікробні сполуки [141].

Резистентність бактерій до β -лактамних препаратів найчастіше виникає внаслідок мутацій у генах *blaZ*, що кодують пеніцилінази стафілококів. Ці мутації призводять до посилення активності ферментів та підвищення здатності бактерій руйнувати антибіотики. Експресія гену *blaZ*, регулюється двома іншими генами – *blaI* та *blaRI* [139, 142].

Проте цефалоспоринові антибіотики стійкі до впливу β -лактамаз. Щоб забезпечити стійкість до всіх антибіотиків цього класу, бактерії виробляють альтернативний пеніцилін-зв'язувальний білок 2a (ПЗБ2a). Цей білок виконує аналогічні функції звичайному ПЗБ, проте не є цільовим для впливу антибіотиків [141].

Синтез ПЗБ2а регулюється генами *tecA* та *tecC*, що входять до стафілококової хромосомної касети *tec* (SCC*tec*). Це група мобільних генетичних елементів, які швидко поширюються між бактеріями, що містяться в одній екологічній ніші. Хромосомна касета має еволюційне походження від коагулазонегативних стафілококів, та була отримана *Staph. aureus* шляхом міжвидового горизонтального перенесення генів [143].

Хромосомні касети SCC*tec* мають різне походження, через що існують певні відмінності в їхній структурі. Клас касети SCC*tec* визначається комбінацією специфічних регуляторних генів всередині неї, які контролюють експресію гена стійкості *tec* [144].

Перше повідомлення про ізоляцію від людини резистентного до метициліну *Staph. aureus* (MRSA) з'явилося у 1961 році [145]. Згодом MRSA було виявлено у собак [146] та великої рогатої худоби [147].

Штами MRSA є поширеною причиною інфекцій, асоційованих як з лікарняним (HA-MRSA), так і з позалікарняним середовищем (CA-MRSA). Штами HA-MRSA зазвичай мають вищу філогенетичну різноманітність та часто є більш патогенними. Формування стійкості бактерій до антибіотиків значною мірою зумовлене використанням антибіотиків для лікування тварин [148]. Найчастіше позалікарняні штами MRSA пов'язані з великою рогатою худобою (LA-MRSA). Тварини є постійним резервуаром MRSA та можуть стати джерелом інфекції для людини [149]. LA-MRSA асоціюється не тільки з коровами, а й зі свинями, та становлять найвищу небезпеку для працівників ферми та ветеринарів [150, 151].

Найпоширеніші штами метицилінрезистентного золотистого стафілокока (MRSA) в Європі належать до клональних комплексів CC97, CC398 та CC1. Ці клони широко поширені серед популяцій корів та свиней. Еволюційно вони мають людське походження і несуть високі зоонозні ризики. Менш поширені лінії, такі як CC5 і CC8, переважно специфічні до тварин, також були виявлені в молоці та молочних продуктах на різних континентах.

Стійкість до метициліну цих клональних ліній опосередкована *mecA* генами [150, 152, 153].

Зоонозні MRSA штами також можуть з'являтися шляхом набуття генів стійкості *mecC*. Штами *mecC*-MRSA асоційовані з великою рогатою худобою та, в основному, належать до CC130 [102,108]. Ці ізоляти зазвичай виділяють у тварин, але рідко у людей [154].

Носійство MRSA у домашніх тварин виявлялося переважно за умов наявності людини-носія MRSA в тому самому домогосподарстві [12]. Дикі коти, які мало контактують з людьми, мають меншу ймовірність стати носіями стійких бактерій, ніж домашні тварини [103–105].

Стійкість *Staph. pseudintermedius* до β -лактамних антибіотиків виникає через ті самі механізми, що і *Staph. aureus*. Найпоширеніша клональна лінія в Європі – ST71, найчастіше проявляє стійкість до цих препаратів. Проте з'являється дедалі більше повідомлень з окремих країн Європи про домінування інших резистентних штамів ST551 та CC258. В межах однієї клональної лінії різні штами можуть мати різні типи SCC*mec*. Всі метицилінрезистентні штами *Staph. pseudintermedius*, що ізолювали від людей, пов'язані з клональними лініями, поширеними серед собак та котів [155–157].

Попри схожі механізми набуття стійкості до β -лактамних антибіотиків у *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius*, методи виявлення метицилінстійких штамів відрізняються.

Метицилін – перший антибіотик (1961 р.), що використовували для ідентифікації стафілококів, які продукують ПЗБ2а, саме він дав назву цим штамам – MRSA. Згодом його замінили на іншу сполуку – оксацилін. З 2007 року в методичних рекомендаціях Інституту клінічних лабораторних стандартів (CLSI) для виявлення MRSA рекомендовано використовувати цефокситин. Ряд досліджень довели, що метод з використанням оксациліну для визначення стійкості *Staph. aureus* має нижчий рівень чутливості та специфічності порівняно з методом з використанням цефокситину. Проте існує обмеження щодо застосування цефокситину – до нього стійкі лише

штами з *mecA*-опосередкованим механізмом резистентності [158, 159]. З іншого боку використання цефокситину для визначення стійкості *Staph. pseudintermedius* має нижчий рівень чутливості, ніж дисків з оксациліном, що відзначено в лабораторних стандартах [160].

1.8. Біоплівки як фактор патогенності стафілококів

Біоплівки – це складні скупчення мікроорганізмів, оточені позаклітинною полімерною речовиною (ППР). Це природна форма існування бактерій. Сполуки, що входять до полімерної речовини, виконують функції прикріплення бактеріальної спільноти до поверхонь та її захисту від несприятливих факторів [161]. Стафілококи не утворюють капсули, тому біоплівки захищають від висихання та впливу ультрафіолетового випромінювання, що спричинює колонізацію бактеріями навколишнього середовища [162, 163].

Основна сполука, що входить до складу ППР – вода. Оскільки вода добрий розчинник, бактерії в біоплівці можуть ефективно обмінюватися інформацією за допомогою сигнальних молекул та мобільних генетичних елементів. Вода в біоплівках може перебувати у зв'язаній і вільній формах. Також у воді розчиняються поживні речовини, що дозволяє розподіляти їх між усіма бактеріями спільноти [164].

Каркас біоплівки утворюють численні полімерні молекули: білки, полісахариди, нуклеїнові кислоти та ліпіди. Різноманіття сполук, що входять до складу структури, забезпечує стійкість до різних факторів довкілля, оскільки не існує єдиного класу ферментів, здатних повністю знищити біоплівку [165, 166].

Біоплівка може формуватися як декількома родами мікроорганізмів, так і складатися з одного виду. Структури, утворені одним видом, складаються з різних популяцій, які відрізняються між собою [167, 168]. Через обмежену кількість поживних речовин, бактерії постійно конкурують між собою. Формування біоплівки бактеріями є складним багатоетапним процесом, що

включає прикріплення окремих клітин до поверхні, їх подальше розмноження та утворення зрілої тривимірної структури. Цей процес регулюється низкою молекулярних механізмів і дозволяє бактеріям виживати в несприятливих умовах [169–171].

На першій стадії формування біоплівки планктонні клітини, що вільно плавають, починають процес первинного прикріплення. Ця фаза залежить від факторів навколишнього середовища, і прикріплення на цій стадії є нестійким [172–174]. Бактерії прикріплюється до поверхні за допомогою різних факторів, включаючи поверхневі адгезини, стінкові тейхоєві кислоти, зміни гідрофобності бактеріальної клітини і виробництво eДНК. Одну з найважливіших функцій прикріплення до різних поверхонь у стафілококів виконують полісахариди міжклітинної адгезії, які контролюються опероном *ica*. Проте мутанти без цього оперону все одно зберігають здатність до утворення біоплівки. Це свідчить про те, що, крім полісахаридів, існують й інші чинники, які беруть участь у формуванні біоплівки стафілококами [175, 176].

Компоненти поверхні мікробів, що розпізнають молекули адгезивного матриксу (MSCRAMM), опосередковують початкове прикріплення до тканин господаря, забезпечуючи критичний крок для встановлення інфекції. Ці білки дещо відрізняються між видами стафілококів, наприклад, *Staph. pseudintermedius* має тропізм до білків собак. Натомість зв'язування з абіотичними поверхнями сприяє гідрофобній та електростатичній взаємодії. Позаклітинні глікополімери були ідентифіковані як основні рушійні сили цих взаємодій [177–179].

Надалі відбувається дозрівання біоплівки. Після утворення первинного моношару бактерії починають синтезувати речовини, що входять до позаклітинного матриксу. Це спричиняє стійку адгезію бактерій до поверхні та одна до одної. Таким чином утворюючи мікроколонії [172, 179].

Ці процеси регулюються складною та розгалуженою мережею механізмів, що контролюють експресію генів, синтез компонентів матриксу,

міжклітинну комунікацію тощо. Ряд стафілококових кворум-систем (*SaeRS*, *SigB* та *CodY*) відповідають за синтез адгезинів та приєднання бактерійних клітин до поверхонь. У той же час інші системи (*Agr*, *Rot* та *MgrA*) послаблюють адгезію бактерій та сприяють їхньому виходу за межі структури біоплівки [168, 179].

Завершальним етапом життєвого циклу біоплівки є розсіювання. Після значного збільшення бактеріальної маси мікроорганізми починають синтез сполук, спрямованих на руйнування структури полімерної речовини та зменшення агрегації. В результаті бактеріальні клітини виходять в навколишнє середовище в планктонній формі, поширюються та починають формувати нові осередки біоплівки [180].

Імунна відповідь на планктонні та біоплівкові форми бактерій має певні відмінності. Кількість та активність поліморфноядерних лейкоцитів була нижчою за імунної відповіді на стафілококи в структурі біоплівки, ніж на планктонні форми. Проте через складність подолання фізичного бар'єру біоплівки фагоцити відрізнялися обмеженою рухливістю. Клітини імунної системи, що реагували на біоплівкову інфекцію, затримувалися на периферії цієї структури [181–183].

Утворення біоплівок бактеріями відіграє важливу роль у розвитку різних інфекційних процесів. Стафілококи найчастіше асоціюються з інфекціями, пов'язаними з використанням медичних пристроїв, таких як центральні венозні катетери, протези суглобів та сечові катетери. На поверхнях цих абіотичних пристроїв бактерії не зазнають впливу факторів місцевого імунітету. Крім того, на синтетичних матеріалах медичних виробів стафілококи проліферують значно швидше, ніж на біологічних тканинах [184–186].

Бактерії у форматі біоплівок часто присутні у хронічних ранах. Вони пригнічують механізми загоєння та чинять постійний патогенний вплив на ураження. Їхня участь у переході з гострого ранового процесу в хронічний поки що не встановлена [187, 188]. Також біоплівки відіграють важливу роль

у формуванні та розвитку численних хронічних інфекцій у тварин і можуть призводити до рецидиву після лікування [189]. При розвитку маститів у корів, утворення біоплівки спричинює персистенцію збудника та перехід запального процесу в хронічну форму [176, 190].

Чутливі штами *Staph. pseudintermedius* і *Staph. aureus*, що містяться в біоплівці, потребують більшої концентрації антибіотика для їх знищення. Позаклітинний матрикс ускладнює проникнення антибіотиків у мікробні клітини, а в середині біоплівки змінене мікросередовище, що впливає на механізм дії антимікробних засобів [191]. Для деяких препаратів неможливо досягти необхідних концентрацій антибіотиків щоб забезпечити бактерицидну або бактеріостатичну дію при медичному застосуванні. Біоплівки також є сприятливим середовищем для функціонування механізму горизонтального переносу генів, що спрощує набуття стійкості чутливими бактеріями [161, 192].

Висновки до розділу 1

Огляд літератури свідчить, що бактерії роду *Staphylococcus*, зокрема *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius*, поширені в навколишньому середовищі та становлять загрозу для здоров'я людей і тварин. Ці мікроорганізми еволюціонували разом зі ссавцями-господарями, набувши значного генетичного різноманіття. Велика генетична мінливість *Staph. aureus* забезпечує його адаптацію до різних видів тварин та здатність до міжвидової передачі.

Найбільшу загрозу становлять коагулазопозитивні види – *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius*. Механізми високої поширеності й патогенності *Staph. aureus* добре вивчені. *Staph. pseudintermedius* поки недостатньо досліджений, проте його роль в інфекціях людини зростає, що вимагає уваги науковців. Ці стафілококи мають чимало різних факторів патогенності на мобільних генетичних елементах, що сприяє їх поширенню між бактеріальними популяціями.

Їх диференціація ускладнена через схожість морфологічних, культуральних та біохімічних ознак. Для ефективної ідентифікації *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* необхідно застосовувати комплексний підхід, що включає оптимальні комбінації фенотипових та генотипових методів. Раціональний підбір методів діагностики дозволить підвищити достовірність ідентифікації цих бактерій.

Гострою проблемою є стійкість стафілококів до антибіотиків, зокрема поширеність метицилінрезистентних штамів. Вивчення колонізації людини і тварин цими патогенами та оцінка ризиків для лікарів ветеринарної медицини має сприяти розробці заходів контролю.

В Україні останніми роками зросла увага до стафілококів та їх стійкості до препаратів. Описано зв'язки факторів патогенності з екологічними нішами, проте цих досліджень недостатньо для формування загальної картини. Недостатньо приділено уваги *Staph. pseudintermedius*, який викликає занепокоєння вчених світу.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Робота виконана упродовж 2020–2024 років на базі Науково-дослідної лабораторії кафедри ветеринарно-санітарної експертизи та лабораторної діагностики ІПНКСВМ, Лабораторії новітніх методів досліджень (ІФА та ПЛР) Білоцерківського національного аграрного університету (м. Біла Церква), Волинської регіональної лабораторії державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживача (м. Луцьк) та Науково-дослідного навчального центру діагностики хвороб тварин Інституту ветеринарної медицини (м. Київ).

Експериментальні дослідження проводили в 5 етапів (рис. 2.1):

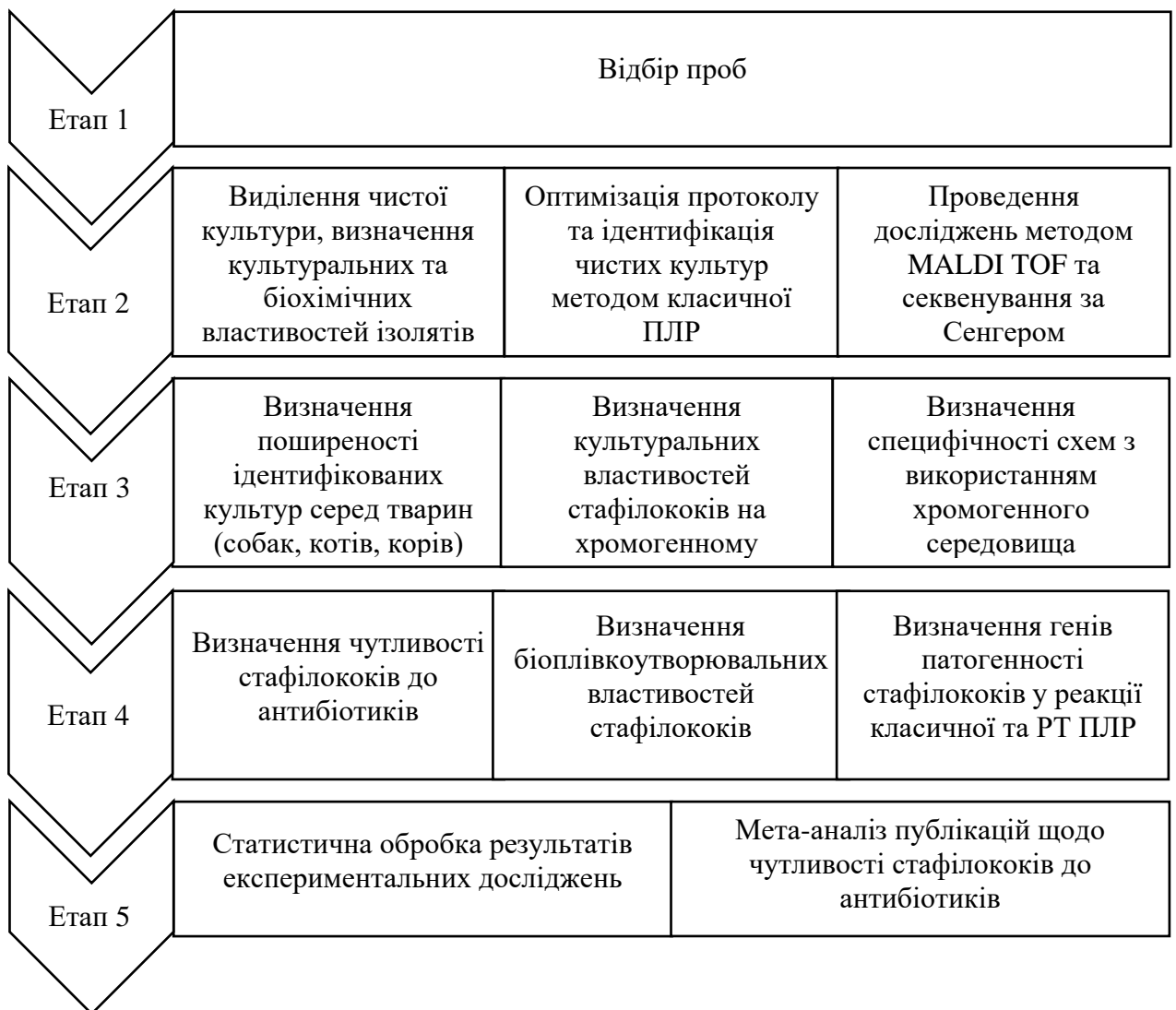


Рис. 2.1. Етапи проведеного дослідження

На першому етапі досліджень були відібрані матеріали від тварин та виділено мікроорганізми з біологічних матеріалів.

Відбір матеріалів з носової порожнини і зовнішнього вуха від клінічно здорових собак проведено на базі Навчально-наукової виробничої міжкафедральної ветеринарної клініки коней, жуйних, свиней, дрібних та екзотичних тварин БНАУ (Біла Церква), “Доктор Вет” (Біла Церква) та в Білоцерківській міській державній лікарні ветеринарної медицини.

Для виявлення резидентного стафілококоносійства проби відбирали у тварин, які відвідували клініку для планових профілактичних процедур та не мали клінічних ознак захворювань. Загалом відібрано препарати від 145 собак: 105 з зовнішнього вуха та 58 з носових ходів.

Проби від котів та собак з інфекційними ураженнями шкіри та слизових оболонок відбирали у ветеринарних клініках м. Луцька та направляли до Волинської регіональної лабораторії державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживача. Матеріали, відібрані з уражень, поділили на групи згідно з місцем локалізації інфекції відповідно до реєстру лабораторії. Були отримані ізоляти з уражень ділянки ока (кон'юнктивіти і блефарити), вуха (отити та ранові інфекції), носа (інфекції верхніх дихальних шляхів) та шкіри (дерматологічні ураження та ранові інфекції). За дослідний період загалом отримано матеріали від 109 хворих собак та котів, у 44 тварин було ізольовано бактерії роду *Staphylococcus spp.*

Проби від молока хворих на клінічний та субклінічний мастит корів відбирали у молочних господарствах Київської області та направляли для дослідження до Науково-дослідної лабораторії кафедри ветеринарно-санітарної експертизи та лабораторної діагностики ІПН КСВМ. Загалом відібрано 115 проб молока від 90 корів.

На другому етапі досліджень було вивчено культуральні та біохімічні властивості ізолятів та виділено чисті культури мікроорганізмів.

Остаточну ідентифікацію видової приналежності збудників виконано методом класичної ПЛР. З метою отримання позитивного контролю ДНК було

проведене секвенування методом Сенгера, а чисті культури були додатково ідентифіковані методом MALDI-TOF MS.

На третьому етапі було проаналізовано результати видової ідентифікації. Поширеність видів стафілококів визначалась шляхом підрахунку частоти виявлення кожного виду серед усіх ізолятів, отриманих від тварин. Вивчено культуральні особливості відомих ізолятів стафілококів за культивування на хромогенних середовищах.

На четвертому етапі було вивчено фактори, які визначають патогенний потенціал ізолятів стафілококів, визначено їх стійкість до антибіотиків та здатність до формування біоплівки. За допомогою методів класичної ПЛР та ПЛР у реальному часі досліджено поширеність генів стійкості до метициліну серед стафілококів. Також визначено поширення генів міжклітинної адгезії, лейкоцитарного та ексфоліативного токсинів у *Staph. pseudintermedius*, ізольованих від собак та котів.

На завершальному етапі досліджень дані підсумовано та статистично оброблено. Для різних типів даних отриманих в дослідженні використані різні статистичні критерії.

Усі проведені дослідження схвалені Етичним комітетом Білоцерківського національного аграрного університету з питань поводження з тваринами у наукових дослідженнях та освітньому процесі (висновок №3/17 від 27.03.24 р., протокол № 17) та виконувались згідно закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” від 28.03.2006 р. [271], правил Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях від 18.03.1986 р. [272] та Наказу МОН № 416/20729 від 16 березня 2012 р. “Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах” [273].

Мікробіологічні методи дослідження

Для проведення мікробіологічних досліджень застосовано ряд селективних і неселективних середовищ та швидкі біохімічні тести.

В дослідженні використані: маніто-сольовий агар (Condalab, Іспанія), поживний бульйон (Hiimedia, США), трипсино-соевий бульйон (Condalab, Іспанія), поживний агар (Hiimedia, США), хромогенні середовища CHROMagar Orientation (CHROMagar, Франція) та CHROMagar *Staphylococcus* (CHROMagar, Франція). Агарові середовища готували згідно з інструкцією виробника, автоклавували (120 °С, 1,2 атмосфери, 15 хв) та наливали в пластикові чашки Петрі діаметром 90 мм. Рідкі поживні середовища готували відповідно до інструкції виробника, розливали по пробірках та автоклавували. Для приготування ізотонічного розчину солі 8,5 г солі розчиняли в 1 літрі дистильованої води, розливали по флаконах та автоклавували. Для приготування фосфатного буфера 1 таблетку (BioGnost, Хорватія) розчиняли в 1 л води, розливали по флаконах та автоклавували (120 °С, 1,2 атмосфери, 15 хв).

Відбір проб

Проби у клінічно здорових собак відбирали стерильним ватним тампон, змоченим у фізіологічному розчині. Аплікатор обережно вводили в зовнішній слуховий прохід або носову порожнину на глибину 2–5 см, в залежності від віку та породи. Потім тампон декілька разів обертали по слизовій оболонці носа або шкірі вушного ходу для отримання зразка. Тампон поміщали назад у пробірку.

Проби від хворих собак та котів відбирали з місця інфекційного ураження за допомогою стерильного аплікатора та направляли до Волинської регіональної державної лабораторії державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів.

Перед відбором молока дійку протирали серветкою, просякнутою дезінфікуючим розчином. Перші цівки молока здоювали, після цього 20-30 мл молока збирали в стерильний одноразовий контейнер.

Після надходження до лабораторії бактеріальні культури висівали на поживний бульйон та культивували протягом 24 годин за 37 °С. Для виявлення стафілококів, 0,1 мл бульйонної культури інокулювали на поверхню агару

Байд-Паркера. Отримані чисті культури перевіряли на наявність ферменту каталази та направляли нам для подальших досліджень.

Виділення чистих культур стафілококів та встановлення їх культуральних і біохімічних властивостей

Проби з носових ходів та зовнішнього вуха від клінічно здорових собак спочатку культивували в трипсино-соєвому бульйоні протягом 6–12 годин. Одну петлю з середовища накопичення засівали на поверхню селективного маніто-сольового агару (Condalab, Іспанія). Чашки з первинним посівом культивували протягом 24–48 годин за температури 37 °С. Після культивування визначали наявність росту на маніто-сольовому агарі, ферментацію маніту та робили мазок з декількох типових колоній.

Колонії, в яких виявили грампозитивні коки, пересівали на поживний агар та культивували 24–48 години за 37 °С. Після інкубації оцінювали характеристику росту та визначали біохімічні особливості ізолятів.

Молоко від корів за допомогою стерильної бактеріологічної петлі вносили на поверхню хромогенного середовища та культивували протягом 24–48 годин за 37 °С. Колонії, в яких було виявлено грампозитивні коки, пересівали на поверхню маніто-сольового агару, інкубували протягом доби та визначали біохімічні властивості.

Біохімічні тести, застосовані в дослідженні

Тест на виявлення каталази. На поверхню предметного скельця наносили каплю 3 % перекису водню (ТОВ “ДКП Фармацевтична фабрика”, Україна) та змішували її з бактеріальною культурою. На позитивну реакцію вказувало рясне утворення пухирців газу.

Тест на виявлення ферменту коагулази. Ліофілізовану плазму кроля (ТОВ “Біолік Фарма”, Україна) розводили в 5 мл фізіологічного розчину. Потім 0,5 мл отриманої суспензії вносили в стерильну пробірку, додавали бакпетлю добової чистої культури та інкубували за 37 °С. За реакцією спостерігали через 4, 6, 8, 10, 12 та 24 години. Про позитивну реакцію свідчило утворення желеподібного згустку через 12 годин культивування або раніше.

Тест на виявлення ферменту цитохромоксидази. Для проведення аналізу використовували тест-смужки ОКСІтест (ERBA, США). З поверхні агару пластиковою петлею відбирали бактеріальну масу та втирали в тестову зону смужки. За реакцією спостерігали протягом 2 хв, зміна кольору з сірого на синій означала позитивну реакцію.

Реакція Фогеса-Проскауера. Для постановки реакції використовували готовий набір реагентів мікро Фогес Проскауер. Чисту культуру інокулювали у 2,5 мл глюкозо-фосфатного бульйону Кларка (Фармактив, Україна) та культивували протягом доби за 37 °С. Після культивування до 1 мл бактеріальної суспензії додавали 0,6 мл розчину α -нафтолу та 0,2 мл 40 % КОН. За реакцією спостерігали протягом 10–15 хв, зміна кольору середовища з жовтого на червоний свідчила про позитивну реакцію.

Тест на виявлення ферменту дезоксирибонуклеазу (ДНКазу). Бактеріальну культуру наносили смугою довжиною 2–3 см на поверхню ДНК агару (HiMedia, США). Середовище культивували 24 години за 37 °С. Після отримання росту на поверхню агару наливали 1Н розчин НСІ, щоб повністю покрити агарову пластину, та витримували 5 хв. Розчин кислоти зливали, та спостерігали на темному фоні за змінами середовища навколо колонії. Зона просвітлення навколо бактеріальної культури вказувала на позитивний результат реакції.

Ідентифікація стафілококів за допомогою мікрокультуральної системи NEONATAL FAST WELL D-ONE (CPM SAS0, Італія). Бактеріальну культуру розводили до 0,5 стандарту МакФарланда, вносили 20 мкл суспензії в середовище накопичення з набору та культивували протягом 2 годин за 37 °С. Потім 300 мкл отриманої суспензії розводили в ампулі фізрозчину (входить до набору), ресуспендували та вносили в кожну лунку по 300 мкл розбавленої культури. В лунки 4, 10, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 31 та 32 додатково додавали декілька крапель стерильного вазеліну. Планшетку культивували за 37 °С протягом 24 годин та зчитували реакцію відповідно до інструкції.

Визначення чутливості та специфічності мікробіологічних схем з використанням хромогенних середовищ

Для проведення досліджень відбирали чисті культури *Staph. pseudintermedius*, *Staph. aureus*, а також коагулазонегативні стафілококи (КНС). Родова та видова приналежність бактерій була підтверджена методом ПЛР. Потім добові культури засівали на поверхню маніто-сольового агару, CHROMagar Orientation, ДНК агару та ставили реакцію пробіркової коагуляції.

Культури, які мали культуральні властивості *Staph. pseudintermedius* та були підтвержені в реакції ПЛР, вважалися позитивними (а). Культури, які мали культуральні властивості *Staph. pseudintermedius*, але були негативні в ПЛР, вважалися хибно позитивними (b). Культури, які мали нетипові культуральні властивості, але були позитивні в ПЛР, вважалися хибно негативними (с). Культури, які мали нетипові культуральні властивості й були негативні в ПЛР, вважалися негативними (d) (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Розрахунок чутливості та специфічності схем діагностики

Результати випробувань	<i>Staph. pseudintermedius</i>	Інші стафілококи
Позитивний	a	b
Негативний	c	d
Всього	a + c	b + d

Для розрахунку показників чутливості та специфічності були застосовані наступні формули:

$$\text{Діагностична чутливість} = d/(b + d);$$

$$\text{Діагностична специфічність} = a/(a + c);$$

$$\text{Позитивне прогностичне значення} = a/(a + b);$$

$$\text{Негативне прогностичне значення} = d/(d + c);$$

Показник чутливості тесту відображає ймовірність правильно ідентифікувати мікроорганізм певного виду. Висока чутливість мінімізує кількість хибнонегативних результатів, коли тест не вірно визначає відсутність мікроорганізму.

Специфічність показує ймовірність вірно визначити відсутність певного мікроорганізму у зразку. Висока специфічність мінімізує кількість хибнопозитивних результатів, коли тест неправильно вказує на наявність мікроорганізму там, де його насправді немає.

Визначення чутливості бактерій до антибіотиків

Для тестування чутливості бактерій до антибіотиків використовували середовище Мюллера-Хінтона (HiMedia, США) та диски з різною концентрацією антибіотика.

Декілька колоній чистої культури відбирали з середовища культивування та розводили прямим методом до 0,5 за стандартом МакФарланда. Стерильний ватний аплікатор занурювали в отриману бактеріальну суспензію, надлишки рідини відтискали об стінку пробірки. Після цього методом штрихування наносили бактеріальну масу на поверхню агару. По поверхні агару тампоном проводили тричі, кожного разу повертаючи чашку на 60 °, після цього чашку просушували 5–10 хв. Після підсушування на поверхню агару клали диски з антибіотиком (HiMedia, США) або (Condalab, Італія) за допомогою стерильного пінцета.

Чашки Петрі термостатували протягом 24 годин за 37 °С. Перед початком інтерпретації результатів дослідження перевіряли однорідність росту на поверхні агару. Визначення зон затримки росту проводили шляхом вимірювання діаметра зони пригнічення росту навколо диску з антибіотиком. Вимірювання проводили з точністю до 1 мм за допомогою лінійки. Для інтерпретації розміру зони затримки росту її порівнювали з величинами, наведеними у міжнародних рекомендаціях та стандартах (табл. 2.2).

Інтерпретацію результатів стійкості до антибіотиків ізолятів, виділених з молока хворих на мастит корів, проводили згідно зі стандартами EUCAST

версія 13 [193], а матеріалів, відібраних від собак та котів, згідно зі стандартом CLSI версія 31, CLSI версія 28 та NCCLS [194–196].

Таблиця 2.2

**Інтерпретація меж затримки росту навколо дисків з антибіотиками,
використаних у дослідженнях**

Стандарт	Назва антибіотика	Концентрація, мг	Інтерпретація результатів		
			С, ≤ мм	П, мм	Ч, ≥ мм
CLSI (2020)	Пеніцилін (PEN)	10 (ОД)	29		28
EUCAST (2023)	Ампіцилін (AMP)	2	18		18
CLSI (2018)	Цефтріаксон (CTR)	30	21	14-20	13
NCCLS (2002)	Амоксицилін та клавуланова кислота (AMX)	20/10	22		19
CLSI (2020)	Оксацилін (OXA)	1	22		21
CLSI (2020)	Цефокситін (CX)	30	22		22
EUCAST (2023)		30	22		21
CLSI (2020)	Ципрофлоксацин (CIP)	5	21	16-20	15
EUCAST (2023)		5	50		21
CLSI (2020)	Тетрациклін (TET)	30	19	15-18	14
EUCAST (2023)		30	22		22
CLSI (2020)	Гентаміцин (GEN)	10	15	13-14	12
EUCAST (2023)	Канаміцин (KAN)	30	18		22
CLSI (2020)	Ерітроміцин (ERY)	15	23	14-22	13
CLSI (2020)	Триметоприм та сульфаметоксазол (SXT)	1,25/ 23,75	16	11-15	10
EUCAST (2023)	Кліндаміцин (CD)	2	22		22

Визначення здатності бактерій до утворення біоплівки

З поверхні поживного середовища стерильною бакпетлею відбирали добову культуру та робили суспензію, в концентрації, що відповідає 0,5 за стандартом МакФарланда.

По 20 мкл бактеріальної суспензії вносили в лунку стерильного 96-лункового плоскодонного мікротитрувального планшета. В кожну лунку додавали 180 мкл трипсин-соевого бульйону (TSB), що містить 1 % глюкози, та інкубували за 37 °С протягом 24 годин. Стерильний TSB (Condalab, Італія) використовувався як негативний контроль. Після інкубації лунки тричі промивали 300 мкл фосфатно-сольового буферного розчину (PBS) для видалення планктонних бактерій. Біоплівку фіксували метиловим спиртом протягом 10 хв. Після цього планшетку висушували протягом 30 хв та вносили в кожну лунку по 100 мкл 1 % спиртовим розчином кристалічного фіолетового, біоплівки фарбували протягом 15 хв. Надлишки фарби змивали фосфатним буфером, планшетку сушили протягом години за кімнатної температури. Після висихання фарбу екстрагували шляхом додавання в кожну лунку 100 мкл суміші етилового спирту та ацетону в співвідношенні 8:2, планшетку витримували 10 хв за кімнатної температури. Після екстракції барвника вимірювали поглинання світла 492 нм за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів (Rayto, RT-2100C). Кожен ізолят вивчали в трьох повторях та вираховували середній показник оптичної густини.

Мінімальну межу оптичної густини (OD_c) розраховували стосовно контролю. До середнього значення оптичної густини негативного контролю додавали три показники стандартного відхилення негативного контролю ($average\ OD_{control} + SD * 3$). Усі ізоляти були класифіковані на основі здатності до адгезії на такі, що не мають потенціалу формувати біоплівки ($OD \leq OD_c$), мають слабкі біоплівкоутворювальні властивості ($OD_c < OD \leq 2OD_c$), помірні біоплівкоутворювальні властивості ($2OD_c < OD \leq 4OD_c$) та сильні біоплівкоутворювальні властивості ($4OD_c < OD$).

Молекулярно-генетичні методи досліджень

Виділення ДНК. Виділення ДНК проводили за допомогою комерційного набору IndiSpin Pathogen Kit (Indicla, США). Для виділення ДНК бактеріальну масу розводили в стерильному фізіологічному розчині. Відбирали 200 мкл бактеріальної суспензії та вносили до пробірки типу Еппендорф, потім додавали 20 мкл протеїнази К та 100 мкл VXL буфера. Пробірку струшували на вортексі та витримували 15 хв за температури 20–25 °С. Надалі до лізату додавали 350 мкл АСВ буфера, струшували на вортексі та переносили в колонку з кремнеземною мембраною. Колонку центрифугували протягом 1 хв зі швидкістю 8000 об/хв. Рідину, що пройшла через мембрану, видаляли, а на поверхню мембрани вносили 600 мкл АW1 буфера та центрифугували протягом 1 хв зі швидкістю 8000 об./хв. Цей етап повторювали з використанням АW2 буфера. Після промивання мембрану висушували шляхом центрифугування протягом 2 хв зі швидкістю 13800 об./хв. Колонку переносили в чисту пробірку типу Еппендорф, наносили 100 мкл АVE буфера, витримували протягом 1 хв та центрифугували 1 хв зі швидкістю 13800 об/хв. Отримане ДНК зберігали в морозильній камері за -20 °С.

Ідентифікація стафілококів на рівні роду та виду методом ПЛР

Ампліфікацію проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, США). Програма ампліфікації відповідала паспорту полімерази. Температура відпалу змінювалась залежно від використаних праймерів (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Програма температурного режиму для проведення ПЛР

Крок	Цикли	Температура	Тривалість етапу
Початкова денатурація	1	94 °С	30 с
Денатурація	35	94 °С	30 с
Відпал		від 45 до 68 °С	30 с
Елонгація		68 °С	60 с
Фінальна елонгація	1	68 °С	5 хв

Для проведення ПЛР готували реакційну суміш з використанням готового майстер-міксу OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB, США). Реакційна суміш складалася з 12,5 мкл майстер-міксу, 7,5 мкл деіонізованої води, по 1 мкл прямого та зворотного праймеру і 3 мкл ДНК

Праймери обрані в результаті аналізу наукових публікацій, присвячених ідентифікації стафілококів на рівні виду та роду, синтез обраних олігонуклеотидів проводили в компанії Macrogen (Південна Корея) (табл. 2.4). З метою оптимізації видоспецифічного та родоспецифічного протоколу було визначено оптимальну температуру відпалу праймерів та аналітичну чутливість реакції.

Таблиця 2.4

Родоспецифічні та видоспецифічні праймери, використані в дослідженні

Назва праймера	Послідовність праймера	Відпал, °C	Розмір, п. н.	Посилання
<i>Staphylococcus spp.</i>	GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC A	55	370	[197]
	TIA CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA A			
<i>Staph. aureus</i>	TCG CTT GCT ATG ATT GTG G	56	359	[16]
	GCC AAT GTT CTA CCA TAG C			
<i>Staph. pseudintermedius</i>	TRG GCA GTA GGA TTC GTT AA	56	926	[16]
	CTT TTG TGC TYC MTT TTGG			

Градiєнт температур для праймера, направленогo на виявлення *Staphylococcus spp.*, був у межах від 47 °C до 63 °C з кроком 2 °C. Для пар праймерів, направлених на виявлення *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius*, градiєнт температур був у межах 51–59 °C з кроком у 2 °C.

Критеріями оцінювання реакції було визначено такі фактори: наявність відповідного продукту реакції в лунках зі стафілококами та його відсутність у лунках з іншими коками, що підтверджує специфічність щодо стафілококів; відсутність неспецифічних фрагментів, що вказує на брак небажаних перехресних реакцій; чіткість та відповідний розмір смужки реакції, що демонструє коректний і очікуваний розмір амплікона.

Для визначення діагностичних меж протоколу було використано ряд розведень бактеріальної суспензії, оптичну щільність визначали візуально згідно зі стандартом каламутності МакФарланда. Було виконано 7 розведень 4, 2, 1, 0,5 за стандартом каламутності, суспензію 0,5 також було додатково розведено 1:10, 1:100 та 1:1000. З кожної суспензії виділяли ДНК та ставили реакцію ПЛР з оптимальною температурою відпалу.

Після приготування бактеріальних суспензій для визначення аналітичних меж чутливості видоспецифічного протоколу та візуального порівняння їх зі стандартом каламутності МакФарланда оптичну щільність отриманих суспензій було виміряно з допомогою спектрофотометра за довжини хвилі 590 нм.

Вимірювання оптичної щільності проводили за допомогою фотоколориметра КФК 2 МП. Використана кювета з довжиною оптичного шляху $L=1$.

В якості позитивних та негативних контролів для всіх досліджень було використано музейні культури *Staph. epidermidis* ATCC 14990, *Staph. aureus* ATCC 25923, *Staph. aureus subsp. aureus* УКМ В-918, *Staph. pseudintermedius* 49444, *Str. pneumoniae* ATCC 49619 та *Ent. faecalis* ATCC 194433.

Для отримання ізолятів *Staph. pseudintermedius* були відібрані матеріали від клінічно здорових собак. Отримані ізоляти класифікували на групи КНС та КПС мікробіологічними методами, потім на групи *Staph. aureus* та не золотистий стафілокок молекулярно-генетичними методами. Якщо культура КПС утворила продукт реакції з праймером *Staphylococcus spp.* та видоспецифічним праймером, вона вважалася *Staph. pseudintermedius*.

Визначення генів патогенності бактерій

З літературних джерел підібрано праймери направлені на ділянки генів, що кодують фактори патогенності [198]. Були вивчені гени стійкості до метициліну *mecA*, міжклітинної адгезії *icaA* та *icaD*, гени лейкоцитарного токсину *lukF* і *lukS* та ген ексфоліативного токсину *siet* (табл. 2.5).

Таблиця 2.5

Праймери, направлені на виявлення різних факторів патогенності

Назва цільового гена	Послідовність праймера	Температура відпалу, °C	Розмір продукту реакції, п. н.
<i>icaA</i>	ACTGTTTCGGGACAAGCAT	51	134
	ATTGAGGCTGTAGGGCGTTG		
<i>icaD</i>	CGTTAATGCSTTCTTTCTTATTGCG	51	166
	ATTAGCGCACATTCGGTGTT		
<i>siet</i>	ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGG	50	359
	CCATTACTTTTCGCTTGTTGTGC		
<i>LukF</i>	CCTGTCTATGCCGCTAATCAA	50	572
	AGGTCATGGAAGCTATCTCGA		
<i>LukS</i>	TGTAAGCAGCAGAAAATGGGG	51	503
	GCCCGATAGGACTTCTTACAA		
<i>mecA</i>	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	49	532
	CCACTTCATATCTTGTAACG		

Реакційна суміш складалася з 12,5 мкл майстер-міксу, 7,5 мкл деіонізованої води, по 1 мкл прямого та зворотного праймеру і 3 мкл ДНК.

Візуалізацію продуктів реакції проводили шляхом електрофорезу в агарозному гелі. Спочатку готували ТБЕ буфер. В 1000 мл дистильованої води додавали 10,8 г Тріс (трис(гідроксиметил)амінометану), 5,5 г борної кислоти та 0,98 г трилону Б. Для приготування гелю в 100 мл буферу додавали 2 г агару,

отриману суміш кип'ятили та додавали 50 мкл етидію броміду. Отриману суміш вносили у форму для формування гелю.

Для проведення електрофорезу гель поміщали в камеру для горизонтального електрофорезу та заливали ТБЕ буфером. У кожен лунку першого ряду вносили молекулярний маркер, у наступні лунки – отриманий ампліфікаційний продукт. До камери під'єднували джерело живлення, електрофорез проводили протягом 40–60 хвилин за сили струму 110 В. Для виявлення специфічних фрагментів гель поміщали в транслюмінатор та проглядали над ультрафіолетовим світлом. Розмір фрагментів визначали шляхом порівняння з маркером молекулярної маси.

Секвенування бактеріального ДНК методом Сенгера

Очищення амплікона та секвенування проводила компанія Exprogen (Львів, Україна). До лабораторії надсилали 50 мкл продукту ПЛР з парою праймерів, специфічних для гена пус *Staph. pseudintermedius*, а також по 10 мкл кожного праймера. Реакційна суміш містила 25 мкл майстер-міксу, по 1 мкл прямого та зворотного праймерів, 6 мкл ДНК та 17 мкл деіонізованої води. Секвенування методом Сенгера проводили окремо з кожним праймером.

Результати секвенування отримані для аналізу у форматі .ab1 (формат хроматограм секвенування). Спочатку отримані хроматограми аналізували в програмі FinchTV (Geospiza, США). З первинних даних послідовності видаляли перші та останні 15–30 нуклеотидів, які мали нечіткі або шумні піки флуоресценції, щоб усунути артефакти обробки.

Вирівнювання та отримання консенсусної послідовності проводили в програмі MEGA V.11 (Pennsylvania State University, США) за допомогою інструменту “Alignment Explorer”. До зворотної послідовності застосовували алгоритм зворотного доповнення (функція “Reverse complement”), потім дві послідовності вирівнювали за допомогою алгоритму “ClustalW”.

Порівняння з еталонними геномами проводили за допомогою бази даних NCBI Nucleotide BLAST. Обидві досліджувані вирівняні послідовності *Staph. pseudintermedius* завантажували у вікно “Enter Query Sequence”. Для

порівняння використовували геноми з “Standard databases”, алгоритм пошуку був стандартним, окрім показника “Max target sequences”, який змінили на значення 500.

Послідовності для порівняння, обирали виставляючи відмітки у вкладці “Deskription”.

Порівняння референтних послідовностей між собою та еталонним геномом проводили за допомогою стандартних інструментів BLAST, що розміщені у вкладках “Alignment view” та “Graphic Summary”.

Для аналізу видової належності були використані послідовності, автори яких позначили розташування гену термонуклеази. Для побудови філогенетичного дерева з аналізованими послідовностями будували в програмі MEGA за допомогою інструменту “Phylogeny” та алгоритм “minimum evolution tree” зі стандартними налаштуваннями.

Аналіз схожості отриманих нами послідовностей був проведений за допомогою вебінструменту Clustal Omega та алгоритму Percent Identity Matrix.

Отримані послідовності внесені до бази даних GenBank, під номерами OR555770 та OR555771.

Проведення систематичного огляду та мета-аналізу

Відбір публікацій їх аналіз та складання систематичного огляду виконано відповідно до правил написання систематичних оглядів PRISMA [199].

Пошук літературних джерел було проведено в наукометричній базі Web of Science Core Collection [267], базі наукових статей Europe Pub Med Central [268], та у базі “Наукова періодика України” [269].

Для пошуку використано ключові слова: інфекційні хвороби; собаки; колонізація собак; антимікробна стійкість; метицилінрезистентність; КПС; *Staphylococcus*. Пошукові запити складали з різних варіацій ключових слів українською та англійською мовами. На етапі перевірки були виключені статті, дослідження яких проходили поза Європейським регіоном, у

публікаціях не було описано *Staph. aureus* або *Staph. pseudintermedius*, дослідження не стосувались штамів, отриманих від собак та котів (табл. 2.6).

Таблиця 2.6

Етапи відбору публікацій для мета-аналізу

Назва етапу	Кількість публікацій	Критерії підбору
Ідентифікація	Пошук записів в база даних, n=13296	Web of Science = 7633; Europe PMC = 5493; Наукова періодика України = 170; Разом = 13296;
Перевірка	Перевірка публікацій за відповідністю назви та опису, n=13296	Критерії виключення статей: повтори; стафілококи відібрані від інших видів тварин; коагулазонегативні стафілококи; відсутність DOI; оглядові статті. Виключено з мета-аналізу, n=13234
Придатність	Вивчення повного тексту публікації, n=62	Критерії виключення статей: не вивчено стійкість до антибіотиків; описано дані чутливості <i>Staph. intermedius</i> ; описані лише метицилінстійких ізоляти. Виключено з мета-аналізу, n=53
Включення	Обрано для мета-аналізу, n=9	Дослідження <i>Staph. pseudintermedius</i> , n=8 Дослідження <i>Staph. aureus</i> , n=5

Мета-аналіз даних було проведено в програмі MedCalc (Бельгія) версія 22.017. Дані про стійкість до антибіотиків враховувалися в аналізі, якщо про цю стійкість згадували три або більше авторів досліджень. Мета-аналіз проводили за допомогою функції Meta analis: proportion, та візуалізували у вигляді лісової діаграми. Для порівняння середніх рівнів стійкості до різних антибіотиків використовували два підходи. Якщо гомогенність даних між дослідженнями була низькою ($p < 0,05$), для аналізу брали середній показник стійкості з фіксованим ефектом. Якщо гомогенність даних між дослідженнями була високою ($p > 0,05$), для аналізу брали загальний показник стійкості з випадковим ефектом.

Статистична обробка експериментальних даних

Систематизацію даних проводили в програмі MS Office Excel (Microsoft, США), в якій дані зберігалися та піддавалися первинній математичній обробці.

Статистичну обробку даних проводили в програмному забезпеченні Jamovi (Нідерланди) версія 2.3.28.

В аналізі були використані наступні показники описової статистики: середнє арифметичне, максимальне значення, мінімальне значення, медіана, стандартне відхилення (SD). Додатково для кожної групи розраховувались показники рівності розподілу. З цією метою використовували тест Шапіро-Вілка (H_0 : розподіл вибірки відрізняється від нормального) та тест Левенса з метою визначення рівності дисперсії двох груп (H_0 : дисперсії груп однакові).

Якщо розподіл був нормальний, а дисперсія рівна, для порівняння двох груп було застосовано t тест Стьюдента, що порівнює середні значення.

Якщо розподіл відрізнявся від нормального, було застосовано Мен Вітні U тест, який порівнює медіани. Обидва статистичних критерії мають нульову гіпотезу (H_0 : Група 1 \neq Групі 2).

Для порівняння між собою трьох або більше груп був використаний тест Критерій Краскела-Уоліса, який не вимагає нормальності розподілу та рівності дисперсії (H_0 : групи статистично відрізняються).

Точний тест Фрідмана та критерій ХІ квадрата розрахований у програмному забезпеченні MedCalc (Бельгія) версія 22.017. Тест Фрідмана застосовували, коли хоча б одне з порівнюваних значень було нижче 5, в іншому випадку використовувався хі квадрат. Обидва тести мають нульову гіпотезу (H_0 : існує різниця між досліджуваними групами).

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Поширення стафілококів у клінічно здорових та інфекційно хворих тварин

Бактерії *Staphylococcus spp.* колонізують шкіру та слизові оболонки клінічно здорових тварин. Колонізувати організм клінічно здорових тварин можуть як коагулазопозитивні, так і коагулазонегативні види стафілококів. Коагулазопозитивні стафілококи частіше за інших представників виду викликають інфекції у тварин. Ідентифікація видів стафілококів, має важливе значення для оцінки ризику розвитку інфекційних захворювань.

3.1.1. Поширення стафілококів у собак та котів

З метою вивчення поширеності резидентного стафілококоносійства серед собак, нами вивчено видовий склад стафілококів, що колонізують носову порожнину (n=58) та вушного каналу (n=105) клінічно здорових тварин.

За дослідженням матеріалів із носової порожнини, представники роду *Staphylococcus spp.* колонізували носову порожнину у 44,8 % собак, колонізацію вушного каналу спостерігали рідше – лише у 28,5 % випадків. Встановлено, що *Staph. pseudintermedius* найпоширеніший стафілококом, знайдений у 24,4 % собак, *Staph. aureus* було виявлено лише 5,2 %, а інші види *Staphylococcus* у 15,5 % тварин. У зовнішньому вушному проході стафілококи ідентифікували рідше, ніж у матеріалах з носової порожнини. З 105 препаратів, отриманих із вух собак, *Staph. pseudintermedius* ідентифікували у 7,6 %, *Staph. aureus* – у 1,9 %, а інші види *Staphylococcus* – у 19,0 % тварин.

Загалом, стафілококи групи КНС достовірно більше виявляли у матеріалах відібраних з вушного каналу ($p < 0,001$, $\chi^2 = 3,87$, $C = 0,135$), при цьому нема різниці між поширенням групами КПС та КНС ($p = 0,076$, $\chi^2 = 3,15$, $C = 0,162$) у носових ходах собак. Колонізація носа *Staph. pseudintermedius* трапляється частіше ($p = 0,003$, $\chi^2 = 8,68$, $C = 0,225$) ніж вуха (рис. 3.1).

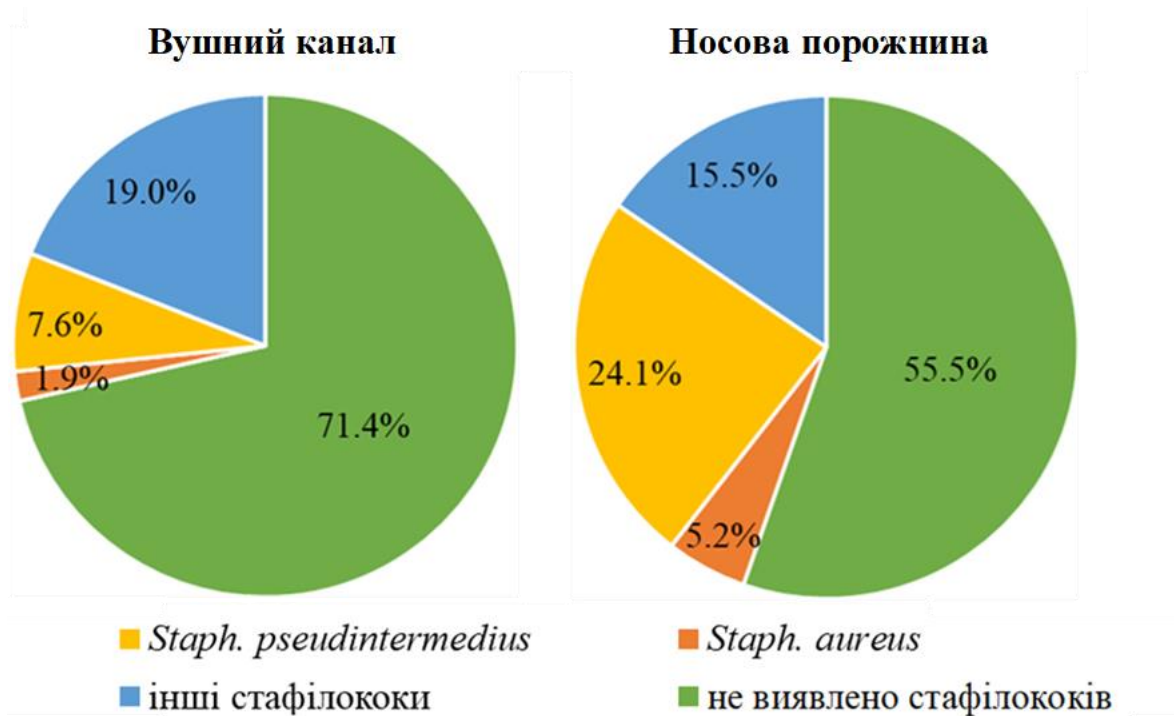


Рис. 3.1. Видова структура стафілококів, що колонізують зовнішнє вухо та носову порожнину клінічно здорових собак

Бактерії *Staphylococcus spp.* відіграють важливу роль в етіології хвороб котів та собак. Представники цього роду були ізольовані за різноманітних інфекційних уражень різних ділянок ока, носа, вуха та шкіри. Зі 109 матеріалів відібраних від інфекційно-хворих собак та котів, що надійшли до Волинської регіональної державної лабораторії Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів, стафілококи були ідентифіковані в 40,3 % зразках. У собак *Staphylococcus spp.* виявлено поширеним збудником інфекцій, ідентифікованим у 40,3 % досліджених собак. Водночас *Staph. pseudintermedius* – найпоширеніший вид стафілокока, що спричиняє інфекції. Цей збудник виявлено у 23,4 % від усіх інфекцій у собак та 58 % від ізольованих стафілококів. Інший представник групи КПС – *Staph. aureus* ідентифікували вірогідно рідше ($p < 0,001$). *Staph. pseudintermedius* виявляли в 5,2 % собак, що становить 12,9 % від отриманих стафілококів.

Серед 32 досліджених хворих котів *Staphylococcus spp.* ідентифіковано в 40,6 % випадків. З них *Staph. pseudintermedius* в 12,5 %, а *Staph. aureus* – у 6,3 % досліджених тварин. *Staph. pseudintermedius* ідентифіковано в 30,8 % випадках інфекції котів, у той час як *Staph. aureus* становив 15,4 % від усіх стафілококів. Поширення стафілококів серед собак та котів не має статистично значимої різниці ($p=0,972$), при цьому група КПС частіше зустрічається у собак ($p=0,005$, $\chi^2=7,76$, $C=0,256$).

Найбільше зразків було відібрано з уражень шкіри собак та котів – 71,6 %, із яких бактерії родини *Staphylococcus* були ідентифіковані в 27,5 % від усіх ізолятів. У зразках, узятих із уражень вуха бактерії *Staphylococcus spp.* були присутні в 38,5 % випадках (4,6 % від усіх ізолятів), з уражень ока – у 40,0 % (3,7 % від усіх ізолятів), із уражень носа – у 66,6 % випадків (3,7 % від усіх ізолятів) (рис. 3.2). З двох зразків молока, взятих у суки, *Staph. pseudintermedius* був виявлений в одному випадку.

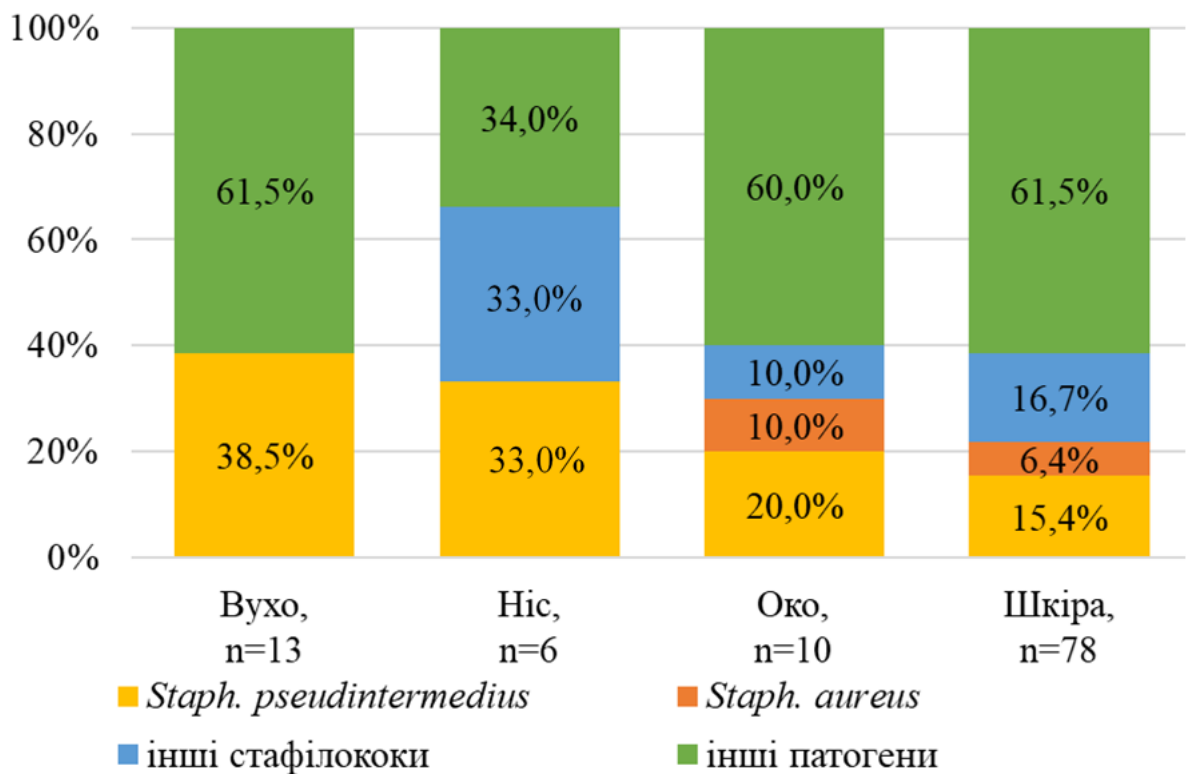


Рис. 3.2. Частота виявлення стафілококів на різних ділянках тіла у хворих собак та котів

Staph. pseudintermedius знайдено у 38,5 % матеріалах із зовнішнього, і це був єдиний вид стафілококів. В інших ділянках тіла *Staph. pseudintermedius* зустрічався рідше, його було ізольовано в 33,3% тварин із уражень носових ходів та в 20,0 % із інфекцій очей. *Staph. aureus* не викликав інфекцій зовнішнього вуха та носа, його ізолювали з 10 % матеріалів, відібраних з очей, та в 6,4 % матеріалів – із шкіри. Інші стафілококи були виявлені у 33,3 % матеріалів із носа та 10,0 % матеріалів з очей, в цих ділянках тіла вони зустрічалися рідше ніж, *Staph. pseudintermedius*. За інфекцій шкіри КНС ізольовано від 16,6 % тварин. В результаті дослідження встановлено, що немає статистично значущої різниці в поширенні *Staph. pseudintermedius* у тварин залежно від локалізації інфекції ($\chi^2=1,86$; $p=0,6$).

Отже, у результаті дослідження видового складу стафілококів, що колонізують клінічно здорових собак, було встановлено, що *Staph. pseudintermedius* є найпоширенішим видом, який частіше зустрічався у носових порожнинах, ніж у вухах. Крім того, *Staph. pseudintermedius* також виявився найпоширенішим збудником інфекцій у собак і котів, особливо при ураженнях шкіри, і його поширення серед тварин не залежало від джерела походження.

3.1.2. Поширення стафілококів у корів

Для встановлення виду збудників, що викликають мастит у великої рогатої худоби було досліджено молоко від корів ($n=90$), що хворіли на клінічну ($n=63$) або субклінічну ($n=27$) форму маститу, стафілококи були виділені в 43 тварин.

Таким чином, з 27 випадків субклінічного маститу рід *Staphylococcus spp.* було виявлено у 58,1 %, а вид *Staph. aureus* – у 33,3 % корів. Серед 63 випадків клінічного маститу стафілококи брали участь в інфекцій 36,5 % корів, *Staph. aureus* ідентифікований у молоці 33,3 % корів. *Staph. aureus*, як збудник моноінфекції, спричиняв субклінічну форму маститу 14,8 % корів та клінічний мастит 14,3 % корів (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Видовий склад стафілококів, ізольованих з молока корів за клінічного та субклінічного маститу

Збудник або комбінація збудників	Субклінічний мастит, n=27		Клінічний мастит, n=63		Разом, n=90	
	n	%	n	%	n	%
<i>Staph. aureus</i>	4	14,8	9	14,3	13	14,4
<i>Staph. epidermidis</i>	2	7,4	4	6,3	6	6,7
<i>Staph. saprophyticus</i>	1	3,7	2	4,8	3	4,4
<i>Staph. aureus</i> + <i>E. coli</i>	1	3,7	6	9,5	7	7,8
<i>Staph. aureus</i> + <i>Staph. agalactiae</i>	2	7,4	–	–	2	2,2
<i>Staph. saprophyticus</i> + <i>Staph. dysgalactiae</i>	1	7,4	1	1,6	2	3,3
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. aureus</i>	–	–	2	3,2	2	2,2
<i>Staph. aureus</i> + <i>Staph. dysgalactiae</i>	2	7,4	4	6,3	6	6,7
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Staph. agalactiae</i>	1	3,7	1	1,6	2	2,2

В асоціації з іншими бактеріями *Staph. aureus* ізолювали з молока 18,2 % субклінічно хворих тварин, в молоці також були присутні бактерії *E. coli* та *Str. agalactiae*. У клінічно хворих корів, *Staph. aureus* в асоціації із іншим збудниками викликає інфекцію у 19,0 % тварин. Разом з золотистим стафілококом ідентифікували *E. coli*, *Streptococcus spp* та КНС.

Коагулазонегативні стафілококи разом з іншими мікроорганізмами виявляли в 3,7 % субклінічно та 4,8 % клінічно хворих корів. У 2,2 % корів їх ідентифікували разом із *Staph. aureus*, а ще у 2,2 % тварин – зі *Str. agalactiae* та *E. coli*.

Досліджені *Staph. aureus* частіше за коагулазонегативні стафілококи спричиняють клінічну форму маститу у корів ($p=0,023$; $\chi^2=5,18$; $C=0,198$),

проте немає статистично значущої різниці в поширеності стафілококів серед корів з субклінічною формою маститу ($p=0,218$; $\chi^2=1,54$; $C=0,165$). Таким чином, нами встановлено, що *Staph. aureus* єдиний коагулазопозитивний стафілокок який викликав мастити у корів, вид *Staph. pseudintermedius* мастити не викликав.

3.2. Культуральні та біохімічні особливості коагулазопозитивних стафілококів

Вивчені всі кокові мікроорганізми, отримані від собак, котів та корів. Дослідження бактерій від клінічно здорових собак проводили після виявлення первинного росту на середовищі накопичення. Культури з лабораторії отримували у вигляді добової чистої культури на поверхні поживного агару. Для остаточного підтвердження видової належності чистих культур застосовано метод MALDI-TOF MS.

3.2.1. Культуральні та біохімічні особливості стафілококів, ізольованих від собак та котів

З метою визначення культуральних та біохімічних властивостей ізолятів було використані селективні мікробіологічні середовища призначені для культивування цільових груп мікроорганізмів та хромогенні середовища, які містять субстрат, що змінює колір колоній в залежності від ферментів, що виділяють мікроорганізми. Також застосовували реагенти для постановки швидких біохімічних реакцій.

Було відібрано матеріали від собак та котів ($n=252$): 143 від клінічно здорових собак, 77 від хворих собак та 32 від хворих котів. Загалом було отримано 103 культури грампозитивних коків : 59 із них отримані з матеріалів відібраних від клінічно здорових собак, 31 – від хворих собак та 13 – від котів. Грампозитивні коки у хворих тварин виявлені з інфекцій локалізованих в носових ходах, вушній раковині, очах та шкірі. Ферментацію маніту та зміну кольору середовища з червоного на жовтий викликали 69,9 % культур

грампозитивних коків – 74,6 % виділених від клінічно здорових собак та 63,6 % від хворих собак та котів (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

**Культуральні та біохімічні властивості грампозитивних та галофільних
коків отриманих від клінічно здорових собак (n=143), хворих собак
(n=77) та котів (n=32)**

Характеристика збудника	Ізоляти від клінічно здорових собак, n=59	Ізоляти від хворих собак, n=31	Ізоляти від хворих котів, n=13
Ферментація маніту, n	44	22	6
Наявність каталази, n	56	31	13
Оксидазна активність, n	0	0	0
Коагуляція плазми крові, n	27	22	6
КПС, n	27	22	6
КНС, n	29	9	7
Інші коки, n	3	0	0

Для визначення видової приналежності отриманих ізолятів до родини *Staphylococcus spp.* було поставлено декілька швидких біохімічних тестів, спрямованих на встановлення наявності ферментів – цитохромоксидази та каталази.

Всі 103 досліджених галофільних, грампозитивних мікроорганізмів не викликали зміни кольору тестової зони смужки OXItest. В ході дослідження не знайдено жодного кокового мікроорганізму, що продукував цей фермент. Швидкий тест із використанням 3 % перекису водню направлений на виявлення каталази – ферменту, що продукують лише *Staphylococcus spp.* З досліджених нами культур (n=103) 97,0 % були каталазопозитивні та 2,9 % каталазонегативні.

В межах експериментальної частини дослідження було проведено реакцію плазмокоагуляції для всіх маніт-ферментуючих, каталазопозитивних та грампозитивних коків, виділених зі зразків, відібраних від клінічно здорових тварин. Усього було виявлено 26,2 % коагулазопозитивних

стафілококів. За результатами дослідження 53,4 % ізолятів належали до групи коагулазопозитивних стафілококів (КПС), а 16,5 % – до групи коагулазонегативних стафілококів (КНС).

Для вивчення гемолітичної активності був використаний колумбійський агар з овечою кров'ю. Усі досліджені культури *Staph. pseudintermedius* утворили зони просвітлення навколо колоній, що характерні для β -гемолізу.

У середньому зона затримки росту для цього виду стафілококів становила $15,2 \pm 0,8$ мм. *Staph. aureus*, є більш чутливими до дії антибіотику поліміксин Б, ніж *Staph. pseudintermedius*. Це пов'язано з різницею в структурі клітинної мембрани цих видів. Зона затримки росту навколо диска з антибіотиком при вивченні ізолятів *Staph. aureus* була меншою на 5,7 мм, у середньому – $9,5 \pm 0,6$ мм. Отже, затримки росту навколо диска з поліміксин Б у ізолятів *Staph. pseudintermedius* статистично значуще більша, ніж для *Staph. aureus* ($p < 0,001$) (рис. 3.3).

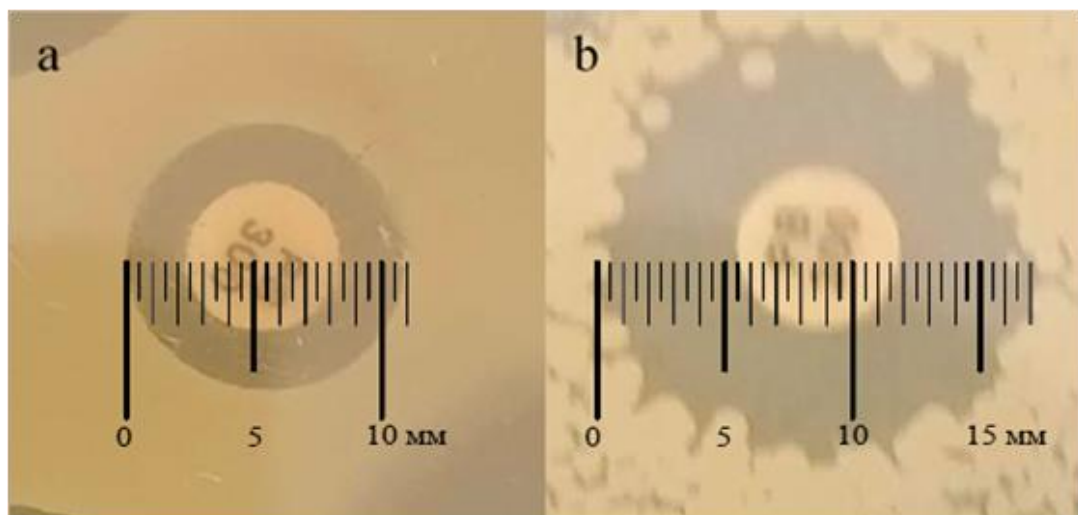


Рис. 3.3. Зона затримки росту (мм) навколо диска з поліміксином Б:
1. ізолят *Staph. aureus*; 2. ізолят *Staph. pseudintermedius*

Для виявлення утворення ацетоїну з глюкози ізоляти *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus* досліджено в реакції Фогеса-Проскауера. Позитивна реакція була визначена для 100 % ізолятів *Staph. aureus* та 30,0 % ізолятів *Staph. pseudintermedius*. Штами *Staph. aureus*

давали сильну позитивну реакцію в цьому тесті, що призводило до зміни кольору всього об'єму середовища.

Окремі ізоляти *Staph. pseudintermedius*, що викликали слабкопозитивну реакцію, приводили до зміни кольору середовища лише біля поверхні бульйону (рис. 3.4). Детальний опис культуральних властивостей всіх отриманих ізолятів стафілококів наведено в додатку А.

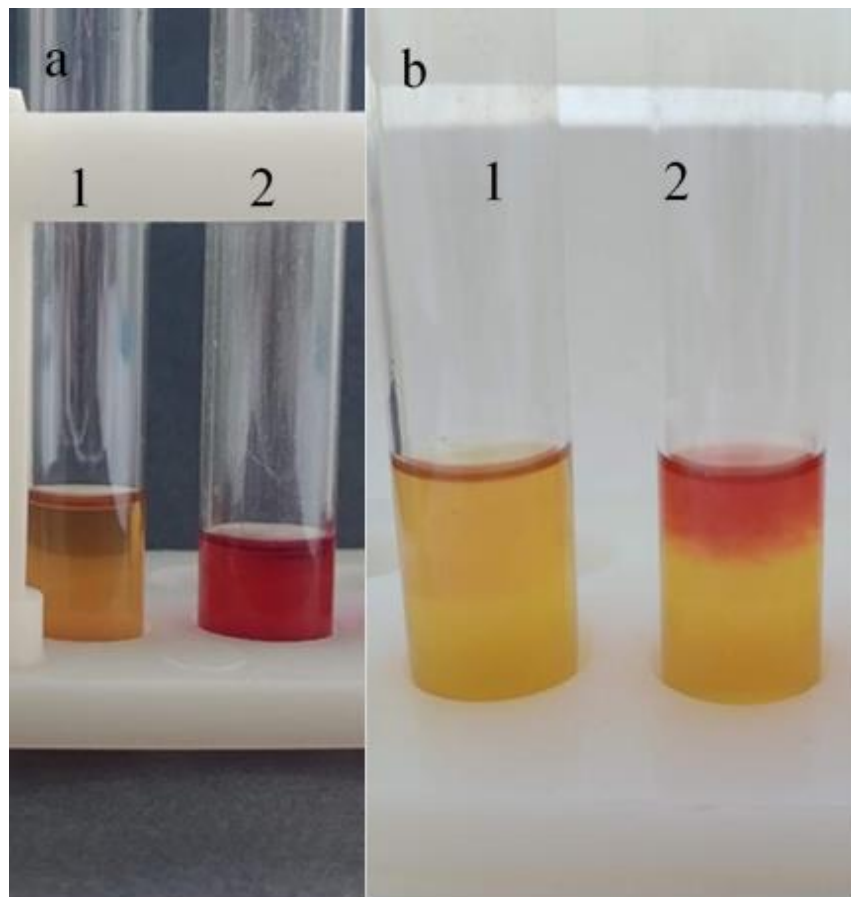


Рис. 3.4. Результати реакції Фогес-Проскауера:
 а – 1. негативний контроль; 2. позитивна реакція за дослідження *Staph. aureus*; б – 1. негативна реакція за дослідження *Staph. pseudintermedius*; 2. слабкопозитивна реакція за дослідження *Staph. pseudintermedius*

З метою визначення діагностичних можливостей набору Neonatal FAST Well D-ONE для діагностики інфекцій викликаєх *Staph. pseudintermedius*, досліджено два ізоляти цього виду стафілококів. Після культивування ми

виявили, що частина лунок змінила колір. Реакції не були специфічні для *Staph. aureus*, для ідентифікації якого призначений набір. Реакції в лунках № 6, 7, 13 та 19 відрізнялися в різних ізолятів *Staph. pseudintermedius*. Лунка 6, що призначена для виявлення *Enterococcus* набула коричневого кольору в реакції з ізолятом № 2. Лунка 7, призначена для виявлення *Staph. aureus*, набула коричневого кольору з ізолятом № 1. Лунка 14, призначена для виявлення *Listeria spp.*, набула чорного кольору з ізолятом № 1. Лунка 19, призначена для виявлення ентеробактерій, набула жовтого кольору з ізолятом № 2. Лунки № 10, 15, 16, 18 та 20 набували кольору, що відповідає позитивному результату реакції, при внесенні обох ізолятів *Staph. pseudintermedius* (рис. 3.5).

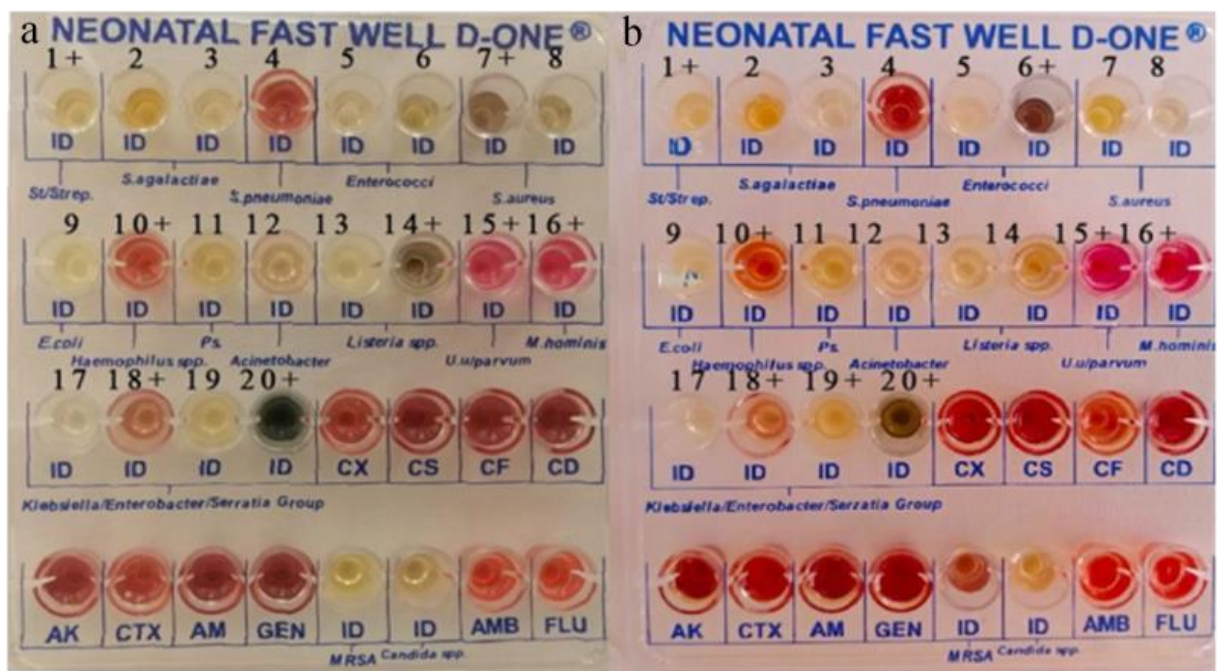


Рис. 3.5. Планшетки Neonatal FAST Well D-ONE після 24 год інкубації:
 а. *Staph. pseudintermedius* ізолят № 1; б. *Staph. pseudintermedius* ізолят № 2
 Позитивні реакції позначені символом “+”

Обидва протестовані ізоляти мали стійкість до всіх антибіотиків, що входять до складу набору. Один протестований ізолят виявився метицилінрезистентним, а інший – метицилінчутливим. Лунка для визначення MRSA показала позитивну реакцію для MRSP.

За дослідження ізоляту *Staph. aureus* ми отримали очікуваний результат без хибнонегативних реакцій. Мікрокультуральний набір не має достатньої інформативності для ідентифікації *Staph. pseudintermedius*, а його використання у ветеринарній медицині потребує додаткових досліджень.

З метою вивчення відповідності білкової структури отриманих ізолятів до еталонних зразків присутніх в базах даних, культури *Staph. pseudintermedius* вивчено у реакції MALDI-TOF MS (рис. 3.6). В результаті дослідження в лабораторії Biolights було отримано мас-спектри з унікальними наборами піків, що відповідають часовим координатам польоту іонізованих білкових фрагментів. Ідентифікація видового рівня була здійснена шляхом порівняння мас-спектрів досліджуваних ізолятів з референтними спектрами, присутніми у базі даних приладу. Детальні результати аналізу наведені в додатку Б.

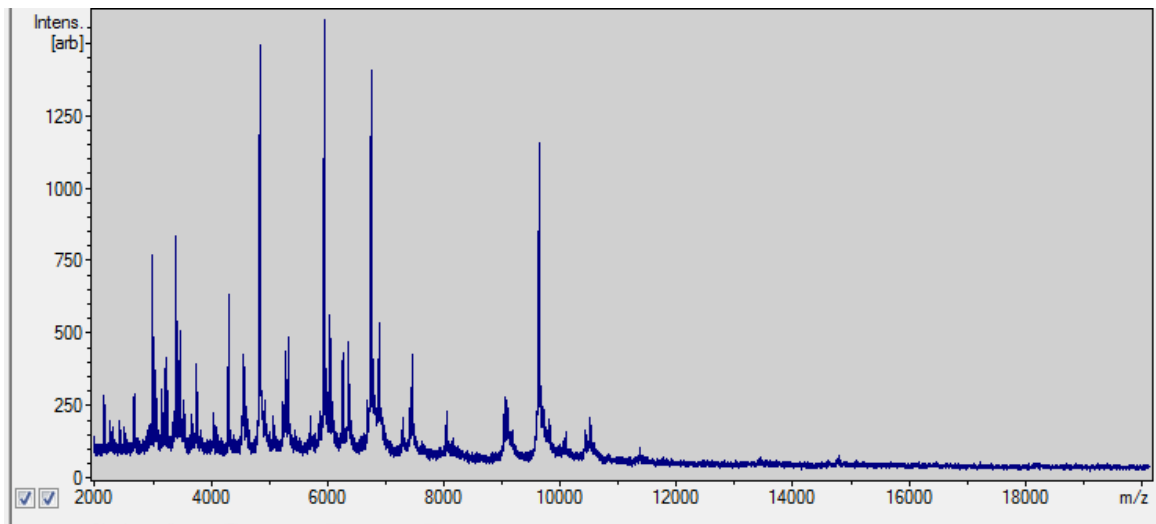


Рис. 3.6. Гістограма, отримана в результаті ідентифікації *Staph. pseudintermedius* з допомогою платформи MALDI-TOF MS

Обидва досліджувані ізоляти демонстрували культуральні та біохімічні особливості, типові для виду *Staph. pseudintermedius*: ферментували маніт, були каталазо- та коагулазопозитивними, не продукували цитохромоксидазу, спричиняли гемоліз еритроцитів і руйнування ДНК, не утворювали ацетоїн.

Окрім того, навколо диска з поліміксином Б спостерігалася зона затримки росту діаметром 16 мм.

Таким чином, культуральні, біохімічні та молекулярно-генетичні методи досліджень дозволили достовірно ідентифікувати виділені ізоляти як *Staph. pseudintermedius* та достовірно диференціювати їх від *Staph. aureus*. Цей вид демонстрував типові культуральні та біохімічні ознаки, такі як ферментація маніту, продукція каталази та коагулази, гемолітична активність, а також специфічні профілі в мас-спектрометрії.

3.2.2. Культуральні та біохімічні особливості стафілококів, ізольованих від хворих на мастит корів

Для визначення збудників маститу у корів були відібрані проби молока. Спочатку ізоляти стафілококів були виділені на основі культуральних властивостей на маніто-сольовому агарі та біохімічних тестів. Ізоляти, що відповідали морфологічним та біохімічним характеристикам стафілококів, в подальшому були досліджені на хромогенних середовищах. Всі культури *Staph. aureus* були підтверджені в реакції ПЛР (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Культуральні та біохімічні властивості грампозитивних галофільних коків, ізольованих із молока хворих на мастит корів (n=90)

Характеристика збудника	Кількість ізолятів
Галофільні, грампозитивні коки, n	45
Ферментація маніту, n	35
Наявність каталази, n	45
Коагуляція плазми крові, n	30
КПС, n	30
КНС, n	15

Загалом з молока від корів хворих на субклінічний та клінічний мастит було ізольовано 45 галофільних та грампозитивних коків та

каталазопозитивних коків, з них 77,7 % ізолятів ферментували маніт, а 66,6 % викликали згортання плазми кроля. Після характеристики отриманих ізолятів мікробіологічними методами, коагулазопозитивні стафілококи були вивчені в реакції ПЛР. Всі ізоляти, що викликали згортання плазми крові кроля були ідентифіковані як *Staph. aureus*. Отже нами встановлено, що *Staph. aureus* єдиний представник групи КПС, який викликає мастити у корів. Вид *Staph. pseudintermedius* не було виявлено у матеріалах відібраних від корів.

Також було вивчено культуральні особливості стафілококів ізольованих з молока хворих на мастит корів при культивуванні на поверхні хромогенних середовищ CHROMagar Mastitis та CHROMagar Orientation. На поверхні CHROMagar Mastitis колонії *Staph. aureus* набували рожевого забарвлення, а на поверхні CHROMagar Orientation – жовтого. Коагулазонегативні стафілококи на поверхні CHROMagar Mastitis мали блакитне та біле забарвлення колоній, а на CHROMagar Orientation – рожеве та біле. Компонент CHROMagar Mastitis, що призначене для культивування грамнегативних бактерій, інгібував ріст стафілококів.

3.2.3. Порівняльна характеристика мікробіологічних підходів до виявлення та ідентифікації стафілококів

Для обґрунтування можливості використання хромогенних середовищ з метою ідентифікації та диференціації стафілококів нами порівняно чутливість селективного маніто-сольового агару та CHROMagar Orientation, застосовуючи їх самостійно та у поєднанні зі швидкими біохімічними тестами.

Дослідження культуральних властивостей КПС показали, що характер росту *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* на хромогенних середовищах суттєво відрізняється. На поверхні CHROMagar *Staphylococcus* колонії *Staph. pseudintermedius* набули сіро-синього забарвлення, колір колоній ставав темніше на другу добу культивування (рис. 3.7, 3.8). Водночас колонії *Staph. aureus* мають рожевий колір.

Усі коагулазопозитивні стафілококи, виділені від собак та котів, були посіяні на поживне середовище CHROMagar Orientation. На цьому середовищі колонії *Staph. aureus* набули жовтого забарвлення.

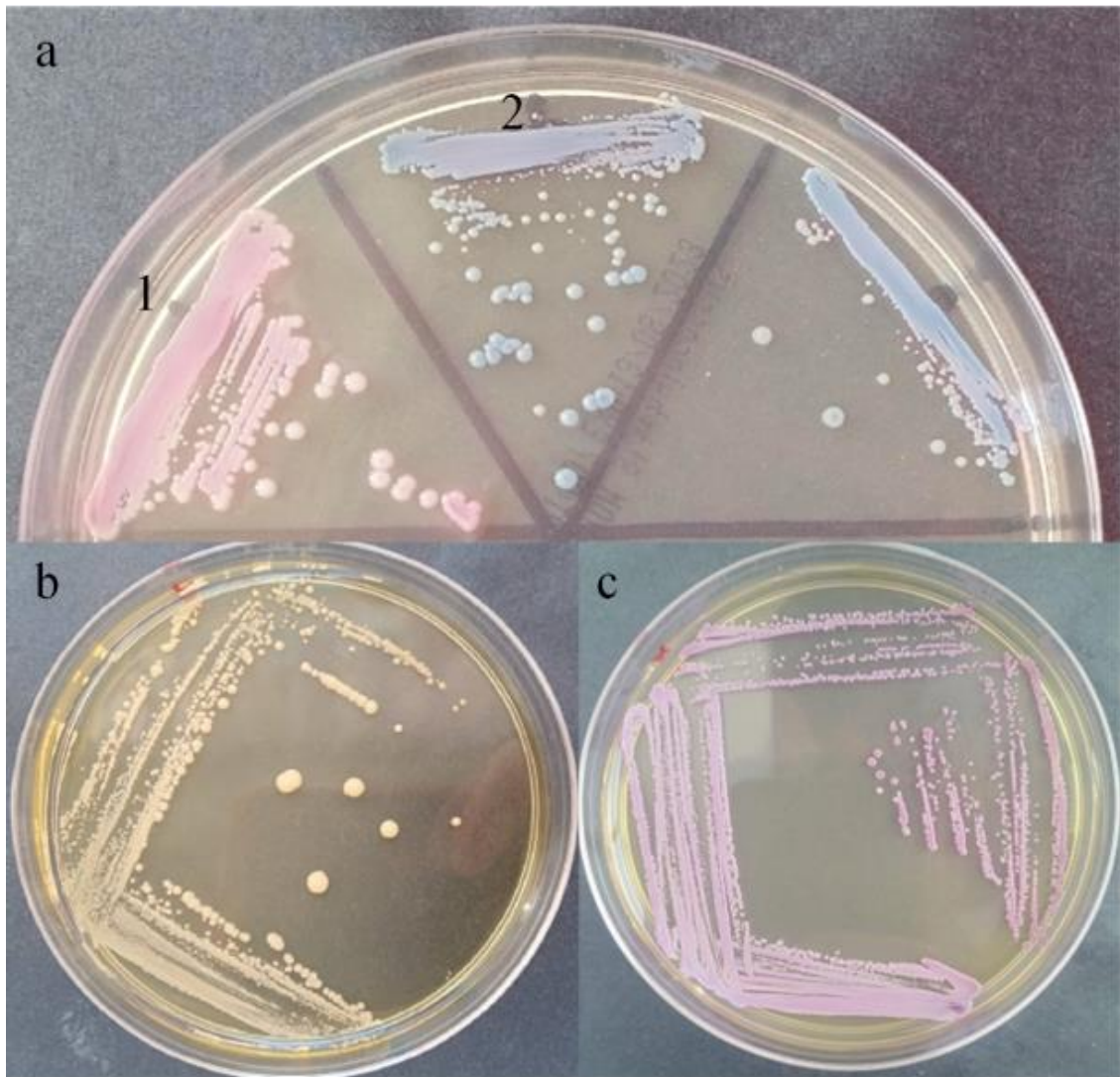


Рис. 3.7. Ріст *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* на поверхні хромогенних середовищ:

- а – 1. Рожеві колонії *Staph. aureus* на поверхні; 2. блакитні колонії *Staph. pseudintermedius* на поверхні CHROMagar *Staphylococcus*;
 б – Золотисті колонії *Staph. aureus*; с – рожеві колонії *Staph. pseudintermedius* на поверхні CHROMagar Orientation

Колонії *Staph. pseudintermedius* на CHROMagar Orientation набували від світло рожевого до темно рожевого забарвлення, яке відрізнялось між різними ізолятами. Інтенсивність кольору змінювалась від темнішого в центрі колонії до світлішого на периферії. Також було помічено зміну забарвлення колоній

залежно від часу культивування мікроорганізмів – на другу добу інтенсивність забарвлення зазвичай зростала (рис. 3.8).

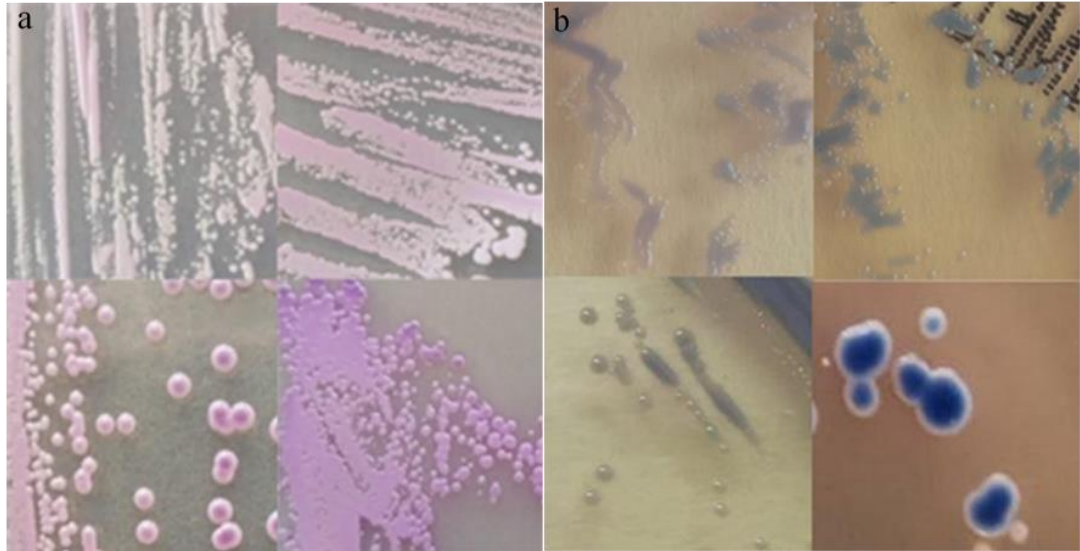


Рис. 3.8. Культуральні властивості *Staph. pseudintermedius* під час культивування на хромогенних середовищах:
 а – Рожеві колонії *Staph. pseudintermedius* на поверхні CHROMagar Orientation; б – блакитні колонії *Staph. pseudintermedius* на поверхні CHROMagar *Staphylococcus*

Для визначення специфічності та чутливості мікробіологічних схем досліджень було обрано відомі ізоляти (n=40): 20 *Staph. pseudintermedius*, 6 *Staph. aureus* та 14 КНС.

З 40 досліджених культур 29 – ферментували маніт, 27 – мали рожеве забарвлення на CHROMagar Orientation, 26 стафілококів викликали утворення згустку в плазмі крові та 25 – викликали просвітлення ДНК агару. Один ізолят *Staph. pseudintermedius* ДНКазної активності не мав (табл. 3.4).

Встановлено, що під час використання маніто-сольового агару кількість хибнопозитивних реакцій є більшою, ніж під час культивування на хромогенному середовищі. Хибнонегативні результати на маніто-сольовому агарі, в основному, були пов'язані з *Staph. aureus*, водночас було виявлено 3 ізоляти КНС, що ферментували маніт. На хромогенному середовищі рожеве забарвлення набули 7 КНС. Через це після застосування додаткових реакцій,

спрямованих на виявлення факторів патогенності, показники чутливості хромогенного середовища були вищі, ніж показники маніто-сольового агару (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Порівняння частоти виявлення *Staph. pseudintermedius* з використанням різних комбінацій мікробіологічних тестів

Дослідження	Результат	<i>S. pseudintermedius</i> n=20, n (%)	Інші стафілококи n=20, n (%)	Разом
МСА	МФ	20 (100)	9 (45)	29
	Інші реакції	–	11 (55)	11
МСА + ЛПК	МФ та утв. зг.	20 (100)	6 (25)	24
	Інші реакції	–	15 (75)	16
МСА + агар із ДНК	МФ та ДНКаза	19 (95)	6 (30)	25
	Інші реакції	1 (5)	14 (70)	15
МСА + агар із ДНК + ЛПК	МФ та утв. зг. та ДНКаза	20 (100)	6 (30)	26
	Інші реакції	–	14 (70)	14
ChrO	Рожеві колонії	20 (100)	7 (35)	27
	Інші реакції	–	13 (65)	13
ChrO + ЛПК	Рожеві колонії та утв. зг.	20 (100)	–	19
	Інші реакції	–	20 (100)	21
ChrO + агар із ДНК	Рожеві колонії та ДНКаза	19 (95)	0 (0)	19
	Інші реакції	1 (5)	20 (100)	21
ChrO + ЛПК + агар із ДНК	Рожеві колонії та утв. зг. та ДНКаза	20 (100)	0 (0)	20
	Інші реакції	–	20 (100)	20

Примітка. МСА – маніто-сольовий агар; ChrO – CHROMagar Orientation; ЛПК – ліофілізована плазма кроля; ДНКаза – просвітлення середовища ДНК агару навколо колоній; утв. зг. – коагуляції плазми кроля з утворенням згустку.

Чутливість маніто-сольового агару за диференціації *Staph. pseudintermedius* від інших представників виду була на 10,0 % нижчою, ніж хромогенного середовища. Запровадження додаткових реакцій плазмокоагуляції або встановлення активності ДНКазы значно підвищує чутливість як маніт-сольового агару, так і хромогенного середовища. Використання обох реакцій у комбінації з хромогенним середовищем призводить до найвищих значень для всіх показників, описаних у дослідженні. Це пов'язано з тим що, менш патогенні, КНС не виробляють коагулази і дезоксирибонуклеазу (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Діагностична ефективність методів виявлення *Staph. pseudintermedius* з використанням різних комбінацій мікробіологічних тестів

Мікробіологічні дослідження	Чутливість, (%)	Специфічність, (%)	PPV, (%)	NPV, (%)
МСА	55	100	69	100
МСА + ЛПК	70	100	77	100
МСА + агар із ДНК	70	95	76	93
МСА + агар із ДНК + ЛПК	70	100	77	100
ChrO	65	100	74	100
ChrO + ЛПК	100	100	100	100
ChrO + агар із ДНК +	100	95	100	95
ChrO + агар із ДНК + ЛПК	100	100	100	100

Примітка. МСА – маніто-сольовий агар; ChrO – CHROMagar Orientation; ЛПК – ліофілізована плазма кроля.

Встановлено, що хромогенне середовище має вищу чутливість для ідентифікації *Staph. pseudintermedius*, ніж маніто-сольовий агар. Якщо перерахувати отримані дані для ідентифікації збудника *Staph. aureus*, то

хромогенне середовище, навіть без додаткового набору біохімічних тестів, матиме максимальну чутливість та специфічність. Натомість використання маніто-сольового агару в комбінаціях з тестами на виявлення коагулази та дезоксирибонуклеазу матиме чутливість від 32,0 % до 44,0 %.

Результати експериментального дослідження вказують на можливість використання хромогенних середовищ з метою диференціації різних видів стафілококів. Проте чутливість різних мікробіологічних схем досліджень з використанням хромогенних і не хромогенних середовищ може змінюватися залежно відового складу досліджуваної вибірки стафілококових ізолятів.

3.3. Стійкість стафілококів до антибіотиків

Визначено стійкість до антибіотиків культур стафілококів, отриманих від хворих тварин. У ізолятів, отриманих від клінічно здорових тварин, визначали лише стійкість до скринінгових антибіотиків, таких як оксацилін або цефокситин, для виявлення метицилінстійких штамів.

3.3.1. Стійкість до антибіотиків у коагулазопозитивних стафілококів, ізольованих від собак та котів

Оскільки антибіотикорезистентність стафілококів є серйозною проблемою у ветеринарній медицині, проведено моніторинг стійкості ізолятів КПС, отриманих від собак та котів до антибіотиків. Загалом стійкість хоча б до одного антибіотика проявили 50,0 % вивчених КПС. З 18 зразків *Staph. pseudintermedius* отриманих від собак, стійким до 1 та більше препаратів були 55,5 % ізолятів. Водночас 11,1 % ізоляти мали помірну чутливість до одного антибіотика, а 33,3 % збудників були повністю чутливим до всіх досліджуваних антибіотиків.

З 6 ізолятів *Staph. aureus* 50,0 % були стійкими та 16,6 % був помірно чутливим до одного або більше антибіотиків. У котів не було виявлено стійких коагулазопозитивних стафілококів, 75,0 % *Staph. pseudintermedius* та 50,0 % *Staph. aureus* проявляли помірно чутливість хоча б до одного антибіотику (табл. 3.6).

**Стійкість до антибіотиків *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*
виділених від хворих тварин**

Антибіотик		<i>Staph. pseudintermedius</i> , n = 22			<i>Staph. aureus</i> , n = 6		
		Ч	П	С	Ч	П	С
Оксацилін	M±m, мм	23,5±0,6	–	–	24± 1,5	–	–
	%	100 %	–	–	100 %	–	–
Амоксицилін та клавуланова кислота	M±m, мм	27,5±0,6	–	–	25,5±1, 4	–	–
	%	100 %	–	–	100 %	–	–
Цефтріаксон	M±m, мм	23,3±0,5	–	–	25,7±4, 4	–	–
	%	100 %	–	–	100 %	–	–
Пеніцилін	M±m, мм	33,4± 0,9***	–	10,4± 6,4	35,7± 2,3***	–	14,3± 4,3
	%	81,8 %	–	18,2 %	50 %	–	50 %
Гентаміцин	M±m, мм	22,8±3,3 ***	–	7,5±10, 6	21,4± 3,3***	–	–
	%	95,5 %	–	4,5 %	100 %	–	–
Триметопри м та сульфаметок сазол	M±m, мм	17,1±0,9 ***	13,3± 0,6	1,13±1	16,5± 0,5***	13±0 ,6	0
	%	45,5 %	18,2 %	36,3 %	50,0 %	33 %	17 %
Тетрациклін	M±m, мм	26,7±4,5 **	15	–	26±3	–	–
	%	90,9 %	9,1 %	–	100 %	–	–
Еритроміцин	M±m, мм	24,9±2* **	–	3±2,4	27,8± 2,5***	–	0
	%	81,8 %	–	18,2 %	83 %	–	17 %
Ципрофлокс ацин	M±m, мм	21,6± 5,4***	10	0	21,7± 1,5***	19	0
	%	85,8 %	7,1 %	7,1 %	60 %	20 %	20 %

Примітка. Ч – чутливий; п – помірно чутливий; с – стійкий
*** – p<0.001 розмір зони затримки росту більший порівняно з ізолятами помірно стійкими або стійкими ізолятами.

Досліджені стафілококи найчастіше проявляли стійкість 36,3 % (зона затримки росту $17,1 \pm 0,9$ мм) або помірну чутливість 18,1 % (зона затримки росту $13,3 \pm 1$ мм) до комбінованого препарату сульфаметоксазолу з триметопримом. Ці речовини є похідними амідів сульфанілової кислоти та діамінопірімідину, і часто використовуються для лікування собак та котів. Стійкими до цього препарату виявились 44,4 % *Staph. pseudintermedius*, відібраних від собак, а помірно чутливими 11,2 % від собак та 50 % ізолятів від котів. Розмір зони затримки росту між різними за ступенем чутливості ізолятами має статистично значущу різницю ($\chi^2 17,2$; $p < 0.001$).

Загалом стійкість проявили 54,5 % *Staph. pseudintermedius* отримано зі шкіри собак, а також всі ізоляти з ока та носа, 9,0 % помірно чутливих ізолятів було отримано зі шкіри та 25,0% з вуха собак, а також із всі ізоляти із вуха та носа котів. По 25,0 % *Staph. aureus* ізолюваних зі шкіри собаки проявили повну стійкість та помірну чутливість. Помірно чутливим до триметоприму з сульфаметоксазолом також були всі ізоляти вуха котів (50 % від котячих ізолятів).

Стійкість до антибіотиків пеніциліну була другою за поширеністю (26,9 %) з-поміж досліджених стафілококів. Загалом 22,2 % резистентних ізоляти *Staph. pseudintermedius* отримані від котів та 75,0 % *Staph. aureus* – від собак. Зона затримки росту у ізолятів *Staph. pseudintermedius* $10,4 \pm 6,4$ мм, а *Staph. aureus* $14,3 \pm 4,3$ мм. Розмір зони затримки росту між стійкими та чутливими ізолятами має статистично значиму різницю ($p < 0.001$). Також поширеною була стійкість (19,2 %) до еритроміцину. Її проявляли 22,2 % *Staph. pseudintermedius* (зона затримки росту $3 \pm 2,4$ мм) та 25,0 % *Staph. aureus*. Всі зразки були отримані від собак, загалом стійкість до цього антибіотику проявили 23,0 % ізолятів *Staph. pseudintermedius* зі шкіри та всі з носа, стійкий *Staph. aureus* ізолюваний зі шкіри (рис. 3.9). Розмір затримки росту стійких ізолятів вірогідно вищий ($p < 0.001$)

Стійкість до інших груп антибактеріальних препаратів зустрічалася рідше. Зокрема, 8,3 % *Staph. pseudintermedius* та 33,3 % *Staph. aureus*,

ізолюваних від собак, проявили стійкість до ципрофлоксацину. Зона затримки росту стійких і помірно чутливих ізолятів *Staph. pseudintermedius* статистично вища.

Джерело	Профіль стійкості								
	OXA	AMC	CTR	PEN	GEN	SXT	TET	ERY	CIP
Ізоляти <i>Staph. pseudintermedius</i> виділені від собаки									
Шкіра	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч
Шкіра	ч	ч	ч	ч	ч	п	ч	ч	-
Шкіра	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	-
Шкіра	ч	ч	ч	с	ч	ч	ч	с	ч
Шкіра	ч	ч	ч	с	с	с	п	с	ч
Шкіра	ч	ч	ч	с	ч	с	ч	ч	ч
Шкіра	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	-
Шкіра	ч	ч	ч	ч	ч	с	ч	ч	-
Шкіра	ч	ч	ч	ч	ч	с	ч	ч	ч
Шкіра	ч	ч	ч	ч	ч	с	ч	ч	ч
Шкіра	ч	ч	ч	с	ч	с	ч	с	ч
Вухо	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	с
Вухо	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	-
Вухо	ч	ч	ч	ч	ч	п	ч	ч	ч
Вухо	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч
Око	ч	ч	ч	ч	ч	с	ч	ч	ч
Молоко	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч
Ніс	ч	ч	ч	ч	ч	с	ч	с	ч
Ізоляти <i>Staph. pseudintermedius</i> виділені від kota									
Шкіра	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	-
Вухо	ч	ч	ч	ч	ч	п	ч	ч	-
Око	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	п
Ніс	ч	ч	ч	ч	ч	п	п	ч	-
Ізоляти <i>Staph. aureus</i> виділені від собаки									
Шкіра	ч	ч	ч	с	ч	с	ч	с	-
Шкіра	ч	ч	ч	с	ч	ч	ч	ч	с
Шкіра	ч	ч	ч	с	ч	ч	ч	ч	ч
Шкіра	ч	ч	ч	ч	ч	п	ч	ч	ч
Ізоляти <i>Staph. aureus</i> виділені від kota									
Шкіра	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч
Вухо	ч	ч	ч	ч	ч	п	ч	ч	п

Рис. 3.9 Профіль антимікробної стійкості КПС, виділених від хворих тварин:

ч – чутливий; п – помірно чутливий; с – стійкий

Помірну чутливість до цього препарату проявили 25,0 % *Staph. pseudintermedius* та 50,0 % *Staph. aureus* отриманих від kota. Також 5,6 % ізолятів *Staph. pseudintermedius* із тіла собаки проявив стійкість до гентаміцину. До тетрацикліну було встановлено лише помірну чутливість в 5,6 % ізолятів *Staph. pseudintermedius* від собаки та 16,6 % ізолятів від kota. Зона затримки росту між стійкими та помірно чутливими ізолятами відрізнялася ($p=0,003$). Діаметр зони затримки росту для всіх досліджених стафілококів наведено в додатку В.

Статистично значущої різниці між стійкістю *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus* до всіх антибіотиків не було виявлено. Результати порівняння тест Фішера для показників стійкості до антибіотиків пеніциліну ($p=0,15$) та ципрофлоксацину ($p=0,24$) були нижчі за інші антибіотики ($p=1$).

Найвищий рівень стійкості проявили ізоляти *Staph. pseudintermedius* (4 антибіотики) та *Staph. aureus* (3 антибіотики) ізольовані зі шкіри собаки. Джерело ізоляції стафілококів не має статистично значущого впливу на стійкість хоча б до одного антибіотика ($p=0,403$, $\chi^2=4,02$) або на кількість препаратів, до яких стафілококи проявляли стійкість ($p=0,257$, $\chi^2=5,31$).

У результаті дослідження було виявлено лише один коагулазопозитивний стафілокок від клінічно здорових тварин, що проявив фенотипову стійкість до β -лактамних антибіотиків. Ця культура була відібрана від здорової собаки. Варто зазначити, що MRSP мав множинну стійкість до всіх досліджених антибіотиків, а не тільки до препаратів групи β -лактамів. Загалом це був ізолят, що мав найвищий рівень множинної лікарської стійкості. Усі інші стафілококи отримані від клінічно здорових собак були чутливими до β -лактамних антибіотиків.

Результати проведеного дослідження продемонстрували значне поширення антибіотикорезистентності серед ізолятів *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*, виділених від хворих собак і котів. Найвищі рівні стійкості були виявлені до комбінованого препарату сульфаметоксазолу з триметопримом, пеніциліну та еритроміцину. Окремі ізоляти проявляли

мультирезистентність, демонструючи стійкість до декількох класів антибіотиків одночасно. Варто відзначити виявлення метицилінрезистентного штаму *Staph. pseudintermedius* у здорової собаки, що може вказувати на можливе поширення резистентних штамів серед популяції тварин.

3.3.2. Систематичний огляд та мета-аналіз стійкості *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* до антибіотиків

Для всебічної оцінки рівня поширення антибіотикорезистентності серед стафілококів, що уражають тварин, було проведено мета-аналіз результатів наукових досліджень, опублікованих у європейських країнах. Для проведення мета-аналізу було обрано 7 публікацій, що досліджували стійкість *Staph. pseudintermedius*, та 6 публікацій, що стосувалися *Staph. aureus* (додаток Г).

Стафілококи були виділені з різних ділянок тіла собак та котів. Для визначення стійкості у п'яти публікаціях застосовувався метод дифузії в агар, у трьох публікаціях – метод мінімальної інгібувальної концентрації. Перелік антибактеріальних речовин, до яких визначали стійкість, відрізнявся між різними дослідженнями.

Результати аналізу стійкості *Staph. pseudintermedius* до дванадцяти антибактеріальних препаратів виявили високий рівень гетерогенності ($I_2 > 50\%$). Лише повідомлення про стійкість до цефовецина, кліндаміцина та хлорамфеніколу відзначаються низькою гетерогенністю. Також дані стійкості до кліндаміцину мали статистично значущу асиметрію розподілу даних $p=0,0086$. Це єдина група даних, щодо яких було виявлено такий ефект.

Стійкість бактерій роду *Staph. pseudintermedius* до β -лактамного антибіотика пеніциліну описана в чотирьох наукових публікаціях. Загальна резистентність становить 34,8 % (95 % CI 10,1–65,1 %). Стійкість до комбінації амоксициліну та клавуланової кислоти вивчали в 5 дослідженнях, загальна резистентність склала 9,5 % (95 % CI 4,8–15,6 %). Також у 5 публікаціях описані результати аналізу стійкості до скринінгового антибіотика

оксациліну, загальна резистентність становить 10,3 % (95 % СІ 6,8–14,3 %) (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Мета-аналіз стійкості *Staph. pseudintermedius* до антибіотиків

Антибіотик	Всього, n	Стійкі, n	Разом, %	95 СІ, %	I ² %; p
Пеніцилін	3716	1903	34,8	10,1–65,1	99,6; p<0,001
Амоксицилін та клавуланова кислота	1485	134	9,5	4,8–15,6	89,9; p<0,001
Цефотоксин	821	79	6,3	0,9–16,0	92,2; p<0,001
Оксацилін	1422	136	10,3	6,8–14,3	75,1; p=0,003
Цефовецин	1920	189	9,9	8,6–11,3	0; p=0,695
Хлорамфенікол	1471	287	19,6	17,6–21,7	0; p=0,978
Еритроміцин	2628	896	52,9	9,9–93,3	99,4; p<0,001
Тетрациклін	430	198	43,8	34,9–53,0	71; p=0,016
Кліндаміцин	1352	415	30,7	28,3–33,3	45,2; p=0,14
Триметоприм та сульфаметоксазол	3361	476	30,0	17,1–42,1	96,2; p<0,001
Енрофлоксацин	3604	536	18,0	10,1–65,1	98,3; p<0,001
Гентаміцин	3955	582	17,3	4,8–15,6	97,9; p<0,001
Фузидова кислота	2054	165	14,4	0,9–16,0	98; p<0,001
Марбофлоксацин	1262	97	4,9	6,8–14,3	90,9; p<0,001
Прадофлоксацин	1262	97	7,3	8,6–11,3	78,3; p=0,01

Резистентність до цефалоспоринового антибіотика цефовецину і цефотоксину описана в трьох публікаціях, та має схожі рівні – відповідно 9,9 % (95 % СІ 8,6–11,3 %) і 6,3 % (95 % СІ 0,9–16,0).

Найвищі рівні стійкості серед всіх препаратів виявлені до антибіотика тетрацикліну 43,8 % (95 % СІ 34,9–53 %) та макролідного антибіотика еритроміцину 52,9 % (95 % СІ 9,9–93,3 %). Також відзначено високий рівень стійкості до лінкозамідного антибіотика кліндаміцину 30,7 % (95 % СІ 28,3–33,3 %) та комбінації сульфаметоксазолу та триметоприму 30,0 % (95 % СІ 17,1–42,1 %). Дещо нижчим був рівень стійкості до хлорамфеніколу 19,6 % (95 % СІ 17,6–21,7 %), фторхінолонового антибіотика енрофлоксацину 18 % (95 % СІ 8,3–30,5 %), та аміноглікозиду гентаміцину – 17,3 % (95 % СІ 8,6–28,3 %).

Найнижчий рівень стійкості серед всіх препаратів був виявлений до фузидової кислоти 14,4 % (95 % СІ 2–35,2 %) та макролідів: прадофлоксацину 7,3 % (95 % СІ 4,2–11,2 %) і марбофлоксацину 4,9 % (95 % СІ 1,5–10,2 %).

Дослідження стійкості *Staph. aureus* мали високу гетерогенність даних. Найвищий рівень стійкості було виявлено до β -лактамного антибіотика пеніциліну – 66,9 % (95 % СІ 57,3–75,9 %) та іншого представника цієї групи, ампіциліну 47,6 % (95 % СІ 0,3–98,9 %).

Також штами *Staph. aureus* демонстрували високий рівень стійкості до β -лактамних антибіотиків, стійких до пеніцилінази, таких як оксацилін – 32,8 % (95 % СІ 0,9–81,5 %) та комбінація амоксициліну з клавулановою кислотою – 27,6 % (95 % СІ 3–64,4 %). Другою за поширеністю серед усіх досліджень була стійкість до тетрацикліну – 55,0 % (95 % СІ 6,1–97,7 %). До інших антибактеріальних препаратів зафіксовано нижчий рівень стійкості. Стійкість до еритроміцину проявили 16,5 % (95 % СІ 3,3–25,2 %) до гентаміцину 12,8 % (95 % СІ 6,9–20,3) та енрофлоксацину – 11,1 % (95 % СІ 4,7–19,8 %). Найнижчий рівень стійкості було виявлено до кліндаміцину 10,2 % (95 % СІ 1,5–25,2 %) та марбофлоксацину – 7,9 % (95 % СІ 0–29,7 %).

Статистично значуща різниця з найвищим рівнем відмінності між групами ($C > 0,2$) була виявлена у поширенні стійкості до антибіотиків пеніцилінової групи, стійких до β -лактамаз – амоксиклаву ($p < 0,001$, $C = 0,282$) та оксациліну ($p < 0,001$, $C = 0,2$) (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Мета-аналіз стійкості *Staph. pseudintermedius* до антибіотиків

Антибіотик	Всього, n	Стійкі, n	Разом, %	95 CI, %	I ² , %; p
Пеніцилін	402	278	66,9	57,3–75,9	63,5; p=0,042
Амоксицилін та клавуланова кислота	159	66	27,6	3,0–64,4	95,6; p=0,001
Ампіцилін	93	44	47,6	0,3–98,9	97,9; p<0,001
Оксацилін	159	50	32,8	0,9–81,5	97,7; p<0,001
Триметоприм та сульфаметоксазол	441	55	14,9	3,4–32,5	93,1; p<0,001
Тетрациклін	101	47	55,0	6,1–97,7	97,1; p<0,001
Еритроміцин	343	93	16,5	3,3–36,9	91,0; p<0,001
Гентаміцин	422	54	12,8	6,9–20,3	66,5; p=0,030
Кліндаміцин	144	19	10,2	1,5–25,2	82,7; p=0,003
Енрофлоксацин	426	54	11,1	4,7–19,8	77,1 p=0,002
Марбофлоксацин	134	19	7,9	0–29,7	91,0; p<0,001

Також спостерігалася статистично значуща різниця у поширенні стійкості серед *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* до антибіотиків пеніциліну ($p<0,001$, $S=0,106$), кліндаміцину ($p<0,001$, $S=0,113$), марбофлоксацину ($p=0,01$, $S=0,069$) та еритроміцину ($p=0,01$, $S=0,047$), проте з меншим рівнем відмінності між двома бактеріями.

Водночас, різниць у стійкості до триметопріму з сульфаметоксазолом ($p=0,336$), тетрацикліну ($p=0,930$) та енрофлоксацину ($p=0,225$) не виявлено.

Результати проведеного мета-аналізу продемонстрували значне поширення стійкості до різних класів антибіотиків серед ізолятів

Staph. pseudintermedius та *Staph. aureus*, виділених від хворих собак і котів європейського регіону. Загалом дані про поширення резистентності до різних класів антибіотиків відрізняються. Загалом, найвищий рівень стійкості встановлено до пеніциліну, тетрацикліну, еритроміцину та сульфаметоксазолу з триметопримом.

3.3.3. Стійкість до антибіотиків стафілококів ізольованих від хворих на мастит корів

Оскільки стафілококи, які викликають інфекції у корів, мають значний ризик міжвидової передачі, аналіз рівня їх антибіотикорезистентності є критично важливим. Особливу занепокоєність викликає поява метицилін-резистентних штамів стафілококів.

Стійкість хоча б до одного антибіотика проявили 86,6 % *Staph. aureus*: 88,9 % корів з субклінічним маститом та 85,7 % від клінічно хворих. Форма перебігу маститу не впливала на чутливість збудника до антибіотиків ($p=1$). По одному ізоляту *Staph. aureus* від субклінічно хворих тварин проявили стійкість до 3, 4 та 5 антибіотиків. Від клінічно хворих тварин к ізоляти проявили стійкість до двох препаратів, 3 до трьох і один до 4. *Staph. aureus* найчастіше (60,0 % ізолятів) проявляв стійкість до β -лактамного антибіотика пеніциліну (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Стійкість до антибіотиків *Staph. aureus* виділеного з молока хворих на мастит корів (n=30)

Антибіотик	Субклінічний мастит		Клінічний мастит		Загалом	
	n	%	n	%	n	%
Бензилпеніцилін	7	77,8	11	52,4	18	60,0
Цефокситин	2	22,2	5	23,8	7	23,3
Кліндаміцин	3	33,3	3	14,3	6	20,0
Тетрациклін	2	22,2	4	19,0	6	20,0
Канаміцин	1	11,1	4	19,0	5	16,7
Ципрофлоксацин	2	22,2	4	19,0	6	20,0

Другою за поширеністю була стійкість до препарату цефалоспоринового ряду – цефокситину. Цей антибіотик використовується як скринінговий препарат для виявлення метицилінрезистентності. По 20,0 % ізолятів проявили стійкість до кліндаміцину, тетрацикліну та ципрофлоксацину окремо. Найменший рівень (16,7 %) стійкості був виявлений до антибіотика канаміцину

З 15 коагулазонегативних стафілококів 13 проявили стійкість до одного або більше антибіотиків. Загалом з-поміж них 56 % штамів стійкі до пеніциліну, 38 % – до гентаміцину, 31 % – до тетрацикліну та 29 % – до ципрофлоксацину.

Дослідження виявило високий рівень поширення антибіотикорезистентності серед ізолятів *Staphylococcus aureus* від корів з маститом. Найбільша стійкість спостерігалася до антибіотиків пеніцилінової та цефалоспоринової групи антибіотиків, що свідчить про стійкість до всіх препаратів класу β -лактами. Значна частина ізолятів також була резистентною до кліндаміцину, тетрацикліну, ципрофлоксацину та канаміцину.

3.4. Активність утворення біоплівки ізолятами *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*

Утворення біоплівок є важливим фактором патогенного впливу стафілококів, що надає їм можливість ефективно чинити інфекційний вплив. Різні штами стафілококів відрізняються кількістю позаклітинного матриксу що вони виробляють. Визначити об'єм позаклітинної полімерної речовини, можна, вимірявши об'єм барвника, здатного вбиратися в структуру утвореної біоплівки.

Загалом було досліджено 22 ізоляти *Staph. pseudintermedius*, виділені від хворих тварин. Для цієї групи оптична щільність негативних контролів була $0,185 \pm 0,008$, з огляду на цей показник були розраховані такі показники для визначення потенціалу до утворення біоплівки досліджуваних штамів: нижче $0,208$ OD – не мають потенціалу утворювати біоплівку, від $0,208$ OD до $0,416$

OD мають слабкі біоплівкоутворювальні властивості, від 0,416 OD до 0,832 OD помірні біоплівкоутворювальні властивості, вище 0,832 OD – сильні біоплівкоутворювальні властивості (рис. 3.10).

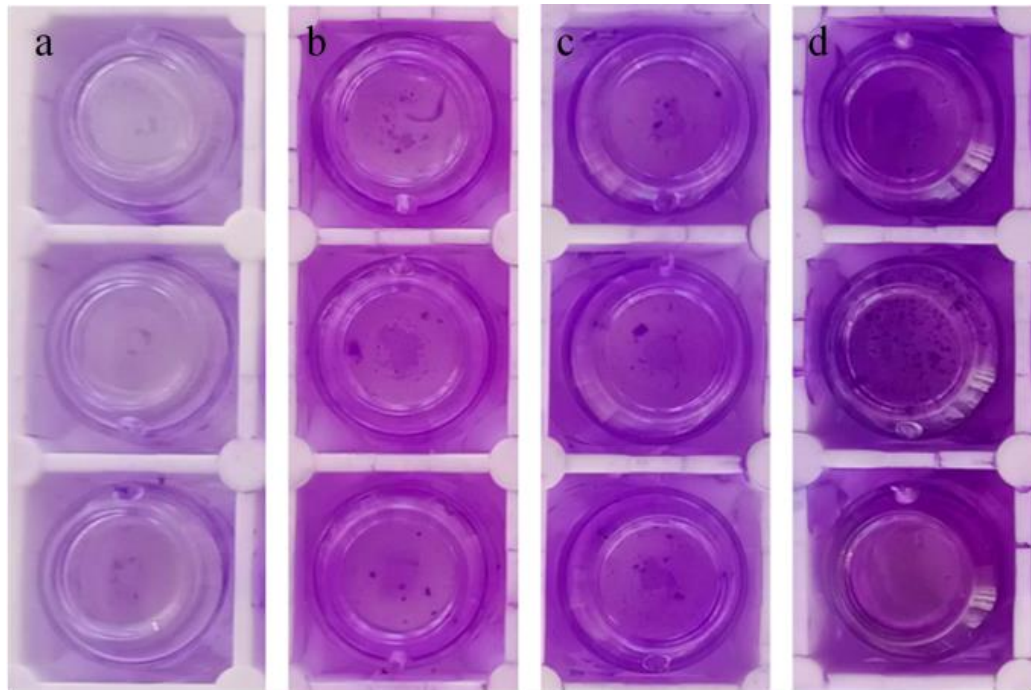


Рис. 3.10. Щільність біоплівок сформованих на дні лунки мікротитраційного планшету:

- а – негативний контроль; б – ізолят зі слабкими біоплівкоутворювальними властивостями;
 с – ізолят із помірними біоплівкоутворювальними властивостями; д – ізолят із високими біоплівкоутворювальними властивостями

Десять (45,5 %) досліджених ізолятів *Staph. pseudintermedius* мали слабку здатність утворювати біоплівку. Розчин із барвником, екстрагованим із біоплівок, утворених цими штамами, мав оптичну щільність у середньому $0,337 \pm 0,052$ OD₄₉₂ (медіана 0,342). Найнижчий показник оптичної щільності був $0,295 \pm 0,027$ OD₄₉₂ (табл. 3.10). Такі штами матимуть слабку адгезію до абіотичних та біотичних поверхонь. До цієї групи увійшли 6 (54,5 %) ізолятів, виділених із тіла, 1 (25,0 %) ізолят із вуха і всі 3 ізоляти з ока. Стійкість до одного або більше антимікробних речовин проявили 60,0 % ізолятів із групи.

Таблиця 3.10

Здатність ізолятів *Staph. pseudintermedius*, отриманих від хворих собак та котів до утворення біоплівки (n=22)

Ізолят, №	Гени міжклітинної адгезії	OD, (n=66) медіана±SD	Здатність утворювати біоплівку
617	<i>icaD</i>	0,295±0,027	Слабка
623	<i>icaA/D</i>	0,511±0,088	Помірна
636	<i>icaA/D</i>	0,454±0,085	Помірна
789	<i>icaA/D</i>	0,958±0,106	Сильна
854	<i>icaA/D</i>	1,618±0,579	Сильна
884	<i>icaD</i>	0,259±0,017	Слабка
969	<i>icaA/D</i>	0,286±0,022	Слабка
1244	<i>icaA</i>	0,360±0,085	Слабка
1245	<i>icaA/D</i>	0,368±0,011	Слабка
1246	<i>icaA/D</i>	0,444±0,103	Помірна
1585	<i>icaA/D</i>	0,538±0,100	Помірна
1681	<i>icaA/D</i>	0,867±0,149	Сильна
1754	<i>icaA/D</i>	0,987±0,119	Сильна
1759	<i>icaA/D</i>	0,386±0,045	Слабка
1884	<i>icaA/D</i>	0,392±0,058	Слабка
1933	<i>icaA/D</i>	0,453±0,092	Помірна
2049	<i>icaD</i>	0,572±0,136	Помірна
2672	<i>icaA/D</i>	0,850±0,102	Сильна
1138	<i>icaD</i>	0,323±0,060	Слабка
1758	<i>icaA/D</i>	0,292±0,070	Слабка
2369	<i>icaD</i>	0,406±0,121	Слабка
2494	<i>icaA/D</i>	0,432±0,079	Помірна

Сім (31,9 %) ізолятів *Staph. pseudintermedius* мали помірні біоплівкоутворювальні властивості. Оптична густина цієї групи була в межах від 0,432 до 0,538, у середньому – 0,486±0,021 (медіана 0,454). Ця група включала 3 (27,2 %) ізоляти з тіла, 1 (25 %) ізолят із вуха, 2 (66,7 %) ізоляти з носа та один із молока, 85,7 % ізолятів групи були стійкими до одного або більше антибіотиків (табл. 3.10).

Сильний потенціал до утворення біоплівок було виявлено в 5 (22,7 %) ізолятів *Staph. pseudintermedius*. Ізоляти, що виробляють велику кількість

позаклітинної полімерної речовини краще захищені від впливу факторів навколишнього середовища. Стафілококи що мають високий рівень біоплівкоутворювальних властивостей ізольовані з вуха двох (50,0 %), тіла двох (18,2 %) та носа однієї 1 (33,3 %) собаки. Оптична щільність в цій групі стафілококів була в межах 0,850 – 1,618, у середньому – $1,06 \pm 0,32$ (медіана 0,958) (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Здатність ізолятів *Staph. aureus*, отриманих від хворих собак та котів до утворення біоплівки (n=6)

Ізолят, №	OD, (n=18) медіана \pm SD	Здатність утворювати біоплівку
819	1,191 \pm 0,049	Сильна
1051	0,471 \pm 0,090	Помірна
1059	0,272 \pm 0,010	Слабка
2817	0,302 \pm 0,037	Слабка
885	0,601 \pm 0,144	Помірна
2368	0,502 \pm 0,019	Помірна

Ізоляти, стійкі до 3 і 4 антибактеріальних препаратів, утворювали біоплівки найвищої щільності. Показники оптичної щільності мають розподіл відмінний від нормального ($W=0,716$; $p<0,001$). Дисперсія між двома групами за видом тварин має статистично значущу різницю ($F=3,31$; $p=0,084$). Немає статистично значущої різниці між потенціалом до утворення біоплівки ізолятів відібраних від собак та котів ($p=0,166$).

Джерело ізоляції не має статистично значущого впливу, на щільність утворення біоплівки ($\chi^2=6,72$; $p=0,151$). Розподіл даних, що відрізняється від нормального ($W=0,923$; $p<0,001$), дисперсія між групами за джерелом ізоляції статистично відрізняється ($F=6,87$; $p=0,003$). Для порівняння впливу джерела ізоляції на щільність біоплівки з масиву даних був видалений показник штаму, виділений із молока, оскільки він єдиний у своїй групі.

Якщо говорити про стійкість до антибіотиків, то немає статистично значущої різниці між кількістю препаратів, до яких проявив стійкість ізолят, та потенціалом до утворення біоплівки ($\chi^2=7,72$, $p=0,052$).

З усіх досліджених ізолятів *Staph. aureus* два ізоляти, що були виділені з шкіри, мали слабку здатність до утворення біоплівки (33,3 %). Оптична щільність розчину для їх дослідження становила $0,531 \pm 0,066$ OD492 (медіана 0,520).

Два ізоляти із середньою здатністю до утворення біоплівки були виділені з тіла та один – з вуха (разом 50,0 %). Один ізолят (16,7 %) зі здатністю утворювати щільну біоплівку було отримано з шкіри.

Показники щільності біоплівки ізолятів *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* відібраних від хворих тварин не мають статистично значущої різниці ($p=0,806$). Розподіл даних відрізнявся від нормального ($W=0,783$, $p<0,001$), дисперсія рівна ($F=0,005$, $p=0,947$). Низьке значення F вказує на те, що міжгрупова варіація дуже мала в порівнянні з внутрішньогруповою варіацією.

У рамках виконання роботи були досліджені особливості утворення біоплівок ізолятами коагулазопозитивних стафілококів, відібраних від клінічно здорових тварин. Для цієї групи дослідження були визначені такі граничні показники для визначення потенціалу до утворення біоплівки: нижче 0,192 – не утворює біоплівки, від 0,192 до 0,384 та від 0,384 до 0,768 – помірна властивість утворювати біоплівки, вище 0,768 – сильна властивість утворювати біоплівки. Усього було досліджено 8 ізолятів *Staph. pseudintermedius*, з них 4 (50,0 %) мали слабкі біоплівкоутворювальні властивості. Показники оптичної щільності в цій групі були в межах від 0,244 до 0,341, $0,279 \pm 0,043$ (медіана 0,265). Три ізоляти (37,5 %) мали помірні біоплівкоутворювальні властивості $0,556 \pm 0,169$ (медіана 0,513). Один досліджуваний ізолят (12,5 %) мав сильні біоплівкоутворювальні властивості. Із 4 ізолятів *Staph. aureus* два продукували слабку біоплівку (50,0 %), один – помірну (25,0 %) й один – сильну (25,0 %) (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

**Здатність ізолятів *Staph. pseudintermedius* (n=8) та *Staph. aureus* (n=4)
отриманих від клінічно здорових собак до утворення біоплівки**

Ізолят, №	Гени оперону <i>ica</i>	OD, (n=36) m±SD	Щільність біоплівки
239	<i>icaA/D</i>	0,862±0,041	Сильна
217	<i>icaA/D</i>	0,262±0,043	Слабка
115	<i>icaA</i>	0,244±0,042	Слабка
130	<i>icaD</i>	0,742±0,082	Помірна
180	<i>icaD</i>	0,513±0,033	Помірна
202	<i>icaA/D</i>	0,413±0,038	Помірна
235	невиявлено	0,267±0,036	Слабка
250	<i>icaA/D</i>	0,341±0,069	Слабка
112	–	0,261±0,014	Слабка
127	–	0,434±0,038	Помірна
205	–	0,796±0,052	Сильна
233	–	0,348±0,036	Слабка

Статистично значущої різниці між показниками щільності біоплівки ізолятів *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* від клінічно здорових тварин не виявлено ($p=0,933$). Дані мають розподіл, що відрізняється від нормального ($W=0,838$, $p=0,026$). Групи *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* мають різну дисперсію ($F=0,066$, $p=0,803$).

Усього було досліджено 8 ізолятів *Staph. pseudintermedius*, з них 4 (50 %) мали слабкі біоплівкоутворювальні властивості. Показники оптичної щільності в цій групі були в межах від 0,244 до 0,341, $0,279\pm 0,043$ (медіана 0,265). Три ізоляти (37,5 %) мали помірні біоплівкоутворювальні властивості $0,556\pm 0,169$ (медіана 0,513). Один досліджуваний ізолят (12,5 %) мав сильні

біоплівкоутворювальні властивості. Із 4 ізолятів *Staph. aureus* два продукували слабку біоплівку (50 %), один – помірну (25 %) й один – сильну (25 %).

Статистично значущої різниці між показниками щільності біоплівки ізолятів *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* від клінічно здорових тварин не виявлено ($p=0,933$). Дані мають розподіл, що відрізняється від нормального ($W=0,838$, $p=0,026$). Групи *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* мають різну дисперсію ($F=0,066$, $p=0,803$).

Між групами клінічно здорових та хворих тварин не встановлено статистично значущої різниці медіан ізолятів *Staph. pseudintermedius* ($p=0,238$). Показники визначення біоплівкоутворювальних властивостей *Staph. pseudintermedius* мають рівну дисперсію ($F=0,745$, $p=0,396$) та розподіл даних, що відрізняється від нормального ($W=0,820$, $p<0,001$). Статистично значущої різниці середніх значень ізолятів *Staph. aureus* ($p=0,7$) у клінічно здорових та хворих собак не виявлено. Ці дані мають нормальний розподіл ($W=0,833$, $p=0,064$) та рівність дисперсії ($F=1,26$, $p=0,305$).

Також було досліджено потенціал до утворення біоплівки 7 MRSA ізолятів отриманих від хворих на мастит корів. Граничні межі оптичної щільності для визначення потенціалу до утворення біоплівки для цієї групи було визначено наступними: менше ніж 0,216 OD – не утворюють біоплівку, від 0,216 до 0,432 – мають слабкі біоплівкоутворювальні властивості, від 0,432 до 0,864 – помірні біоплівкоутворювальні властивості, вище 0,864 – сильні біоплівкоутворювальні властивості. Досліджені MRSA ізоляти від хворих на мастит корів продемонстрували різний ступінь здатності до утворення біоплівки. З досліджених бактеріальних культур одна мала слабкі, три помірні та три сильні біоплівкоутворювальні властивості. Середній показник групи ізолятів із помірними біоплівкоутворювальними властивостями – $0,539 \pm 0,089$ (медіана 0,542), групи із сильними біоплівкоутворюючими властивостями – $1,120 \pm 0,249$ (медіана 1,092) (табл. 3.13). Щільність біоплівки не залежала від кількості антибіотиків до яких ізоляти проявили стійкість, та форми перебігу

мастити у корів. Розміри зони затримки росту для кожного повтору та джерело ізоляції ізолятів наведено в додатку Д.

Таблиця 3.13

Здатність MRSA ізолятів (n=7), отриманих від хворих на мастит корів до утворення біоплівки

Ізолят	OD, (n=21) медіана±SD	Здатність утворювати біоплівку
1	0,448±0,017	Помірна
8	1,092±0,063	Сильна
10	0,225±0,011	Слабка
16	1,382±0,018	Сильна
20	0,542±0,132	Помірна
22	0,886±0,022	Сильна
26	0,626±0,019	Помірна

При порівнянні *Staph. aureus* відібраних від корів та домашніх тварин різниці між середнім не виявлено ($p=0,196$). Розподіл даних нормальний ($W=0,922$, $p=0,162$), дисперсія рівна ($p=0,237$).

Отже, близько половини досліджених штамів *Staph. pseudintermedius* проявляли слабку здатність до біоплівкоутворення, тоді як третина мала помірні властивості. Подібний розподіл спостерігався і для *Staph. aureus*. Не було виявлено статистично значущої різниці у здатності до біоплівкоутворення між цими двома видами стафілококів. Загалом, сильні продуценти біоплівок частіше демонстрували стійкість до більшої кількості антибіотиків, проте статистично значимої різниці не виявлено. Ці результати свідчать про важливість вивчення біоплівкоутворення як одного з механізмів антибіотикорезистентності стафілококів, що циркулюють серед тварин.

3.5. Молекулярно-генетична характеристика стафілококів

Успішно оптимізовано протокол полімеразної ланцюгової реакції та апробовано його з використанням польових ізолятів мікроорганізмів. Визначено високу аналітичну чутливість та специфічність оптимізованого ПЛР методу. Результати виявлення генів методами ПЛР у реальному часі та

класичної ПЛР повністю узгоджуються між собою. У переважній кількості проаналізованих ізолятів знайдено гени, асоційовані з утворенням біоплівки та факторами патогенності.

3.5.1. Ідентифікація та диференціація *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus* методом ПЛР

Для визначення оптимальної температури відпалу для виявлення *Staphylococcus spp.* методом ПЛР було використано ДНК трьох музейних штамів *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis* та *Staph. pseudintermedius*. Для негативних контролів застосували ДНК *Ent. faecalis* та *Str. pneumonia* (рис. 3.11).

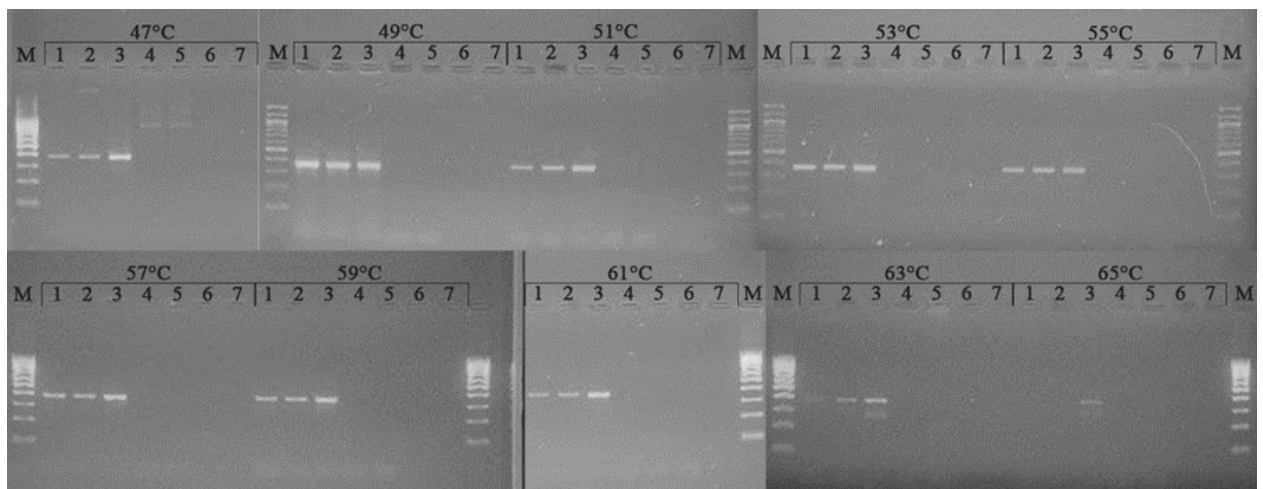


Рис. 3.11 Електрофореграми продуктів ПЛР із використанням праймерів, спрямованих на виявлення *Staphylococcus spp.* за різних температур відпалу:

1,2 – *Staph. aureus*; 3 – *Staph. epidermidis*; 4 – *Ent. faecalis*; 5 – *Str. pneumoniae*;
6,7 – негативний контроль

В результаті оптимізації протоколу реакції з використанням пари праймерів, спрямованих на ділянку гена *tuf* бактерій *Staphylococcus spp.* було встановлено, що оптимальна температура відпалу перебувала в межах від 53 °C до 63 °C. За низької (≤ 51 °C) і високої температур (≥ 61 °C) утворювалися неспецифічні фрагменти у вигляді шлейфа, що тягнувся від лунок (табл. 3.14).

Таблиця 3.14

Результати оптимізації протоколу виявлення *Staphylococcus spp.* в реакції класичної ПЛР

Температура	Позитивний контроль	Негативний контроль	Результат оптимізації
47 °С	3/3 неспецифічні фрагменти >100	0/2 наявні неспецифічні фрагменти	Низька температура
49 °С	3/3 неспецифічні фрагменти >100	0/2 наявні неспецифічні фрагменти >100	Низька температура
51 °С	3/3 неспецифічні фрагменти >100	0/2 наявні неспецифічні фрагменти >100	Низька температура
53 °С	3/3 чіткі бенди	0/2	Оптимальна температура
55 °С	3/3 чіткі бенди	0/2	Оптимальна температура
57 °С	3/3 чіткі бенди	0/2	Оптимальна температура
59 °С	3/3 чіткі бенди	0/2	Оптимальна температура
61 °С	3/3 неспецифічні фрагменти >100	0/2 наявні неспецифічні фрагменти >100	Висока температура
63 °С	3/3 неспецифічні фрагменти	0/2	Висока температура
65 °С	1/3	0/2	Висока температура

При цьому утворювалися специфічні бенди, відповідного розміру, що дало змогу підтвердити позитивний результат реакції. Специфічні фрагменти реакції припинили утворюватися за температури вище 65 °С. У процесі аналізу різних температур змінювалася лише чутливість реакції, специфічність завжди була максимальною, оскільки специфічних фрагментів потрібного розміру з негативним контролем не утворювалось.

Після оптимізації протоколу була обрана температура відпалу 55 °С та проведений наступний етап досліджень для визначення аналітичної чутливості протоколу.

Продукт ампліфікації у всіх досліджуваних штамів перестав утворюватися з ДНК, виділеної з бактеріальної суспензії розведеної до 0,5:100, що приблизно відповідає 2×10^5 КУО у 200 мкл суспензії. Неспецифічні фрагменти реакції не утворювались (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

Визначення меж чутливості класичної ПЛР

№	Ступінь розведення згідно із стандартом МакФарланда	Наявність продукту реакції
1	4	Наявний 370 п. н.
2	2	Наявний 370 п. н.
3	1	Наявний 370 п. н.
4	0,5	Наявний 370 п. н.
5	0,5:10	Наявний 370 п. н.
6	0,5:100	Відсутній
7	0,5:1000	Відсутній

Оптимальна температура відпалу для виявлення *Staph. aureus* методом ПЛР визначалася за допомогою позитивних та негативних контролів (табл. 3.16). Тестування температур відпалу проводили в діапазоні 51–59 °С для праймерів, специфічних до нис гена *Staph. aureus*. Оптимальну температуру відпалу визначено в межах від 53 °С до 59 °С.

Оптимізація протоколу ідентифікації *Staph. pseudintermedius* ускладнена відсутністю позитивного контролю у вигляді музейного штаму. Чотири стафілококи утворювали продукт реакції лише з праймером *Staphylococcus spp.* та були віднесені до групи “незолотисті стафілококи”. Всі ізоляти з групи “незолотистого стафілокока” утворювали специфічний продукт реакції з видоспецифічним для *Staph. pseudintermedius* праймером.

Таблиця 3.16

Результати оптимізації протоколу виявлення *Staphylococcus aureus* у реакції класичної ПЛР

Температура	Позитивний контроль	Негативний контроль	Результат оптимізації
51 °C	2/2 неспецифічні фрагменти	0/3 неспецифічні фрагменти	Низька
53 °C	2/2 чіткі бенди	0/3	Оптимальна
55 °C	2/2 чіткі бенди	0/3	Оптимальна
57 °C	2/2 чіткі бенди	0/3	Оптимальна
59 °C	2/2 чіткі бенди	0/3	Оптимальна
59 °C	2/2 чіткі бенди	0/3	Оптимальна

Продукт реакції утворився з ДНК, виділеної з п'яти розведень бактеріальної суспензії, що відповідають стандарту каламутності: 4, 2, 1, 0,5 та 0,5:10. Під час дослідження ДНК, отриманої з розведень 0,5:100 та 0,5:1000, продукт реакції не утворювався. Ступінь розведення та оптична щільність наведені в таблиці 3.17.

Таблиця 3.17

Аналітична чутливість протоколу виявлення *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* залежно від ступеня розведення бактеріальної суспензії

Ступінь розведення згідно із стандартом МакФарланда	<i>Staph. aureus</i> , OD 590	<i>Staph. pseudintermedius</i> , OD 590
4	0,150	0,145
2	0,067	0,064
1	0,032	0,027
0,5	0,023	0,018
0,5:10	0,016	0,012
0,5:100	0,007	0,004
0,5:1000	0	0

Протягом усього періоду дослідження за допомогою методу ПЛР було вивчено 148 зразків ДНК, виділених із чистих культур. Специфічний фрагмент розміром 370 п. н. було утворено в 145 реакціях. Результати ПЛР підтвердили результати мікробіологічної видової ідентифікації *Staphylococcus spp.*

Специфічний фрагмент розміром 359 п. н., що свідчить про наявність генетичного матеріалу *Staph. aureus*, було виявлено в 41 реакції. У 5 випадках ДНК було виділено від стафілококів, отриманих від клінічно здорових собак, у 4 – від хворих собак, у 2 – від хворих котів та у 30 – від хворих корів (рис. 3.12).

Специфічний фрагмент розміром 926 п. н., що свідчить про наявність генетичного матеріалу *Staph. pseudintermedius*, було виявлено у 46 випадках. 24 досліджених зразки ДНК було отримано з бактерій, відібраних від клінічно здорових собак, 18 – від хворих собак та 4 – від хворих котів.

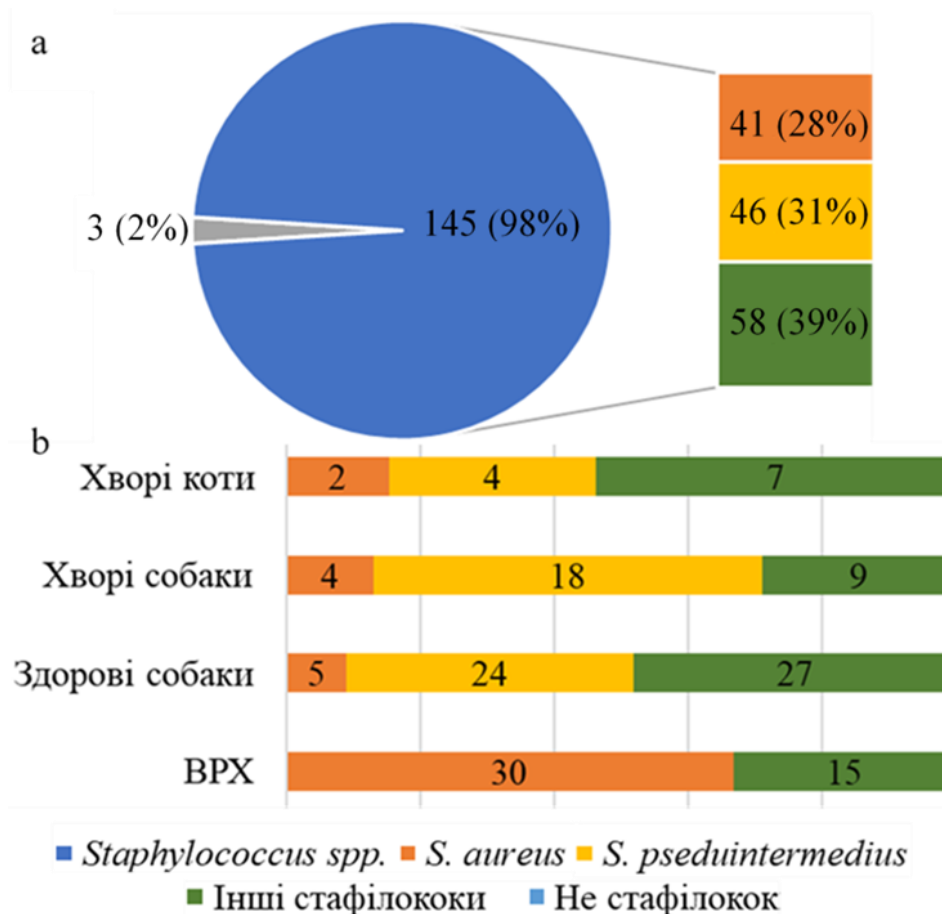


Рис. 3.12. Результати дослідження стафілококового ДНК методом класичної ПЛР

У результаті експериментальних досліджень було оптимізовано протокол для ідентифікації та диференціації коагулазопозитивних стафілококів з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Оптимізований протокол успішно застосували для ідентифікації польових ізолятів, підтвердивши його ефективність для діагностики стафілококових інфекцій. Результати мікробіологічних та молекулярно-генетичних досліджень узгоджуються між собою.

3.5.2. Секвенування гена термонуклеази *Staph. pseudintermedius* за Сенгером

Вивчення генетичних послідовностей продуктів ампліфікації дозволяє провести детальний аналіз видової приналежності стафілококів. Крім

виявлення специфічних ділянок генів за допомогою праймерів, можна також встановити ступінь спорідненості ампліфікованого фрагмента з іншими відомими послідовностями, що внесені до геномних баз даних. Це надає інструмент для більш глибокого аналізу геному стафілококів (рис. 3.13).

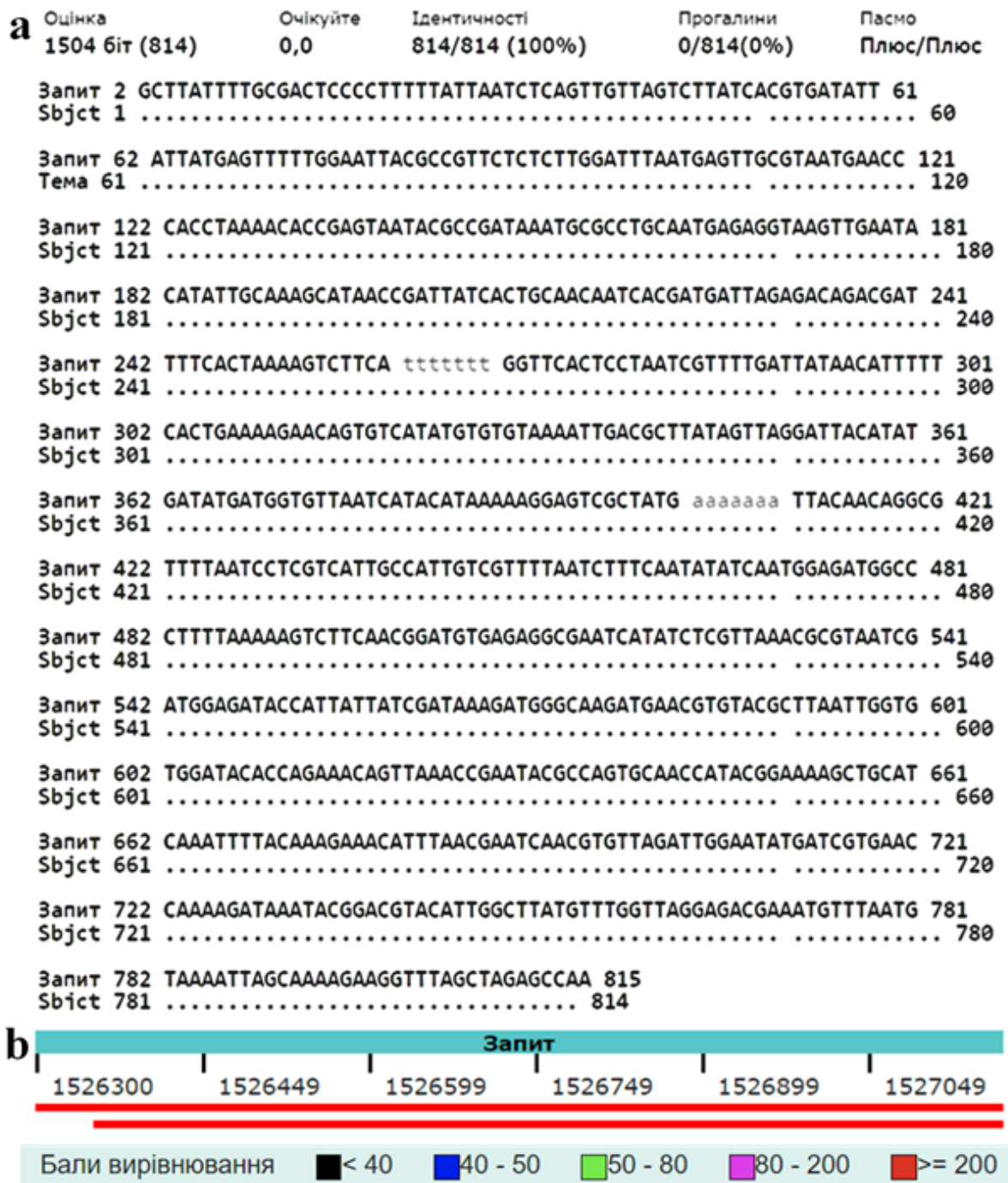


Рис. 3.13. Результати аналізу послідовності амплікону:
 а – порівняння двох послідовностей між собою; б – порівняння отриманих послідовностей з еталонним геномом

Після секвенування було отримано чотири послідовності, по дві для кожного ізоляту досліджуваного *Staph. pseudintermedius*. Пряма послідовність SP1 мала довжину 886 п. н., зворотна – 895 п. н., амплікона SP2 пряма послідовність мала довжину 899 п. н., а зворотна – 903 п. н. Через неспецифічні реакції на початку та в кінці зчитування послідовності були обрізані. Пряма послідовність SP1 скоротилася до 849 п. н., зворотна – до 865 п. н. Пряма і зворотна послідовності SP2 мали довжину 849 та 859 п. н. відповідно. В обох послідовностях були однонуклеотидні помилки зчитування які були виправлені після вирівнювання послідовностей.

На першому етапі аналізу отриманих даних секвенси, отримані з прямим та зворотним праймерами, були вирівняні та порівняні одна з одною та еталонним геномом NCIB GCF_016126715.1. Перша послідовність розміром 866 п. н. відповідає ділянці хромосомного геному 1526300 – 1527164 та збігається на 99,3 %. Друга послідовність розміром 814 п. н. відповідає ділянці хромосомного геному 1526351 – 1527163 та ідентична до неї на 99,2 %. (рис. 3.13).

Наступним етапом аналізу було порівняння отриманих нами послідовностей з усіма доступними геномами *Staph. pseudintermedius*, що внесені до бази даних NCBI BLAST.

Із 146 знайдених послідовностей, для аналізу ми обрали 6, в описі яких зазначено, що це послідовність гена стафілококової термонуклеази Чотири з них належали виду *Staph. pseudintermedius* OM320984.1, AB327164.1, KF836759.1 D27213, одна *Staph. intermedius* X67678.1 дві *Staph. delphini* KU056484.1, KU056483.1 та одна невизначеному виду *Staphylococcus spp.* KY056142.1.

Родини *Staph. intermedius* та *Staph. delphini* належать до групи SIG та мають генетичну близькість до *Staph. pseudintermedius*, тому вони були включені до аналізу. Наші послідовності мають високий рівень спорідненості з послідовностями *nuc* гена *Staph. pseudintermedius*, при цьому інші

представники групи SIG (*Staph. delphini* та *Staph. ursi*) містяться на інших гілках філогенетичного дерева (рис. 3.14).

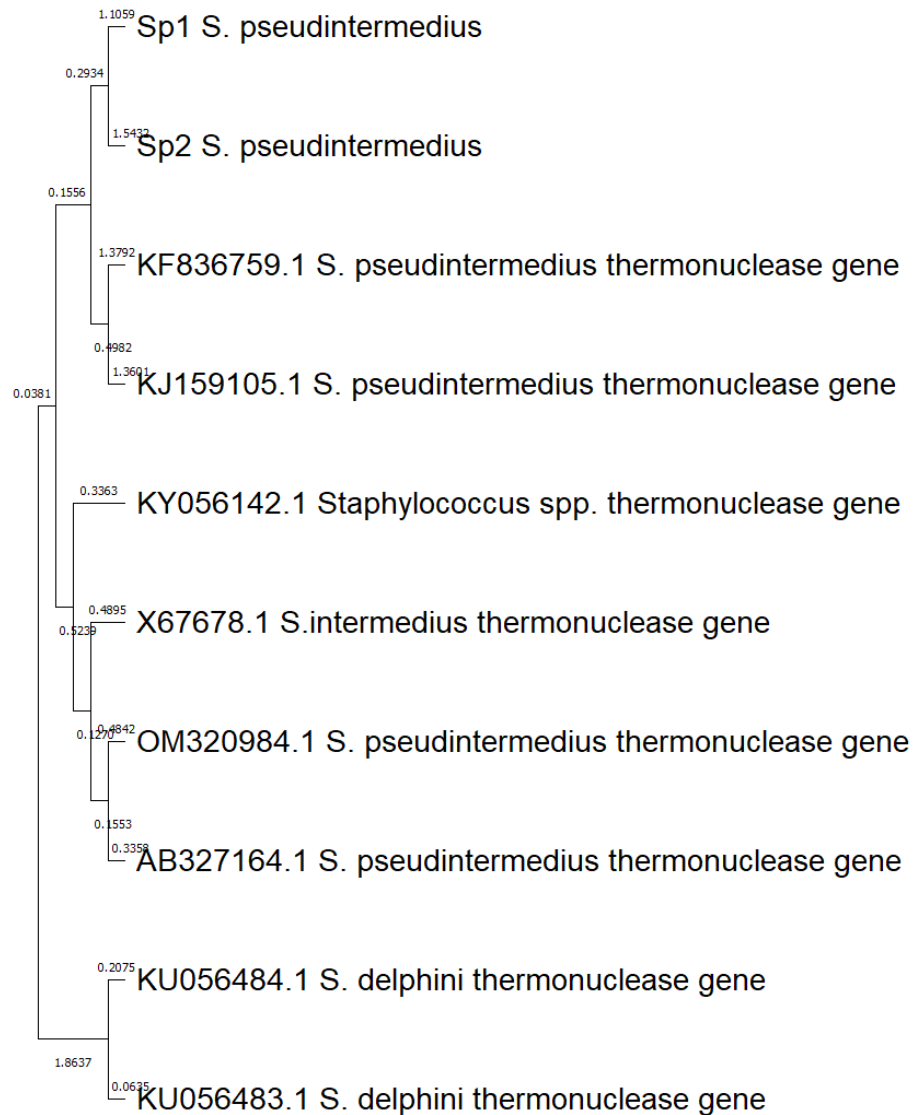


Рис. 3.14. Філогенетичне дерево порівняння консенсусних послідовностей гена нус (Sp1 та Sp2) з генами термонуклеази, представленими в базі даних NCBI BLAST

Результати перших двох етапів аналізу отриманої послідовності вказали на точність протоколів класичної ПЛР, описаної вище. На третьому етапі аналізу було проведено порівняння зчитувань прямого та зворотного праймерів між собою.

Порівняння послідовностей відбувалося з допомогою програмного забезпечення Clustal Omega. Обидві вирівняні послідовності були схожі між собою на 100 %. Схожість між прямими послідовностями обох ізолятів дорівнювала 99,4 %, а між зворотними – 99,6 % (таб. 3.18).

Таблиця 3.18

Попарне порівняння послідовностей отриманих у результаті секвенування за Сенгером

Назва	№1	№2	№3	№4	№5	№6
№1. Sp1 консенсусна послідовність	–	100	99,3	100	99,4	99,3
№2. Sp1 прямий праймер	100	–	99,5	100	99,4	99,5
№3. Sp1 зворотний праймер	99,3	99,5	–	99,5	99,4	99,7
№4. Sp2 консенсусна послідовність	100	100	99,5	–	99,8	99,6
№5. Sp2 прямий праймер	99,4	99,4	99,4	99,8	–	99,3
№6. Sp2 зворотний праймер	99,3	99,5	99,7	99,6	99,3	–

Загалом ідентичність послідовностей отриманих нами була в межах від 100 до 99,27 %. Найнижчу подібність мали між собою зворотна та пряма послідовності.

Високий відсоток ідентичності обох проаналізованих послідовностей щодо референсного геному (більше 99%) свідчить про їх належність до геному *Staphylococcus pseudintermedius* та дозволяє зробити висновок про коректність отриманих експериментальних даних секвенування. Послідовності отримані в результаті досліджень зареєстровані в геномі базі даних під номерами OR555770 та OR555771 (додаток Е).

3.5.3. Поширення гена стійкості до метициліну серед ізолятів *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*

Для остаточного підтвердження стійкості стафілококів до метициліну необхідно виявити ген альтернативного пеніцилінзв'язувального білка *mecA*. Спочатку було досліджено 28 ізолятів коагулазопозитивних стафілококів, виділених від хворих тварин, та 4 ізоляти від клінічно здорових тварин методом ПЛР у реальному часі. Ген *mecA* був виявлений лише в одного ізоляту

Staph. pseudintermedius, який раніше проявив фенотипову стійкість до оксациліну (рис. 3.15).

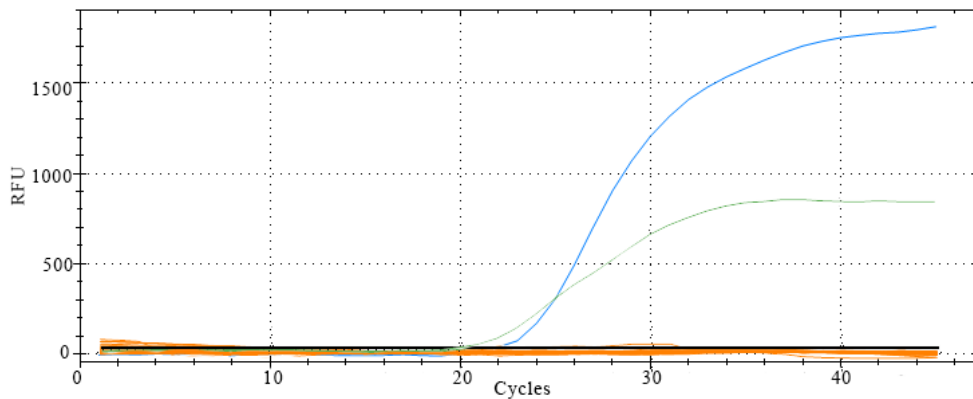


Рис. 3.15. Виявлення гена *mecA* в штамі MRSP:
 Результати RT-PCR тест: синя лінія – позитивний контроль;
 помаранчеві лінії – ізоляти з відсутнім геном; зелена лінія – штамі MRSP

Для підтвердження результатів було проведено повторне дослідження ізолятів методом класичної ПЛР. Це також підтвердило наявність гена *mecA* лише в одному ізоляті. Після цього класичну ПЛР було використано для аналізу ще 23 недосліджених КПС, виділених від клінічно здорових собак. У жодному з цих ізолятів ген *mecA* не був виявлений

Усі *Staph. aureus*, що були отримані від великої рогатої худоби та проявляли фенотипову стійкість до цефалексину, були досліджені з допомогою класичної полімеразної ланцюгової реакції з метою виявлення стійкості генів *mecA* до метициліну. Специфічний фрагмент, що відповідав розміру 533 пар основ, був виділений для всіх досліджуваних ізолятів, що підтвердило їх належність до групи MRSA.

Таким чином, за допомогою реакції ПЛР були виявлені *mecA* гени у всіх ізолятів *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*. Пара олігонуклеотидів, застосована в реакції класичної ПЛР вказує на наявність генів стійкості до метициліну у обох видів стафілококів.

3.5.4. Поширення генів позаклітинного адгезину серед ізолятів *Staph. pseudintermedius*

З метою визначення генетичних факторів, що можуть мати вплив на потенціал утворення біоплівки були дослідженні гени, що входять до локусу міжклітинної адгезії *ica* – *icaA* та *icaD*. Гени міжклітинної адгезії були виявлені у 29 (96,7 %) ізолятів *Staph. pseudintermedius*, *icaA* – у 22 (73,3 %) й *icaD* – у 27 (90 %) (рис. 3.16).

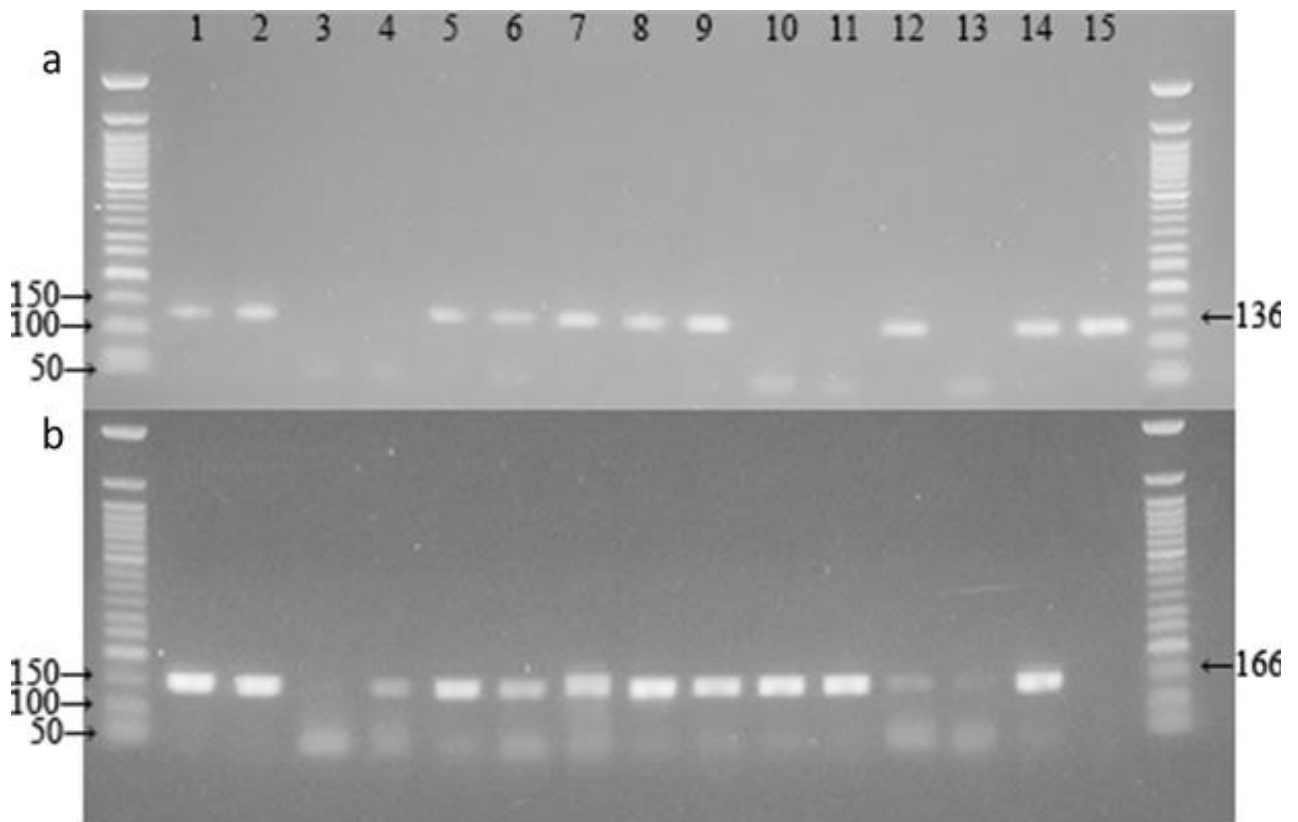


Рис. 3.16. Результати ПЛР виявлення генів міжклітинної адгезії: а – результати ПЛР виявлення гена *icaA* (136 п. н.); б – результати ПЛР виявлення гена *icaD* (166 п. н.); 1,2,5,6,7,8,9,12,14 генетичний профіль *icaA+icaD*; 3,4,10,11,13 – *icaD*; 15 – *icaA*

Генотиповий профіль *icaA+icaD* був присутній у 20 (66,7 %) досліджених бактерій, лише *icaA* – у 2 (6,7 %), лише *icaD* – у 7 (23,3 %) ізолятів. Отже, жодного гена позаклітинної адгезії не було виявлено лише в одного (3,3 %) ізоляту, отриманого від здорової собаки, також за дослідження

цього ізоляту було виявлено найнижчий показник оптичної щільності $0,224 \pm 0,015$ OD (рис. 3.17).

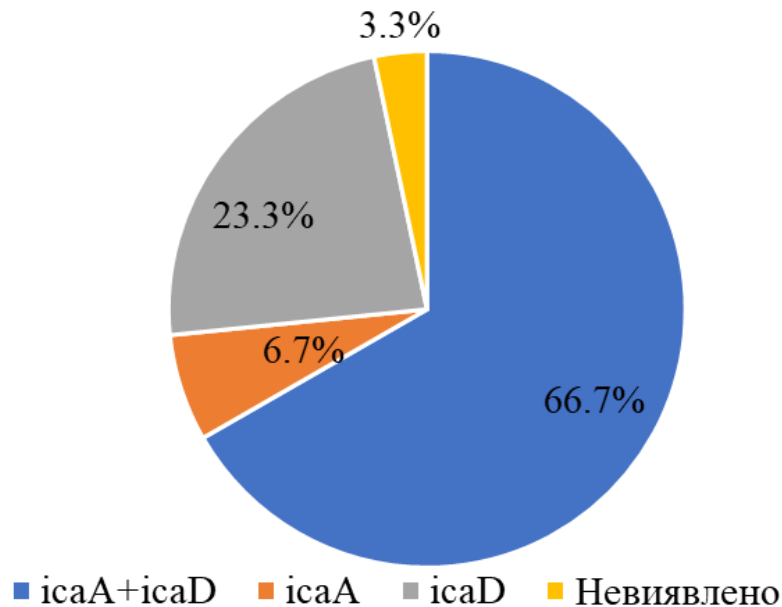


Рис. 3.17. Генотипові профілі локусу міжклітинної адгезії в досліджених ізолятах *Staph. pseudintermedius*

Не було виявлено відмінностей між групами з різними генотиповими профілями щодо наявності генів *icaA/D* та оптичною щільністю розчину в досліджених біоплівках ($\chi^2=3,68$, $p=0,298$).

3.5.5. Поширення генів ексfolіативного та лейкоцитарного токсину серед ізолятів *Staph. pseudintermedius*

З метою встановлення факторів патогенності *Staph. pseudintermedius* було досліджено наявність генів, пов'язаних з утворенням ексfolіативного токсину та лейкоцитарного токсину. Гени стафілококового лейкоцитарного токсину складаються з двох частин – *lukS* та *lukF*, тому було використано дві пари праймерів для дослідження (рис. 3.18).

Ген *lukS* було виявлено у 90 % ізолятів, а ген *lukF* – в 100 %. Ген ексfolіативного токсину *iet* також було виявлено у 100 % ізолятів. Ділянки гену *lukS* не було виявлено в трьох досліджених ізолятах, отриманих з ураження вуха кота, тіла хворої собаки та від здорової собаки.

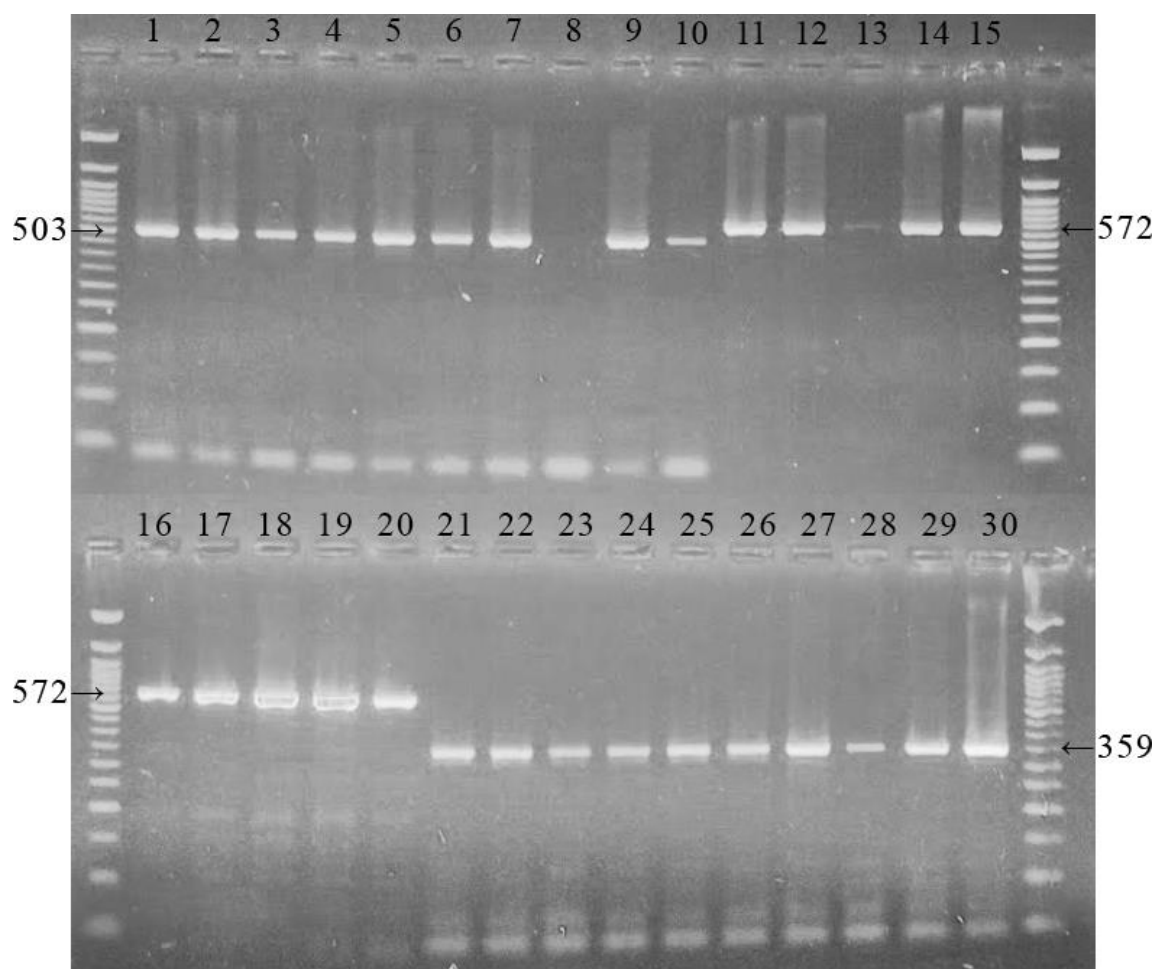


Рис. 3.18. Результати електрофоретичної детекції генів патогенності в класичній реакції ПЛР:

1–7, 9, 10 – фрагменти гена *lukS* розміром 503 п. н., 8 – немає фрагментів *lukS*; 11–20 – 572 п. н. фрагменти гена *lukF*;
12–30 – 359 п. н. фрагменти гена *siet*

Результати ПЛР-аналізу ізолятів стафілококів, виділених від собак та котів, продемонстрували значну варіабельність досліджуваних генів серед виділених штамів. Повний набір з 6 генів (*icaA*, *icaD*, *siet*, *LukF*, *LukS* та *mecA*) був виявлений лише в одному ізоляті *Staph. pseudintermedius* від собаки.

Більшість ізолятів (14 від собак та 2 від котів) містили 5 генів – *icaA*, *icaD*, *siet*, *LukF*, *LukS*, але не мали гена стійкості до метициліну *mecA*. Ще у 6 ізолятах (5 від собак та 1 від кота) були присутні 4 гени – *icaD*, *siet*, *LukF*, *LukS*. Решта ізолятів від собак демонстрували різні комбінації з 3–4 генів (рис. 3.19).

	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	С	К	К	К	К	
<i>icaA</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	
<i>icaD</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>siet</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>LukF</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>LukS</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>mecA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Рис. 3.19. Розподіл генів патогенності серед досліджених ізолятів *Staph. pseudintermedius*:

с – собаки; к – коти + – ген виявлено; - – ген не виявлено

Отже, досліджені гени, що кодують фактори патогенності які беруть участь у формуванні біоплівки та ухиленні від імунної відповіді присутні в більшості отриманих ізолятів. Загалом спостерігається не значна варіабельність у їхньому розподілі серед різних штамів *Staphylococcus pseudintermedius*, виділених від собак та котів. Статистично значущої різниці між джерелом ізоляції стафілококу та набором генів патогенності не виявлено.

Висновки до розділу 3

Staphylococcus spp. – поширений рід мікроорганізмів, що було ідентифіковано в 41,1 % матеріалах від хворих собак та котів. *Staph. pseudintermedius* є найпоширенішим видом стафілококів, що було виявлено у місці інфекції у 23,4 % у собак та 12,5 % котів. Його виявляють частіше ($p=0,002$), ніж *Staph. aureus*, що має вищий зоонозний потенціал. *Staph. pseudintermedius* ідентифікували в 38,5 % матеріалів із вуха, 33,0 % з носа, 22,0 % з ока, 15,4 % з шкіри та в 1 зразку молока суки. Немає статистично значущої різниці в поширеності *Staph. pseudintermedius* залежно від локалізації інфекції ($p=0,6$). Цей вид бактерій частіше за інші стафілококи колонізує носову порожнину собак ($p=0,014$). У свою чергу, *Staph. aureus* – найпоширеніший стафілокок, що викликає мастити в корів ($p=0,03$).

Серед досліджених ізолятів коагулазопозитивних стафілококів ($n=28$) від хворих тварин 18 (64,3 %) проявили резистентність або помірну чутливість принаймні до 1 антибіотика. *Staph. pseudintermedius* найчастіше проявляв стійкість до комбінації сульфаметоксазолу з триметопримом

(36,4 %), тоді як *Staph. aureus* до пеніциліну. Не було виявлено статистично значущої різниці стійкості ($p > 0,05$) між *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus* до досліджуваних антибіотиків.

Один ізолят *Staph. pseudintermedius* від клінічно здорової собаки проявив фенотипову стійкість до β -лактамів та мав найвищий рівень множинної стійкості.

Більшість (86,6 %) досліджених ізолятів *Staph. aureus* від хворих на мастит корів проявили стійкість принаймні до одного антибіотика. Найпоширенішою була стійкість до β -лактамних антибіотиків амоксициліну (60,0 % ізолятів) та цефалексину (23,3 %).

Гени стійкості до метициліну виявлено в семи ізолятів *Staph. aureus* отриманих від корів, що проявили фенотипову стійкість до цефалексину та одного ізоляту *Staph. pseudintermedius* від собак, що проявив стійкість до оксациліну.

З 22 досліджених ізолятів *Staph. pseudintermedius* від хворих тварин 10 (45,5 %) мали слабку, 7 (31,9 %) – помірну і 5 (22,7 %) – сильну здатність до утворення біоплівки. Для *Staph. aureus* ці показники становили відповідно 33,3 %, 50,0 % та 16,7 %. Статистично значущої різниці між здатністю утворювати біоплівку різними видами виявлено не було ($p = 0,933$).

У результаті експериментальних досліджень було успішно розроблено та апробовано протокол ПЛР. Це дало можливість застосувати молекулярно-генетичні методи як золотий стандарт у нашому дослідженні, та розробити схеми комбінованих мікробіологічних і молекулярно-генетичних досліджень.

Хромогенні середовища можуть бути використані в схемах мікробіологічної диференціації *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius*. Схема з використанням маніто-сольового агару і реакції на виявлення коагулази має чутливість 70,0 %. Натомість використання хромогенного середовища CHROMagar Orientation продемонструвало 100 % чутливість та 100 % специфічність, тобто забезпечило надійну диференціацію ізолятів *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*.

Проведено секвенування методом Сенгера двох зразків ДНК із використанням прямого і зворотного праймерів, націлених на ділянку гена стафілококової термонуклеази. Отримано дві гомологічні консенсусні послідовності розміром 866 і 814 п. н. Встановлено, що отримані послідовності мають високий рівень ідентичності (99,3 % та 99,3 %) з еталонним геномом.

Також була проведена ідентифікація чистих культур методом мас-спектрометрії. Результати дослідження підтвердили належність ізолятів до виду *Staph. pseudintermedius*, та повністю узгоджуються з результатами мікробіологічних і молекулярно-генетичних досліджень.

Гени міжклітинної адгезії *ica*, задіяні в утворенні біоплівки, були присутні в 96,7 % досліджуваних ізолятів *Staph. pseudintermedius*. Ген *icaA* реєструвався в 73,3 % штамів, *icaD* – у 90 %. Найчастіше траплявся генотип *icaA+icaD* (66,7 %). Також спостерігалася висока поширеність у ізолятах генів лейкотоксину *lukS* (90 %) та *lukF* (100 %), асоційованих із патогенним потенціалом. Водночас не виявлено зв'язку між генотипом за локусом *ica* та здатністю до утворення біоплівки ($p=0,298$).

Отже, більшість проаналізованих ізолятів стафілококів містили генетичні детермінанти факторів вірулентності та здатності до утворення біоплівки. Повний набір генів обраних для дослідження спостерігався лише в одному випадку.

Результати досліджень, представлені у цьому розділі, опубліковані в працях [111, 200–206].

РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Staphylococcus spp. – один з найпоширеніших родів бактерій, що в нормі колонізують організм різних видів тварин та людини. Серед багатьох видів стафілококів, найбільшу небезпеку становлять коагулазопозитивні штами, зокрема *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus pseudintermedius*, здатні викликати різноманітні інфекції. Різні види коагулазопозитивних стафілококів асоційовані переважно з певними видами тварин та людиною, проте ці мікроорганізми мають значний потенціал до міжвидової передачі. Стафілококи здатні колонізувати навколишнє середовище та часто є збудниками нозокоміальних інфекцій [41].

В Україні поширення КПС досліджено менше, ніж у світі. Зокрема, в останні роки було захищено дві дисертаційні роботи українських науковців присвячені цій проблематиці. Вішован Ю.Ю. [207] зосередився на вивченні поширення роду стафілококів серед різних видів тварин та людей, Козицька Т. Г. [208] приділила увагу вивченню поширеності *Staph. aureus* серед сільськогосподарських тварин та продуктів тваринного походження. Це, безумовно, важливі аспекти, проте вони не охоплюють усієї широти проблематики, пов'язаної з коагулазопозитивними стафілококами. Залишається низка відкритих питань щодо поширення стафілококів в Україні порівняно з рештою світу.

Процеси урбанізації призводять до зменшення безпосередніх контактів населення з сільськогосподарськими тваринами. Водночас, у містах люди частіше взаємодіють з домашніми тваринами, зокрема котами та собаками. Значна кількість наукових публікацій, присвячених вивченню колонізації бактеріями виду *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus* носової порожнини собак, проаналізованих у недавньому систематичному огляді Abdullahi et al. (2022), свідчить про великий інтерес дослідників до цієї проблематики у світовому масштабі. Оскільки найбільшу небезпеку становлять саме коагулазопозитивні види стафілококів, метою нашого дослідження було

вивчення поширення двох найрозповсюдженіших видів – *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*.

Згідно з даними систематичного огляду літературних джерел, середній показник поширення *Staph. pseudintermedius* серед популяції собак у світі становить 18,3 %. Для *Staph. aureus* цей показник дещо нижчий – 10,9 %. Дослідження, проведені в межах Європейського регіону, демонструють меншу поширеність *Staph. aureus* на рівні 7,3 %, тоді як носійство *Staph. pseudintermedius* відповідає загальносвітовим даним – 18,2 % собак [110].

Результати нашого дослідження вказують на вищу поширеність колонізації носової порожнини збудником *Staph. pseudintermedius* (24,1 %) та нижчу *Staph. aureus* (5,2 %) серед популяції собак Київської області. Проте наша вибірка була локальною і невеликою за обсягом [202].

Аналіз окремих досліджень свідчить про значну варіабельність даних щодо поширеності стафілококів. Деякі автори повідомляють про істотно вищий рівень носійства *Staph. pseudintermedius*, ніж середні значення за результатами мета-аналізу.

Дослідження науковців з Литви показали, що серед обстежених ними собак *Staph. pseudintermedius* був виявлений майже у половини тварин – у 45,9 %. Слід зазначити, що автори вивчали одночасно матеріали відібрані з носа та анального отвору [209]. Серед собак Іспанії *Staph. pseudintermedius* також має значне поширення 32,4 % та трапляється частіше, ніж *Staph. aureus* 5,9 % [110]. Подібну тенденцію виявили й дослідники з Німеччини, за результатами яких поширеність *Staph. pseudintermedius* серед собак становила 37,5 %, тоді як *Staph. aureus* був присутній лише у 8,9 % тварин [101]. Інша група авторів з цієї країни виявили вище за середнє поширення носійства *Staph. aureus* у 20 % досліджених собак [210]. Натомість, у британському дослідженні повідомляється, що *Staph. pseudintermedius* має нижчий рівень (11 %) поширення, ніж у повідомленнях вищезгаданих авторів, тоді як поширеність *Staph. aureus* має схожий рівень (7,5 %) [211].

Через високу поширеність у клінічно здорових тварин *Staph. pseudintermedius* асоціюється з найбільшим ризиком виникнення опортуністичних інфекцій у собак. Натомість інфекції, спричинені *Staph. aureus*, трапляються значно рідше. Цю тенденцію підтверджують дані дослідницьких груп з різних європейських країн. Зокрема, *Staph. pseudintermedius* є провідним збудником стафілококових захворювань у собак в Італії (36,0 %), Англії (56,0 %), Чехії (72,7 %) та Німеччині (20,5 %), тоді як частка *Staph. aureus* серед ізолятів набагато менша – 5,1 %, 9,0 %, 1,3 % та 2 % відповідно [212–215].

Інфекції, спричинені стафілококами у собак, можуть мати різну локалізацію та рівень ураження систем і органів [111].

Найвища кількість зразків від хворих тварин, що надійшли до лабораторії, були відібрані з різних дерматологічних уражень та ранових інфекцій шкіри. З цієї ділянки було ізольовано переважну кількість бактерій виду *Staph. aureus* 83,3 % та *Staph. pseudintermedius* 54,4 % [202]. Стафілококи є одними з провідних збудників гнійно-запальних захворювань шкіри у собак. В дослідженні українських авторів матеріалів, відібраних за піодермії собак, *Staph. pseudintermedius* було виділено у 85,8 % випадків моноінфекції, в інших тварин збудником був *Staph. aureus* [216]. За даними Ludwig et al. (2016), 47,0 % дерматологічних хвороб спричинені *Staph. pseudintermedius* і лише 3,8 % – *Staph. aureus* [217].

Staph. pseudintermedius – найпоширеніший стафілокок, що було виявлено в інфекційних ураженнях, локалізованих в ділянці вуха та ока. Цікаво, що зовнішній слуховий прохід, в основному, колонізують коагулазонегативні стафілококи, які не виявлені як збудники інфекцій. Колонізації *Staph. pseudintermedius* в нашому дослідженні виявлено лише у 7,6 % собак [202].

Інші автори також відзначають домінування стафілококів в інфекціях вуха та ока. *Staph. pseudintermedius* є найпоширенішим стафілококом (80,2 %), який виявляють у 33,0 % хворих собак. Ще 9,4 % стафілококових ізолятів

ідентифікують як вид *Staph. aureus* [218, 219]. В Україні повідомляють про менший рівень поширення бактерій виду *Staph. pseudintermedius* як збудника отитів, його ідентифіковано у 8,4 % собак та взагалі не виявлено у котів [220]. При ускладненні зовнішніх отитів, *Staph. pseudintermedius* може викликати інфекції середнього вуха [221].

За результатами нашого дослідження *Staph. pseudintermedius* та коагулазонегативні стафілококи ідентифіковані за уражень носа у хворих собак та котів приблизно з однаковою частотою. За даними літератури, *Staph. pseudintermedius* спричиняє близько третини інфекцій верхніх дихальних шляхів у собак [222].

Загалом, в Україні від хворих собак та котів *Staph. pseudintermedius* було ізольовано з 20,6 % відібраного матеріалу, тоді як *Staph. aureus* ізольовано 5,6 % тварин. Загальний рівень поширення стафілококів серед усіх хворих собак (23,4 %) нижчий за середнє поширення (42,1 %) у наведених раніше публікаціях. Поширення *Staph. aureus* (5,2 %) близьке до середнього показника даних з літератури (4,5 %) [202].

Варто зазначити, що від хворих тварин досліджувалися лише чисті культури стафілококів, отримані з лабораторії. Тому невідомо, чи стафілококи були саме збудниками інфекцій, чи виступали вторинним агентом. Для подальшого дослідження необхідно розширити методологію та провести більш широкий моніторинг поширення стафілококів. Ми не виявили вид *Staph. coagulans* серед досліджених ізолятів від клінічно здорових та хворих тварин [223]. Проте методологія нашого дослідження дозволяє виявити коагулазопозитивні стафілококи, що могли бути негативними в обох ПЛР реакціях (на виявлення *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius*).

Незважаючи на те, що *Staph. pseudintermedius* найчастіше асоціюється з інфекціями собак, він також відіграє важливу роль у різних захворюваннях котів. У подальшому важливо дослідити поширеність колонізації котів цим мікроорганізмом. Необхідно більше досліджень, щоб з'ясувати природу

інфекцій котів, спричинених *Staph. pseudintermedius* – чи пов'язані вони з ендогенними ізолятами, чи мають екзогенне походження [224].

Що стосується *Staph. aureus*, то актуальним завданням є вивчення філогенетичної характеристики штамів, що викликають інфекції у тварин. Загалом відомо, що ці стафілококи переважно мають людське походження, проте конкретні клональні лінії, поширені в Україні, потребують встановлення. Такі дослідження дозволять краще зрозуміти епідеміологію стафілококових інфекцій тварин та ризики міжвидової передачі цих патогенів.

Крім вивчення видового складу мікрофлори, що спричиняє інфекції у тварин, для вибору оптимальних лікувальних заходів важливо визначати стійкість збудників до антибіотиків. Оскільки найвищі ризики пов'язані з набуттям стійкості до β -лактамних антибіотиків [225], ми дослідили поширення метицилінстійких штамів серед собак та котів в Україні. MRSA колонізує носову порожнину від 0,13 до 47,7 % собак у всьому світі, MRSP від 0,85 до 51,1 % [110]. Ми не виявили серед досліджених проб від котів та собак MRSA штамів. В однієї (1,7 %), тварини в носовій порожнині виявлено стійкий до метициліну, *Staph. pseudintermedius*.

Ми очікували побачити значно вищий рівень поширення MRSP та MRSA ізолятів серед тварин України. В межах нашого дослідження матеріали відбирали від клінічно здорових тварин, які могли проходити лікування в минулому. Проте ми не вивчали анамнез і не встановлювали історію застосованих до них препаратів.

Згідно з мета-аналізом, рівень стійкості до оксациліну, який використовується як скринінговий антибіотик при дослідженні *Staph. pseudintermedius*, становить 10,3 % (CI 95 % 6,8–14,3 %), а стійкість *Staph. aureus* значно вища – 32,8 % (CI 95 % 0,9–81,5 %) [114,217,225–228]. В українському дослідженні з 25 зразків відібраних від тварин-компаньонів в місті Києві, КПС було виявлено в 8 %. Обидва ізоляти мали стійкість до пеніциліну та один до оксациліну, проте автор не знайшов *tesA* гена [18].

Дані, отримані в нашому дослідженні ізолятів стафілококів від хворих собак та котів кардинально відрізняються. У хворих тварин не було виявлено штамів, що проявили подібний рівень стійкості. Ізоляти досліджені у двох незалежних методах – виявленні стійкості до скринінгових препаратів дискодифузійним методом та пошуку *mecA* генів. Дані обох досліджень узгоджуються [202].

Проте використання різних ветеринарних препаратів не пояснює відсутність MRSA штамів. Такі бактерії у тварин найчастіше мають людське походження [229]. В Україні проведена низка досліджень, яка вказує на важливу роль золотистого стафілокока в інфекціях людей та поширення MRSA штамів за носової колонізації [230–233]. Щоб ширше охарактеризувати цю проблему необхідні додаткові дослідження, які будуть визначати одночасне вивчення поширення стафілококів у людей та тварин.

З усіх вивчених нами ізолятів *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus* найчастіше вони проявляли стійкість до комбінації препаратів триметоприму та сульфаметоксазолу (50,0 %), що застосовують у ветеринарній медицині. Згідно з мета-аналізом, стійкість *Staph. pseudintermedius* до цих препаратів у Європі відзначається на рівні 30 % (CI 95 % 17,1–42,1 %), а *Staph. aureus* 14,9 % (CI 95 % 3,4–32,5) [114, 215, 218, 222, 226–228].

Найвищий рівень стійкості серед ізолятів *Staph. pseudintermedius* у Європі виявлена до еритроміцину – 52,9 % (CI 95 % 9,9–93,3 %), тетрацикліну – 43,8 % (CI 95 % 34,9–53,0 %) та пеніциліну – 34,8 % (CI 95 % 10,1–65,1 %) [114, 217, 218, 222, 226, 235]. В наших дослідженнях виявлено 18,2 % стійких ізолятів пеніциліну та 9,1 % ізолятів, що мали помірну чутливість до тетрацикліну. Це нижче, ніж довірчий інтервал, розрахований у мета-аналізі. До еритроміцину було виявлено 18,2 % стійких штамів, цей показник перебуває в межах довірчого інтервалу, проте нижче за середній показник.

Натомість *Staph. aureus* найчастіше проявляє стійкість до пеніциліну 66,9 % (CI 95 % 57,3–75,9 %) та тетрацикліну 55,0 % (CI 95 % 6,1–97,7 %) [217, 218, 226, 228, 229]. Ми також відзначали високий рівень стійкості до

пеніциліну (50 %), що відповідає даним мета-аналізу. Якщо говорити про тетрациклін, то всі ізоляти від собак і котів були чутливі до цього препарату, що кардинально відрізняється від даних літератури.

Найнижчий рівень стійкості в мета-аналізу до фторхінолонових антибіотиків III покоління прадофлоксацину 7,3 % (СІ 95 % 6,8–14,3 %) та марбофлоксацину 4,9 % (СІ 95 % 6,8–14,3 %). При цьому стійкість до фторхінолону II покоління енрофлоксацину, проявили 18,0 % (СІ 95 % 10,1–65,1 %) [114, 215, 217, 218, 226, 227, 235].

Проведений мета-аналіз вказує на значну варіабельність рівнів резистентності в різних країнах Європи (середня I₂>70 %). Це свідчить про істотний вплив особливостей конкретного регіону на формування тенденцій антибіотикорезистентності.

Відповідно відмінність власних результатів від середніх показників, за даними мета-аналізу, є закономірною та вкладається в загальну картину значної варіабельності рівнів стійкості між різними країнами Європи.

Staph. aureus – єдиний представник групи КПС, що викликав мастити у корів, та зустрічається у 33,3 % хворих на мастит корів. Цей вид бактерій зустрічався частіше, ніж *E. coli*, *Str. agalactiae* та *Str. dysgalactiae* [201]. У дослідженнях з інших країн частка *Staph. aureus* серед бактеріальних ізолятів становила: 20,6 % в Румунії, 21,1 % у Фінляндії, 27,8 % у Швеції, 19,1 % та 20,7 % у Данії [236–239]. У спільному дослідженні 8 європейських країн частка *Staph. aureus* становила 30,8 % [240].

Отже, поширення *Staph. aureus* серед досліджених нами тварин перевищує середній європейський показник на третину. Водночас є й дані про меншу поширеність цього патогену, наприклад 8,0 % у Франції [241]. У дослідженні в Україні було виявлено високий рівень стійкості *Staph. aureus* до цефокситину – 47,1 % [242]. Ми виявили MRSA ізоляти у 14,3 % досліджених корів [204].

Ці дані викликають значне занепокоєння, оскільки поширення стійкості в Україні значно перевищує середній світовий показник. Згідно з мета-

аналізом, MRSA ізоляти виявляють в 1,2 % досліджених зразків молока в Європі та 4,3 % загалом у світі. Стійкість до метициліну проявляють 13,2 % ізолятів *Staph. aureus* у світі та 8,3 % в Європі [243].

Представники групи КПС мають ряд схожих біохімічних та культуральних властивостей, що ускладнює їх ідентифікацію та диференціацію мікробіологічними методами. Розв'язання цієї проблеми потребує комбінування різних методів та підходів [244].

Оскільки більшість КПС ферментують маніт, маніто-сольовий агар використовується як основне селективне середовище для вивчення поширення стафілококів серед клінічно здорових тварин. Реакція коагуляції плазми кроля може допомогти диференціювати більш патогенні та менш патогенні ізоляти. Найбільш складним є етап видової диференціації стафілококів. Через велику кількість видів та клональну різноманітність між окремими штамми необхідний великий набір реагентів для постановки ферментативних реакцій.

Для диференціації *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* можна виміряти їх рівень стійкості до антибіотика поліміксин Б. Також бактерії *Staph. intermedius* та *Staph. pseudintermedius* не утворюють ацетоїн, на відміну від *Staph. aureus*. Проте за постановки реакції Фогес Проскауера 10 % досліджених *Staph. pseudintermedius* проявляли слабо позитивну реакцію [205]. Інші автори також визначали варіабельність цієї реакції, так у дослідженні Rusenova N.V. та інших було виявлено 12 % позитивно реагуючих культур *Staph. pseudintermedius* [74]. Sasaki T. та інші відзначили, що при постановці реакції Фогес Проскаура, продукцію ацетоїну виявлено у 66,3 % штамів. Але при використанні комерційного набору ID 32 Staph позитивну реакцію на ацетоїн виявляли лише у 10,0 % ізолятів [73].

У наших дослідженнях ми не використовували біохімічні реакції, спрямовані на виявлення ферментації мальтози та анаеробного розщеплення маніту. Ці реакції також можуть допомогти в диференціації *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius*.

З метою діагностики ветеринарно значущих патогенів ми дослідили можливість використання мікрокультуральної системи Neonatal FAST well D-ONE, щодо ідентифікації та диференціації *Staph. pseudintermedius* від золотистого стафілокока. Ця система містить 20 лунок для ідентифікації бактерій та 9 – для визначення стійкості до антибіотиків. Одна лунка показує присутність *Staphylococcus spp.*, і була позитивною для *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*. Ще 2 лунки призначені для виявлення *Staph. aureus*, не проявили позитивної реакції при внесенні *Staph. pseudintermedius*. Лунки, спрямовані на виявлення інших мікроорганізмів, були негативними. Позитивні реакції відрізнялися між двома штамами *Staph. pseudintermedius*. Ще одним цікавим нюансом цієї панелі є наявність лунки для виявлення метицилінстійкого стафілокока. Ця реакція була позитивною для MRSP ізоляту стафілококу. Для тесту набору був використаний ізолят, що мав найширший профіль стійкості. Він виявив стійкість до антибіотиків цефокситин, колістин, цефазолін, кліндаміцин, амікацин, ампіцилін та гентаміцин. Стійкість цього ізоляту до антибіотиків гентаміцину та ампіциліну була протестована нами окремо методом дифузії. Також було перевірено стійкість до пеніциліну, що входить до однієї групи з ампіциліном. Концентрація канаміцину збігається з концентрацією для виявлення чутливих штамів згідно зі стандартом CLSI. Зони затримки росту для антибіотиків цефокситин та амікацин відсутні в стандартах. Невизначена ситуація для цефалоспоринового ряду – цефазоліну. Протестований штам був метицилінчутливим, отже на нього впливають антибіотики цефалоспоринового ряду. Стандартами EUCAST та CLSI не передбачається визначення стійкості до цього антибіотику бактеріями виду *Staph. pseudintermedius*. Потрібно додатково вивчати причини, через які була визначена стійкість до цього антибіотику [244].

Отже, ця біохімічна панель може допомогти в ідентифікації *Staph. aureus* у матеріалах від тварин, *Staph. pseudintermedius* буде виявлено

лише на рівні родини. Але, хоча набір зручний для швидкої діагностики, його варто адаптувати для ветеринарних лабораторій.

Важливим завданням дослідження було вивчення можливості використання середовищ CHROMagar Orientation і CHROMagar *Staphylococcus*, для виділення та ідентифікації стафілококів. CHROMagar Orientation складаються з двох компонентів – поживного агару та хромогенного субстрату, CHROMagar *Staphylococcus* містить додатково 3 % солі для пригнічення росту інших мікроорганізмів [202].

Згідно з нашими дослідженням, колонії *Staph. pseudintermedius* набувають рожевого забарвлення за культивування на середовищі CHROMagar Orientation. Нам, напевно, не відомо, внаслідок яких взаємодій яких ферментів з субстратом колонії *Staph. pseudintermedius* набувають відповідного забарвлення. Ми припускаємо, що справа в субстраті, який взаємодіє із ферментом β -галактозидазою. Цей фермент присутній у *Staph. pseudintermedius*, але не в *Staph. aureus* [245]. Взаємодія хромогенного ферменту alizarin-b-D-galactoside з бактеріями, які продукують β -галактозидазу, в своєму дослідженні описав James A.L. та інші [246]. Він не вивчав бактерії родини *Staphylococcus spp.*, проте позитивні результати використання цього хромогенного субстрату відповідають дослідженням з використанням інших біохімічних реакцій.

Колонії *E. coli* набувають забарвлення від рожевого до бузкового, що описано інструкцією середовища, і відповідають забарвленню субстрату, описаного в літературі. Також згідно з інструкцією коагулазонегативний стафілокок *Staph. saprofiticus* має рожеве забарвлення колоній на поверхні середовища, він також продукує фермент β -галактозидазу. На середовищі CHROMagar Orientation *Staph. aureus* набуває золотистого забарвлення, внаслідок природних пігментів.

На середовищі CHROMagar *Staphylococcus* колонії *Staph. aureus* набувають рожевого кольору внаслідок взаємодії з субстратом, націленим на

виявлення специфічної фосфатази. Колонії *Staph. pseudintermedius* мають сіро-блакитне забарвлення.

Тому хромогенне середовище дозволяє диференціювати *Staph. pseudintermedius* від *Staph. aureus* за культуральними властивостями росту. Це важливо, оскільки *Staph. pseudintermedius* є більш важливим у контексті ветеринарної медицини.

З метою визначення чутливості та специфічності середовища CHROMagar Orientation для диференціації *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus* ми порівняли схему виявлення КПС, що включають маніто-сольовий агар, ДНКазу та коагулази, та модифіковану схему із заміною маніто-сольового агару на CHROMagar Orientation. Результати ідентифікації за допомогою мікробіологічних методів було порівняно із “золотим стандартом” – реакцією ПЛР. Оскільки коагулазонегативні стафілококи також мають велику різноманітність ферментативних реакцій, що можуть ускладнити процеси ідентифікації КПС, в експеримент також було додано 14 випадкових культур КНС.

Використання хромогенного середовища в поєднанні з реакцією коагуляції плазми кроля призводить до підвищення специфічності виявлення *Staph. pseudintermedius* з 65 % до 100 %, тоді як специфічність середовища MSA змінювалася з 55 % до 70 %. Тобто, достатньо виключення належності польових ізолятів стафілококів до групи КНС після первинного посіву, щоб досить точно диференціювати *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*. Слід зазначити, що наявність інших представників групи SIG у досліджуваній вибірці могла б призвести до зменшення специфічності як маніто-сольового, так і хромогенного середовища в контексті ідентифікації *Staph. pseudintermedius* [202].

Слід звернути увагу на те, що це експериментальне дослідження має ряд важливих обмежень: використані лише чисті культури одного роду стафілококів; коагулазонегативні стафілококи підібрані довільним чином та не відповідають видовій структурі цих збудників, що зустрічаються у тварин-

компаньйонів. Хоча вирішення проблеми диференціації грампозитивних мікроорганізмів від грамнегативних бактерій легко вирішується за допомогою мікроскопії, не відомо чи є якісь інші відмінності між однаково забарвленими колоніями стафілококів та інших бактерій. Загалом результати досліджень хромогенних середовищ у нашому дослідженні мають розглядатися як перший крок до вивчення використання цих комерційних хромогенних середовищ, тоді як схеми з використанням CHROMagar *Staphylococcus* мають високу чутливість 95,5 %–98,5 % для виявлення *Staph. aureus*. Ці значення перевищують чутливість нехромогенних середовищ [247, 248]. Хоча хромогенні середовища мають високу специфічність, визначення лише за морфологічними особливостями колоній недостатнє для ідентифікації *Staph. aureus* у клінічному матеріалі. Проте подібна ситуація спостерігається і при ідентифікації з використанням маніто-сольового агару [249].

Впровадження до лабораторної практики нових методів потребує розробки та оптимізації протоколів дослідження. Після вибору праймерів, розроблених для ідентифікації та диференціації стафілококів, були проведені дослідження для визначення оптимальної температури відпалу та аналітична чутливість реакції [250].

У нас був відсутній позитивний контроль *Staph. pseudintermedius* та наявні музейні штами інших коків, важливо було розробити та оптимізувати протокол ПЛР. Спочатку був оптимізований родоспецифічний протокол, оскільки ми мали для цього всі необхідні позитивні та негативні контролю [203, 251].

Наступним етапом було оптимізувати та апробувати протокол диференціації коагулазопозитивних стафілококів з використанням молекулярно-генетичних методів. Для досліду нам були доступні музейні штами *Staph. aureus* та *Staph. epidermidis*.

Оскільки автори праймерів розробили їх для постановки мультиплексних ПЛР, оптимальні умови реакції мають бути однакові для двох пар олігонуклеотидів. Тому, спочатку був оптимізований протокол виявлення

Staph. aureus з використанням музейних культур. Після цього, для виявлення *Staph. pseudintermedius*, ми відібрали матеріали у групи клінічно здорових собак та ідентифікували стафілококи на рівні родини, а коагулазопозитивні ізоляти дослідили з використанням протоколу ідентифікації *Staph. aureus*. Зразки, що не утворили позитивної реакції, були віднесені до групи “незолотистих стафілококів”. Надалі їх досліджували з праймерами для виявлення *Staph. pseudintermedius* і при позитивній реакції відносили до цього виду. З метою обґрунтування можливості використання отриманих нами культур як позитивних контролів ми застосували два незалежні методи досліджень у зовнішніх лабораторіях.

Дві бактеріальні культури були надіслані до Експертного центру діагностики та лабораторного супроводу “Біолайтс” для остаточного визначення виду. Використовуючи метод MALDI-TOF, було ідентифіковано, що чисті культури належать до виду *Staph. pseudintermedius*. Це точний мікробіологічний метод діагностики, що може бути використаний як золотий стандарт [252].

Додатково було проведено секвенування специфічної для *Staph. pseudintermedius* ділянки гена стафілококової термонуклеази. Ампліфікат було направлено до компанії Exlogen, де провели секвенування за Сенгреом. Для зменшення можливості помилок у зчитуванні секвенування були проведені одночасно з прямим та зворотним праймером. Отримані послідовності зареєстровані в базі даних NCBI під номерами OR555770 та OR555771. Аналіз послідовностей вказав на високу специфічність отриманої ДНК до інших геномів *Staph. pseudintermedius* внесених до бази даних.

У результаті ми отримали позитивні культури *Staph. pseudintermedius*, які були використані в інших етапах дослідження. Оптимізована реакція ПЛР була застосована як золотий стандарт для остаточного підтвердження мікробіологічних схем.

Останнім етапом дослідження було вивчення патогенних властивостей стафілококових ізолятів. Біоплівки – це важливий фактор стафілококової

патогенності. Для визначення потенціалу утворення цих структур був використаний метод фарбування генціановим фіолетовим. Залежно від щільності утвореної структури, бактерії були розділені на ті, що не мають потенціалу біоплівкоутворення ізолятів, мають слабкий, помірний та сильний потенціал до утворення біоплівки.

Підходи до визначення щільності біоплівки за допомогою фарбування базуються на одних і тих самих принципах. Проте хід постановки реакції відрізняється залежно від обраного методу дослідження. Для вирощування бактеріальних біоплівок можна використовувати чашки Петрі [17, 253] або мікротитраційні планшети [254]. Для елюції барвника із структури біоплівки різні дослідники використовують спирт [17], оцтову кислоту [254] або спиртово-ацетонову суміш [255].

Також існують відмінності в інтерпретації результатів дослідження біоплівки. Існує два методи, які використовують ранговий поділ мікроорганізмів на слабкі, помірні та сильні продуценти біоплівки. Проте одні підходи використовують сталі показники OD для рангової класифікації щільності [17], тоді як інші підходи застосовують відносні критерії в залежності від оптичних показників негативного контролю [254].

Окрім того, існують відмінності в використанні довжини хвилі світла, наприклад, можуть бути застосовані 492 нм [256], 570 [198] та 590 нм [182]. Якщо говорити про методи з використанням чашок Петрі, то колориметри дають можливість вручну встановлювати довжину хвилі, тоді як апарати для постановки ІФА обмежені певним набором світлових фільтрів.

Загалом дані про потенціал до утворення біоплівки бактеріями *Staph. pseudintermedius* у різних авторів відрізняються. Одні автори повідомляють про велику кількість (75,0 %) слабких продуцентів біоплівки [257]. Інші автори, навпаки, виявляли культури із сильним потенціалом до утворення біоплівки 28,8 % – 41,5 % [198, 254, 257, 258]. За даними Wang X. та інші, ізоляти від хворих тварин утворювали біоплівку вищої щільності, ніж ізоляти від клінічно здорових тварин [259]. У результаті наших даних не було

виявлено статистично значущої різниці в щільності утвореної біоплівки та походженні ізолятів від хворих або клінічно здорових тварин.

Нами було виявлено, що 23,4 % ізолятів *Staph. aureus* є сильними продуцентами біоплівки, а 40,0 % – слабкими [200]. Дані про біоплівкоутворювальні властивості *Staph. aureus*, отримані від собак, схожі між різними авторами. Згідно з різними дослідженнями, понад 50,0 % штамів проявляють слабкі біоплівкоутворювальні властивості, тоді як 23–24 % – сильні [258, 260].

Досліджені авторами Andrade M. та інші ізоляти *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* мали різницю в потенціалі утворювати біоплівку [261]. За результатами наших досліджень статистично значущої різниці у потенціалі утворення біоплівки та різними видами коагулазопозитивних стафілококів не було.

Від корів ми вивчали лише стійкі до метициліну ізоляти. В нашому дослідженні 42,9 % MRSA штамів утворювали як стійку, так і помірну біоплівку. У схожому дослідженні *Staph. aureus*, виділених з молока, сильними продуцентами біоплівки виявилися 58,3 % та 65,0 % ізолятів [122, 262].

Shah M. S. та інші також вивчали стафілококові біоплівки, за їхніми результатами більшість (65,0 %) MRSA ізолятів утворюють щільну біоплівку, тоді як метицилінчутливі ізоляти (MSSA) загалом не утворюють біоплівку (86,7 %) [263].

Загалом метицилінрезистентні штами мають вищий потенціал до формування щільної біоплівки, ніж чутливі ізоляти. Чутливі до метициліну ізоляти *Staph. aureus* від домашніх тварин рідше утворювали щільну біоплівку, ніж метицилінстійкі ізоляти, отримані від корів. Хоча таке порівняння має певні обмеження в інтерпретації, загалом біоплівкоутворювальні властивості стафілококів, отриманих від собак та корів, не мають статистично значущої різниці [264].

Серед досліджених в Україні ізолятів *Staph. aureus* біоплівку високої щільності формували 57,1 % дослідних штамів MRSA, середній рівень щільності був у 28,6 %, а низький – у 14,3 % дослідних культур. Проте їхні ізоляти були відібрані з харчових продуктів [17].

Виходячи з власних досліджень та результатів інших авторів можна стверджувати, що біоплівкоутворювальні властивості різних штамів стафілококів відрізняються між собою. Отже, мають бути генетичні фактори, що сприяють утворенню більш щільної біоплівки. Ми вивчили наявність генів, що входять до складу оперона *ica*. Цей кластер генів відповідає за синтез полісахаридного міжклітинного адгезину (PIA/PNAG). Ці сполуки відіграють вирішальну роль у формуванні біоплівки, оскільки забезпечують адгезію бактерій на біотичній та абіотичній поверхні. Оперон складається з чотирьох генів *icaABCD*, що відповідають за синтез ферментів, які контролюють різні етапи біосинтезу та моделювання PIA. *IcaA* відповідає за початок синтезу полісахаридів, *icaD* посилює активність *icaA* ферменту та допомагає формувати полісахаридний ланцюг [265].

З метою вивчення факторів, що впливають на щільність стафілококової біоплівки, було вивчено два з чотирьох генів, що входять до кластеру *ica* (*icaA* та *icaD*). Згідно з отриманими результатами, не було виявлено статистично значущого впливу наявності генів ($p=0,298$) на щільність біоплівки, проте був знайдений лише один ізолят, який не продукував обидва гени [200].

Дані щодо поширеності генів *icaA* та *icaD* серед ізолятів *Staph. pseudintermedius* у літературних джерелах є неоднозначними. Більшість досліджень вказують на те, що ці гени присутні у переважній більшості ізолятів [123, 261]. Однак спостерігається тенденція до рідшого виявлення гену *icaA* порівняно з геном *icaD*, що узгоджується з нашими результатами дослідження [232]. Разом з тим, деякі наукові праці повідомляють про виявлення згаданих генів лише в незначній кількості зразків з досліджуваних ізолятів [219, 260].

Staph. pseudintermedius має ряд важливих факторів що визначають його патогенний та зоонозний потенціал. Стафілококовий лейкотоксин (*Luk-I*) – це токсин, що викликає лізис макрофагів та пригнічує імунну відповідь. Він складається з двох компонентів *lukF* та *lukS*, що кодуються окремими генами [266]. Стафілококовий ексфоліативний (ЕТ) токсин спрямований на ураження епідермісу та викликає розшарування тканин. Цей фактор патогенності кодується геном *siet*.

Гени стафілококових *lukF* та *siet* були виявлені у всіх ізолятів, ген *lukS* зустрічався рідше у 90 % бактерій [244].

Дані літератури також підтверджують наявність генів, відповідальних за синтез лейкотоксинів, у більшості ізолятів *Staph. pseudintermedius*. В одному з досліджень ці гени були виявлені у всіх проаналізованих ізолятів [51], а в іншому вони були присутні у більш ніж 90 % ізолятів [266]. Однак існують повідомлення про значно нижчу поширеність генів *lukF/S* серед ізолятів *Staph. pseudintermedius*.

Дані з літератури також підтверджують наявність цих генів у більшості ізолятів *Staph. pseudintermedius*. В одному дослідженні гени були виявлені у всіх ізолятів, в іншому в більше ніж 90 % ізолятів. Проте є повідомлення про значно менше поширення *lukF/S* серед ізолятів *Staph. pseudintermedius* [9].

Загалом не було виявлено закономірностей між поширенням різних генів патогенності, джерелом ізоляції стафілококів, їхніми біоплівкоутворювальними властивостями та стійкістю до антибіотиків. Хоча два мультирезистентні стафілококи мали найвищу щільність біоплівки цієї вибірки, але цього недостатньо, щоб зробити висновки у зв'язку з необхідністю додаткових досліджень. Фактори патогенності, вивчені в дослідженні, імовірно, притаманні більшості *Staph. pseudintermedius* та зумовлюють загальну патогенність збудника, що узгоджується з повідомленнями інших авторів.

ВИСНОВКИ

У дисертації вивчено поширення стафілококів серед собак, котів та корів. Вперше в Україні досліджено рівень резидентного носійства стафілококів у клінічно здорових собак. Отримано дані щодо антибіотикорезистентності ізолятів *Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*, виділених у матеріалах від різних видів тварин. Обґрунтовано можливість практичного використання комплексних діагностичних алгоритмів, що поєднують мікробіологічні та молекулярно-генетичні методи, для точної ідентифікації та диференціації стафілококів.

1. Бактерії виду *Staph. pseudintermedius* було виявлено у 24,1 % клінічно здорових собак, *Staph. aureus* – у 5,2 %. Вушний канал собак частіше колонізують коагулазонегативні стафілококи, тоді як *Staph. pseudintermedius* зустрічався у 7,6 % собак, а *Staph. aureus* – у 1,9 %. Бактерії роду *Staphylococcus spp.* частіше колонізують носову порожнину – 44,8 % ніж зовнішнє вухо – 28,6 % ($p=0,003$).

2. Стафілококи ізолювали від 40,3 % собак та 40,6 % котів з ураженнями шкіри, вуха, слизових оболонок очей та носа. Серед виділених ізолятів *Staph. pseudintermedius* достовірно більше ($p=0,001$) виділяли у собак – 58,1 % порівняно з *Staph. aureus* – 12,9 %. У хворих котів *Staph. pseudintermedius* (30,8 %) також переважав над *Staph. aureus* (15,3 %), проте різниця не була статистично значущою. У видовій структурі *Staphylococcus spp.*, ізольованих від собак домінували коагулазопозитивні стафілококи – 71,0 %, у котів ця група бактерій поширена менше – 46,1 %.

3. За субклінічної та клінічної форми маститу у корів *Staph. aureus* є важливим етіологічним фактором, який виявляли у 33,3 % хворих тварин. Він є домінуючим видом стафілококів ($p=0,023$) за клінічної форми маститу, та 61,9 % випадків був ізольований як збудник моноінфекції. У корів з субклінічним маститом його ідентифікували переважно 55,5 % як збудник асоційованої інфекції.

4. Мета-аналіз поширення антибіотикорезистентності *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*, ізольованих від хворих собак і котів, вказує на значну гетерогенність даних. У нашому дослідженні ізоляти *Staph. pseudintermedius* найчастіше проявляли стійкість до триметоприму з сульфаметоксазолом 36,3 %, пеніциліну 18,2 % та еритроміцину 18,2 %. *Staph. aureus* демонстрував високий рівень стійкості до пеніциліну 50 %. Серед хворих тварин метицилінстійких коагулазопозитивних стафілококів не виявлено.

5. Ізоляти *Staph. aureus*, отримані від хворих на мастит корів найчастіше проявляли стійкість до ампіциліну у 60,0 % та тетрацикліну – у 23,3 % випадків. MRSA штами виявлено у 7,7 % хворих на мастит корів, загалом стійкими до метициліну було 23,3 % досліджених стафілококів. Одночасно методом ПЛР встановили наявність *mecA* гену у всіх MRSA штамів.

6. Досліджені коагулазопозитивні стафілококи володіють різним потенціалом до утворення біоплівки. Загалом, 46,6 % ізолятів *Staph. pseudintermedius* та 40,0 % ізолятів *Staph. aureus*, виділених від собак та котів, мали слабкий потенціал до утворення біоплівки. Сильний потенціал до утворення біоплівки проявили по 20,0 % ізолятів *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*. Статистично значимої різниці між джерелом ізоляції та щільністю біоплівки не виявлено ($p=0.98$).

7. Профіль генів міжклітинної адгезії *icaA+icaD* виявлено у 66,7 % досліджених ізолятів *Staph. pseudintermedius*, тоді як *icaA* у 6,7 % та *icaD* у 23,3 %. Різниці в щільності біоплівки між ізолятами з різним профілем генів міжклітинної адгезії не виявлено ($p=0.231$).

8. Ген ексфоліативного токсину *siet* та лейкотоксину *LukF* виявлені у 100 % ізолятів, ген лейкотоксину *LukS* – у 90,0 % ізолятів. Наявність генів у досліджених ізолятів не залежали від виду тварини, локалізації інфекції або клінічного стану тварини ($p=1$).

9. За результатами проведених досліджень два польових ізоляти *Staph. pseudintermedius* рекомендовано як позитивний контроль для розробки

діагностичних тест-систем. Видова приналежність цих ізолятів була достовірно встановлена шляхом вивчення їх білкового профілю методом MALDI-TOF MS та секвенування консервативної ділянки гену термонуклеази за методом Сенгера.

10. За вивчення культуральних властивостей *Staph. pseudintermedius* на комерційному хромогенному середовищі CHROMagar Orientation., встановлено, що колонії мають забарвлення від світло-рожевого до малинового кольору. Спостерігалась мінливість інтенсивності забарвлення від центральної частини колонії до периферійної зони.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для використання у практиці ветеринарної медицини пропонуємо:

З метою ідентифікації та диференціації коагулазопозитивних стафілококів, виділених від собак та котів, рекомендуємо використовувати схеми мікробіологічної діагностики, описані у методичних рекомендаціях (Шевченко М. В., Андрійчук А. В., Тарасов О. А., Мазур Т. Г., Богатко Н. М., Наумчук В. С., Петрук І. П., Савченко М. О., Царенко Т. М. Сучасні підходи до дослідження стафілококів: мікробіологічні та молекулярно-генетичні методи діагностики. Біла Церква, БНАУ, 2024. 46 с.).

Комерційне середовище CHROMagar Orientation може бути використане для диференціації *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*.

Відсеквенований фрагмент ДНК та чисті культури, підтверджені методом MALDI-TOF MS, можуть слугувати позитивним контролем у мікробіологічних та молекулярно-генетичних дослідженнях стафілококів.

Враховуючи проведений моніторинг поширення стійкості *Staphylococcus spp.*, рекомендуємо обмежити використання β -лактамних антибіотиків при лікуванні маститів у корів. При лікуванні стафілококових інфекцій собак та котів обмежити застосування препаратів пеніцилінової групи та комбінації препарату триметоприму з сульфаметоксазолом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гарагуля, Г. І., Северин, Р. В., Баско, С. О., Мурзакова, Г. Ф., & Фільштинська-Лялько, В. Л. (2023). Стафілококози собак: класифікація та основні властивості збудників. *One Health Journal*, 1(II), 26–33. <https://doi.org/10.31073/onehealthjournal2023-II-04>
2. Cuny, C., Layer-Nicolaou, F., Weber, R., Köck, R., & Witte, W. (2022). Colonization of Dogs and Their Owners with *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in Households, Veterinary Practices, and Healthcare Facilities. *Microorganisms*, 10(4), 677. DOI:10.3390/microorganisms10040677
3. Matuszewska, M., Murray, G. G. R., Harrison, E. M., Holmes, M. A., & Weinert, L. A. (2020). The Evolutionary Genomics of Host Specificity in *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 28(6), 465–477. DOI:10.1016/j.tim.2019.12.007
4. Mahendra Pal, Margo Yonas Shuramo, Anita Tewari, Jyoti Priyadarshini Srivastava, Carl H.D. Steinmetz. (2023) *Staphylococcus aureus* from a Commensal to Zoonotic Pathogen: A Critical Appraisal. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine Research*, 7(2), 220-228. <http://dx.doi.org/10.26855/ijcemr.2023.04.023>
5. 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
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. DOI:10.1371/journal.ppat.1009961
7. Ference, E. H., Danielian, A., Kim, H. W., Yoo, F., Kuan, E. C., & Suh, J. D. (2019). Zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* sinonasal infections: risk factors and resistance patterns. *International forum of allergy & rhinology*, 9(7), 724–729. DOI:10.1002/alr.22329

8. González-Martín, M., Corbera, J. A., Suárez-Bonnet, A., & Tejedor-Junco, M. T. (2020). Virulence factors in coagulase-positive staphylococci of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. *The veterinary quarterly*, 40(1), 118–131. DOI:10.1080/01652176.2020.1748253
9. Kmiecik, W., & Szewczyk, E. M. (2018). Are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* strains a growing threat for humans?. *Folia microbiologica*, 63(6), 743–747. DOI:10.1007/s12223-018-0615-2
10. 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
11. Abdullahi, I. N., Lozano, C., Ruiz-Ripa, L., Fernández-Fernández, R., Zarazaga, M., & Torres, C. (2021). Ecology and Genetic Lineages of Nasal *Staphylococcus aureus* and MRSA Carriage in Healthy Persons with or without Animal-Related Occupational Risks of Colonization: A Review of Global Reports. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(8), 1000. DOI:10.3390/pathogens10081000
12. Hogan, P. G., Mork, R. L., Boyle, M. G., Muenks, C. E., Morelli, J. J., Thompson, R. M., Sullivan, M. L., Gehlert, S. J., Merlo, J. R., McKenzie, M. G., Wardenburg, J. B., Rzhetsky, A., Burnham, C. D., & Fritz, S. A. (2019). Interplay of personal, pet, and environmental colonization in households affected by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infection*, 78(3), 200–207. DOI:10.1016/j.jinf.2018.11.006
13. Khairullah, A. R., Sudjarwo, S. A., Effendi, M. H., Ramandinianto, S. C., Gelolodo, M. A., Widodo, A., Riwu, K. H. P., & Kurniawati, D. A. (2023). Pet animals as reservoirs for spreading methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to human health. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 10(1), 1–13. DOI:10.5455/javar.2023.j641
14. Bibby, H. L., & Brown, K. L. (2021). Identification of *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates from Wound Cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Improves Accuracy of

Susceptibility Reporting at an Increase in Cost. *Journal of clinical microbiology*, 59(11), e0097321. DOI:10.1128/JCM.00973-21

15. Börjesson, S., Gómez-Sanz, E., Ekström, K., Torres, C., & Grönlund, U. (2015). *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 34(4), 839–844. DOI:10.1007/s10096-014-2300-y

16. Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirota, S., Kawakami, T., Fukata, T., & Hiramatsu, K. (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of clinical microbiology*, 48(3), 765–769. DOI:10.1128/JCM.01232-09

17. Гаркавенко, Т.О., Горбатюк, О. І., Козицька, Т. Г., Андріяшук, В. О., Кухтин, М. Д., Коваленко, В. Л., Мусієць, І. В., Ординська, Д. О. (2020). Вивчення здатності до формування біоплівки польовими ізолятами *S. aureus* виділеними із сировини і продукції тваринного походження. *Бюлетень “Ветеринарна біотехнологія”*, 37, 20–30. DOI:10.31073/vet_biotech37-02

18. Vishovan, Y., Ushkalov, V., Vygovska, L., Machuskyu, O., & Hranat, A. (2020). Biological properties of staphylococci derived from cats and dogs. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 11(3). DOI:10.31548/ujvs2020.03.006

19. Jfoster, T. (2002). *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medical Microbiology*, 839–888. DOI:10.1016/b978-012677530-3/50258-0

20. Hetem, D. J., Rooijackers, S. H. M., & Ekkelenkamp, M. B. (2017). Staphylococci and Micrococci. *Infectious Diseases*, 1509-1522.e2. DOI:10.1016/b978-0-7020-6285-8.00176-3

21. Bello, S., Mudassir, S. H., Rudra, B., & Gupta, R. S. (2023). Phylogenomic and molecular markers based studies on Staphylococcaceae and Gemella species. Proposals for an emended family Staphylococcaceae and three new families (Abyssicoccaceae fam. nov., Salinicoccaceae fam. nov. and Gemellaceae fam. nov.) harboring four new genera, Lacicoccus gen. nov., Macrococcoides gen.

nov., *Gemelliphila* gen. nov., and *Phocicoccus* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 116(10), 937–973. DOI:10.1007/s10482-023-01857-6

22. Chew, K. L., Octavia, S., Lai, D., Lin, R. T. P., & Teo, J. W. P. (2021). *Staphylococcus singaporensis* sp. nov., a new member of the *Staphylococcus aureus* complex, isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10). DOI:10.1099/ijsem.0.005067

23. Fountain, K., Gibbon, M. J., Loeffler, A., & Feil, E. J. (2019). Closed genome sequences of *Staphylococcus lloydii* sp. nov. and *Staphylococcus durrellii* sp. nov. isolated from captive fruit bats (*Pteropus livingstonii*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 71(3), 004715. DOI:10.1099/ijsem.0.004715

24. Oren, A., & Garrity, G. M. (2022). Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared in volume 71, part 10 of the IJSEM. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 72(1), 10.1099/ijsem.0.005165. DOI:10.1099/ijsem.0.005165

25. Schutte, A. H. J., Strepis, N., Zandijk, W. H. A., Bexkens, M. L., Bode, L. G. M., & Klaassen, C. H. W. (2021). Characterization of *Staphylococcus roterodami* sp. nov., a new species within the *Staphylococcus aureus* complex isolated from a human foot infection. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 71(9), 10.1099/ijsem.0.004996. DOI:10.1099/ijsem.0.004996

26. Genus: *Staphylococcus*. (6. 0.). *LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. <https://lpsn.dsmz.de/genus/Staphylococcus>

27. Lamers, R. P., Muthukrishnan, G., Castoe, T. A., Tafur, S., Cole, A. M., & Parkinson, C. L. (2012). Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. *BMC evolutionary biology*, 12, 171. DOI:10.1186/1471-2148-12-171

28. Otto M. (2010). *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert review of dermatology*, 5(2), 183–195. DOI:10.1586/edm.10.6
29. Rosenbach, F. J. (1884). Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. DOI:10.5962/bhl.title.22955
30. Devriese, L. A., Hajek, V., Oeding, P., Meyer, S. A., & Schleifer, K. H. (1978). *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28(4), 482–490. DOI:10.1099/00207713-28-4-482
31. Hajek, V. (1976). *Staphylococcus intermedius*, a New Species Isolated from Animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26(4), 401–408. DOI:10.1099/00207713-26-4-401
32. Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A., & Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(Pt 4), 1569–1573. DOI:10.1099/ijls.0.63413-0
33. Varaldo, P. E., Kilpper-balz, R., Biavasco, F., Satta, G., & Schleifer, K. H. (1988). *Staphylococcus delphini* sp. nov., a Coagulase-Positive Species Isolated from Dolphins. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(4), 436–439. DOI:10.1099/00207713-38-4-436
34. Igimi, S., Takahashi, E., & Mitsuoka, T. (1990). *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *International journal of systematic bacteriology*, 40(4), 409–411. DOI:10.1099/00207713-40-4-409
35. Madhaiyan, M., Wirth, J. S., & Saravanan, V. S. (2020). Phylogenomic analyses of the Staphylococcaceae family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliicoccus* gen. nov., and the formal assignment of

Nosocomiicoccus to the family Staphylococcaceae. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 70(11), 5926–5936. DOI:10.1099/ijsem.0.004498

36. Foster, G., Ross, H. M., Hutson, R. A., & Collins, M. D. (1997). *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. International journal of systematic bacteriology, 47(3), 724–726. DOI:10.1099/00207713-47-3-724

37. Taponen, S., Supré, K., Piessens, V., Van Coillie, E., De Vliegher, S., & Koort, J. M. K. (2012). *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 62(Pt 1), 61–65. DOI:10.1099/ijse.0.028365-0

38. Murray, A. K., Lee, J., Bendall, R., Zhang, L., Sunde, M., Schau Slette-meås, J., Gaze, W., Page, A. J., & Vos, M. (2018). *Staphylococcus cornubiensis* sp. nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* Group (SIG). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 68(11), 3404–3408. DOI:10.1099/ijsem.0.002992

39. Michalik, M., Samet, A., Podbielska-Kubera, A., Savini, V., Międzobrodzki, J., & Kosecka-Strojek, M. (2020). Coagulase-negative staphylococci (CoNS) as a significant etiological factor of laryngological infections: a review. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, 19(1), 26. DOI:10.1186/s12941-020-00367-x

40. Rall, V. L., Miranda, E. S., Castilho, I. G., Camargo, C. H., Langoni, H., Guimarães, F. F., Araújo Júnior, J. P., & Fernandes Júnior, A. (2014). Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. Journal of dairy science, 97(2), 829–837. DOI:10.3168/jds.2013-7226

41. Velázquez-Guadarrama, N., Olivares-Cervantes, A. L., Salinas, E., Martínez, L., Escorcía, M., Oropeza, R., & Rosas, I. (2017). Presence of environmental coagulase-positive staphylococci, their clonal relationship, resistance

factors and ability to form biofilm. *Revista Argentina de microbiologia*, 49(1), 15–23. DOI:10.1016/j.ram.2016.08.006

42. Wong Fok Lung, T., Chan, L. C., Prince, A., Yeaman, M. R., Archer, N. K., Aman, M. J., & Proctor, R. A. (2022). *Staphylococcus aureus* adaptive evolution: Recent insights on how immune evasion, immunometabolic subversion and host genetics impact vaccine development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 1060810. DOI:10.3389/fcimb.2022.1060810

43. Lindsay J. A. (2019). *Staphylococci: Evolving Genomes*. *Microbiology spectrum*, 7(6), 10.1128/microbiolspec.gpp3-0071-2019. DOI:10.1128/microbiolspec.GPP3-0071-2019

44. Bosi, E., Monk, J. M., Aziz, R. K., Fondi, M., Nizet, V., & Palsson, B. Ø. (2016). Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(26), E3801–E3809. DOI:10.1073/pnas.1523199113

45. Lindsay, J. A., & Holden, M. T. (2004). *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome?. *Trends in microbiology*, 12(8), 378–385. DOI:10.1016/j.tim.2004.06.004

46. Ferrer, L., García-Fonticoba, R., Pérez, D., Viñes, J., Fàbregas, N., Madroñero, S., Meroni, G., Martino, P. A., Martínez, S., Maté, M. L., Sánchez-Bruni, S., Cuscó, A., Migura-García, L., & Francino, O. (2021). Whole genome sequencing and de novo assembly of *Staphylococcus pseudintermedius*: a pangenome approach to unravelling pathogenesis of canine pyoderma. *Veterinary dermatology*, 32(6), 654–663. DOI:10.1111/vde.13040

47. Divyakolu, S., Chikkala, R., Ratnakar, K. S., & Sritharan, V. (2019). Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy, 09(02), 80–104. DOI:10.4236/aid.2019.92007

48. Pinheiro, L., Brito, C. I., de Oliveira, A., Martins, P. Y., Pereira, V. C., & da Cunha, M.deL. (2015). *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus*

haemolyticus: Molecular Detection of Cytotoxin and Enterotoxin Genes. *Toxins*, 7(9), 3688–3699. DOI:10.3390/toxins7093688

49. Pontieri, E. (2018). The Staphylococcal Hemolysins. *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*, 103–116. DOI:10.1016/b978-0-12-813547-1.00008-x

50. Garbacz, K., Zarnowska, S., Piechowicz, L., & Haras, K. (2013). Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. *Virulence*, 4(3), 255–259. DOI:10.4161/viru.23526

51. Glajzner, P., Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2023). Pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from human and animals. *Folia microbiologica*, 68(2), 231–243. DOI:10.1007/s12223-022-01007-x

52. Maali, Y., Badiou, C., Martins-Simões, P., Hodille, E., Bes, M., Vandenesch, F., Lina, G., Diot, A., Laurent, F., & Trouillet-Assant, S. (2018). Understanding the Virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: A Major Role of Pore-Forming Toxins. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 221. DOI:10.3389/fcimb.2018.00221

53. Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547–569. DOI:10.1080/21505594.2021.1878688

54. Powers, M. E., & Bubeck Wardenburg, J. (2014). Igniting the fire: *Staphylococcus aureus* virulence factors in the pathogenesis of sepsis. *PLoS pathogens*, 10(2), e1003871. DOI:10.1371/journal.ppat.1003871

55. McAdow, M., Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2012). *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *Journal of innate immunity*, 4(2), 141–148. DOI:10.1159/000333447

56. Sewid, A. H., Hassan, M. N., Ammar, A. M., Bemis, D. A., & Kania, S. A. (2018). Identification, Cloning, and Characterization of *Staphylococcus*

pseudintermedius Coagulase. *Infection and immunity*, 86(8), e00027-18.
DOI:10.1128/IAI.00027-18

57. Pickering, A. C., Yebra, G., Gong, X., Goncheva, M. I., Wee, B. A., MacFadyen, A. C., Muehlbauer, L. F., Alves, J., Cartwright, R. A., Paterson, G. K., & Fitzgerald, J. R. (2021). Evolutionary and Functional Analysis of Coagulase Positivity among the Staphylococci. *mSphere*, 6(4), e0038121. DOI:10.1128/mSphere.00381-21

58. Jenul, C., & Horswill, A. R. (2019). Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiology spectrum*, 7(2), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018. DOI:10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018

59. Alibayov, B., Zdenkova, K., Sykorova, H., & Demnerova, K. (2014). Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPI) and their superantigens combination of food samples. *Journal of microbiological methods*, 107, 197–204. DOI:10.1016/j.mimet.2014.10.014

60. Haghi, F., Zeighami, H., Hajiloo, Z., Torabi, N., & Derakhshan, S. (2021). High frequency of enterotoxin encoding genes of *Staphylococcus aureus* isolated from food and clinical samples. *Journal of health, population, and nutrition*, 40(1), 27. DOI:10.1186/s41043-021-00246-x

61. Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2010). Staphylococcal enterotoxins. *Toxins*, 2(8), 2177–2197. DOI:10.3390/toxins2082177

62. Phumthanakorn, N., Fungwithaya, P., Chanchaithong, P., & Prapasarakul, N. (2018). Enterotoxin gene profile of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs, humans and the environment. *Journal of medical microbiology*, 67(6), 866–873. DOI:10.1099/jmm.0.000748

63. Phumthanakorn, N., Fungwithaya, P., Chanchaithong, P., & Prapasarakul, N. (2018). Enterotoxin gene profile of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs, humans and the environment. *Journal of medical microbiology*, 67(6), 866–873. DOI:10.1099/jmm.0.000748

64. Yoon, J. W., Lee, G. J., Lee, S. Y., Park, C., Yoo, J. H., & Park, H. M. (2010). Prevalence of genes for enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1 and

exfoliative toxin among clinical isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from canine origin. *Veterinary dermatology*, 21(5), 484–489. DOI:10.1111/j.1365-3164.2009.00874.x

65. Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R., & Gálvez, A. (2010). Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins*, 2(8), 2117–2131. DOI:10.3390/toxins2082117

66. Рубленко І.О., Андрійчук А.В., Зоценко В.М., Тарануха С.І., Островський Д.М. (2019) Загальна мікробіологія. Методичні вказівки для практичної та самостійної роботи студентів факультету ветеринарної медицини з мікробіологічних методів досліджень. Біла Церква.

67. Quinn, P. J., Maguire, D., Markey, B., Cullinane, A., & Leonard, F. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby, Incorporated.

68. Ryman, V. E., Kautz, F. M., & Nickerson, S. C. (2021). Case Study: Misdiagnosis of Nonhemolytic *Staphylococcus aureus* Isolates from Cases of Bovine Mastitis as Coagulase-Negative Staphylococci. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(2), 252. DOI:10.3390/ani11020252

69. Bhooshan, S., Negi, V., & Khatri, P. K. (2020). *Staphylococcus pseudintermedius*: an undocumented, emerging pathogen in humans. *GMS hygiene and infection control*, 15, Doc32. DOI:10.3205/dgkh000367

70. Tille, Patricia M., author. (2013). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. St. Louis, Missouri :Elsevier.

71. Bannoehr, J., & Guardabassi, L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary dermatology*, 23(4), 253–e52. DOI:10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x

72. Tse, H., Chan, E., Lam, C. W., Leung, K. F., Chow, P., Lee, K. C., Sze, K. H., Cheung, S. K., Tse, M. K., Ho, P. L., Leung, S. P., Lau, S. K., Woo, P. C., & Yuen, K. Y. (2012). Production of 2-aminophenoxazin-3-one by *Staphylococcus*

aureus causes false-positive results in β -galactosidase assays. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3780–3782. DOI:10.1128/JCM.02299-12

73. 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

74. Rusenova, N., Krustev, S., Atanasov, A., Rusenov, A., & Stanilova, S. (2020). *Staphylococcus intermedius* Grubundaki (SIG) *Staphylococcus pseudintermedius*'un Geleneksel ve Moleküler Yöntemlerle Ayırdedilmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. DOI:10.9775/kvfd.2020.23988

75. Gandra, E.A., Silva, J.A., Macedo, M.R., Araújo, M.R., Mata, M.M., & Silva, W.P. (2005). Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. Intermedius* and *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. *Archives of Veterinary Science*, 10(1). DOI:10.5380/avs.v10i1.4088

76. Chitra, M. A., Jayanthi, C., & Nagarajan, B. (2015). Detection and sequence analysis of accessory gene regulator genes of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates. *Veterinary world*, 8(7), 902–907. DOI:10.14202/vetworld.2015.902-907

77. Martineau, F., Picard, F. J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P. H., Ouellette, M., & Bergeron, M. G. (2001). Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *Journal of clinical microbiology*, 39(7), 2541–2547. DOI:10.1128/JCM.39.7.2541-2547.2001

78. Nakano, S., Kobayashi, T., Funabiki, K., Matsumura, A., Nagao, Y., & Yamada, T. (2004). PCR detection of *Bacillus* and *Staphylococcus* in various foods. *Journal of food protection*, 67(6), 1271–1277. DOI:10.4315/0362-028x-67.6.1271

79. Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome open research*, 3, 124. DOI:10.12688/wellcomeopenres.14826.1

80. 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
81. Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A. W., Bruggeman, C. A., & Stobberingh, E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(3), 222–235. DOI:10.1111/j.1469-0691.2006.01573.x
82. Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., & Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1008–1015. DOI:10.1128/JCM.38.3.1008-1015.2000
83. Solyman, S. M., Black, C. C., Duim, B., Perreten, V., van Duijkeren, E., Wagenaar, J. A., Eberlein, L. C., Sadeghi, L. N., Videla, R., Bemis, D. A., & Kania, S. A. (2013). Multilocus sequence typing for characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of clinical microbiology*, 51(1), 306–310. DOI:10.1128/JCM.02421-12
84. Sawhney, S. S., Vargas, R. C., Wallace, M. A., Muenks, C. E., Lubbers, B. V., Fritz, S. A., Burnham, C. D., & Dantas, G. (2023). Diagnostic and commensal *Staphylococcus pseudintermedius* genomes reveal niche adaptation through parallel selection of defense mechanisms. *Nature communications*, 14(1), 7065. DOI:10.1038/s41467-023-42694-5
85. Wegener, A., Broens, E. M., van der Graaf-van Bloois, L., Zomer, A. L., Visser, C. E., van Zeijl, J., van der Meer, C., Kusters, J. G., Friedrich, A. W., Kampinga, G. A., Sips, G. J., Smeets, L., van Kerckhoven, M. E. J., Timmerman, A. J., Wagenaar, J. A., & Duim, B. (2021). Absence of Host-Specific Genes in Canine and Human *Staphylococcus pseudintermedius* as Inferred from Comparative Genomics. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(7), 854. DOI:10.3390/antibiotics10070854

86. Bula-Rudas, F. J., & Olcott, J. L. (2018). Human and Animal Bites. *Pediatrics in review*, 39(10), 490–500. DOI:10.1542/pir.2017-0212
87. Griego, R. D., Rosen, T., Orengo, I. F., & Wolf, J. E. (1995). Dog, cat, and human bites: a review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 33(6), 1019–1029. DOI:10.1016/0190-9622(95)90296-1
88. Thomas, N., & Brook, I. (2011). Animal bite-associated infections: microbiology and treatment. *Expert review of anti-infective therapy*, 9(2), 215–226. DOI:10.1586/eri.10.162
89. Lee, J., Murray, A., Bendall, R., Gaze, W., Zhang, L., & Vos, M. (2015). Improved detection of *Staphylococcus intermedius* group in a routine diagnostic laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 53(3), 961–963. DOI:10.1128/JCM.02474-14
90. Yarbrough, M. L., Lainhart, W., & Burnham, C. A. (2018). Epidemiology, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Human Clinical Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group. *Journal of clinical microbiology*, 56(3), e01788-17. DOI:10.1128/JCM.01788-17
91. Naushad, S., Nobrega, D. B., Naqvi, S. A., Barkema, H. W., & De Buck, J. (2020). Genomic Analysis of Bovine *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk To Elucidate Diversity and Determine the Distributions of Antimicrobial and Virulence Genes and Their Association with Mastitis. *mSystems*, 5(4), e00063-20. DOI:10.1128/mSystems.00063-20
92. Richardson, E. J., Bacigalupe, R., Harrison, E. M., Weinert, L. A., Lycett, S., Vrieling, M., Robb, K., Hoskisson, P. A., Holden, M. T. G., Feil, E. J., Paterson, G. K., Tong, S. Y. C., Shittu, A., van Wamel, W., Aanensen, D. M., Parkhill, J., Peacock, S. J., Corander, J., Holmes, M., & Fitzgerald, J. R. (2018). Gene exchange drives the ecological success of a multi-host bacterial pathogen. *Nature ecology & evolution*, 2(9), 1468–1478. DOI:10.1038/s41559-018-0617-0
93. Weinert, L. A., Welch, J. J., Suchard, M. A., Lemey, P., Rambaut, A., & Fitzgerald, J. R. (2012). Molecular dating of human-to-bovid host jumps by

Staphylococcus aureus reveals an association with the spread of domestication. *Biology letters*, 8(5), 829–832. DOI:10.1098/rsbl.2012.0290

94. Boss, R., Cosandey, A., Luini, M., Artursson, K., Bardiau, M., Breitenwieser, F., Hehenberger, E., Lam, T., Mansfeld, M., Michel, A., Mösslacher, G., Naskova, J., Nelson, S., Podpečan, O., Raemy, A., Ryan, E., Salat, O., Zangerl, P., Steiner, A., & Graber, H. U. (2016). Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *Journal of dairy science*, 99(1), 515–528. DOI:10.3168/jds.2015-9589

95. Guinane, C. M., Ben Zakour, N. L., Tormo-Mas, M. A., Weinert, L. A., Lowder, B. V., Cartwright, R. A., Smyth, D. S., Smyth, C. J., Lindsay, J. A., Gould, K. A., Witney, A., Hinds, J., Bollback, J. P., Rambaut, A., Penadés, J. R., & Fitzgerald, J. R. (2010). Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome biology and evolution*, 2, 454–466. DOI:10.1093/gbe/evq031

96. Smith, E. M., Needs, P. F., Manley, G., & Green, L. E. (2014). Global distribution and diversity of ovine-associated *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 22(100), 208–215. DOI:10.1016/j.meegid.2013.09.008

97. Borovyc, I. V., Davydenko, P. O., Kulishenko, O. M., Zazharskyi, V. V., Dyshkant, O. V., & Gutyj, B. V. (2023). Evaluation of contamination of cow milk with various conditionally pathogenic microflora for mastitis: genera *Staphylococcus*. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 6(3), 24-31. DOI:10.32718/ujvas6-3.05

98. Benito, D., Gómez, P., Aspiroz, C., Zarazaga, M., Lozano, C., & Torres, C. (2016). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying mecC gene: A zoonotic case?. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 34(5), 280–285. DOI:10.1016/j.eimc.2015.03.008

99. Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira Mendes, T. A., Fitzgerald, J. R., & de Oliveira Barros Ribon, A. (2022). Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. *BMC veterinary research*, 18(1), 115. DOI:10.1186/s12917-022-03197-5
100. Haag, A. F., Fitzgerald, J. R., & Penadés, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology spectrum*, 7(3), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019. DOI:10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019
101. Cuny, C., Layer-Nicolaou, F., Weber, R., Köck, R., & Witte, W. (2022). Colonization of Dogs and Their Owners with *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in Households, Veterinary Practices, and Healthcare Facilities. *Microorganisms*, 10(4), 677. DOI:10.3390/microorganisms10040677
102. Silva, V., Caniça, M., Capelo, J. L., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). Diversity and genetic lineages of environmental staphylococci: a surface water overview. *FEMS microbiology ecology*, 96(12), fiae191. DOI:10.1093/femsec/fiae191
103. Bierowiec, K., Płoneczka-Janeczko, K., & Rypuła, K. (2016). Prevalence and Risk Factors of Colonization with *Staphylococcus aureus* in Healthy Pet Cats Kept in the City Households. *BioMed research international*, 2016, 3070524. DOI:10.1155/2016/3070524
104. Bierowiec, K., Płoneczka-Janeczko, K., & Rypuła, K. (2016). Is the Colonisation of *Staphylococcus aureus* in Pets Associated with Their Close Contact with Owners?. *PloS one*, 11(5), e0156052. DOI:10.1371/journal.pone.0156052
105. Montoya Urrego, D., Vanegas, J. M., & Jiménez, J. N. (2022). The remarkable genetic relationship between *Staphylococcus aureus* isolates from hemodialysis patients and their household contacts: Homes as an important source of colonization and dissemination. *PloS one*, 17(4), e0267276. DOI:10.1371/journal.pone.0267276

106. Costa, S. S., Ribeiro, R., Serrano, M., Oliveira, K., Ferreira, C., Leal, M., Pomba, C., & Couto, I. (2022). *Staphylococcus aureus* Causing Skin and Soft Tissue Infections in Companion Animals: Antimicrobial Resistance Profiles and Clonal Lineages. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(5), 599. DOI:10.3390/antibiotics11050599
107. Ruiz-Ripa, L., Simón, C., Ceballos, S., Ortega, C., Zarazaga, M., Torres, C., & Gómez-Sanz, E. (2021). *S. pseudintermedius* and *S. aureus* lineages with transmission ability circulate as causative agents of infections in pets for years. *BMC veterinary research*, 17(1), 42. DOI:10.1186/s12917-020-02726-4
108. Silva, V., Monteiro, A., Pereira, J. E., Maltez, L., Igrejas, G., & Poeta, P. (2022). MRSA in Humans, Pets and Livestock in Portugal: Where We Came from and Where We Are Going. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(10), 1110. DOI:10.3390/pathogens11101110
109. Walther, B., Hermes, J., Cuny, C., Wieler, L. H., Vincze, S., Abou Elnaga, Y., Stamm, I., Kopp, P. A., Kohn, B., Witte, W., Jansen, A., Conraths, F. J., Semmler, T., Eckmanns, T., & Lübke-Becker, A. (2012). Sharing more than friendship--nasal colonization with coagulase-positive staphylococci (CPS) and cohabitation aspects of dogs and their owners. *PloS one*, 7(4), e35197. DOI:10.1371/journal.pone.0035197
110. Abdullahi, I. N., Zarazaga, M., Campaña-Burguet, A., Eguizábal, P., Lozano, C., & Torres, C. (2022). Nasal *Staphylococcus aureus* and *S. pseudintermedius* carriage in healthy dogs and cats: a systematic review of their antibiotic resistance, virulence and genetic lineages of zoonotic relevance. *Journal of applied microbiology*, 133(6), 3368–3390. DOI:10.1111/jam.15803
111. Шевченко, М. В., Савченко, М. О., Ярчук, Б. М., Сахнюк, Н. І., Царенко, Т. М. (2021). Коагулазопозитивні стафілококи у собак та їх антимікробна резистентність (систематичний огляд). *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 1(165), 104–118. Internet Archive. DOI:10.33245/2310-4902-2021-165-1-104-118

112. Lynch, S. A., & Helbig, K. J. (2021). The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next?. *Veterinary sciences*, 8(1), 11. DOI:10.3390/vetsci8010011
113. Faccin, M., Wiener, D. J., Rech, R. R., Santoro, D., & Rodrigues Hoffmann, A. (2023). Common superficial and deep cutaneous bacterial infections in domestic animals: A review. *Veterinary pathology*, 60(6), 796–811. DOI:10.1177/03009858231176558
114. De Martino, L., Nocera, F. P., Mallardo, K., Nizza, S., Masturzo, E., Fiorito, F., Iovane, G., & Catalanotti, P. (2016). An update on microbiological causes of canine otitis externa in Campania Region, Italy. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(5), 384–389. DOI:10.1016/j.apjtb.2015.11.012
115. Kasai, T., Fukui, Y., Aoki, K., Ishii, Y., & Tateda, K. (2021). Changes in the ear canal microbiota of dogs with otitis externa. *Journal of applied microbiology*, 130(4), 1084–1091. DOI:10.1111/jam.14868
116. Lee, G. Y., & Yang, S. J. (2020). Comparative assessment of genotypic and phenotypic correlates of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from dogs with otitis externa and healthy dogs. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 70, 101376. DOI:10.1016/j.cimid.2019.101376
117. Кривенко, Н. М., Рубленко, І. О., Рубленко С. В., Козій, В.І., Шаганенко, Р.В., Горбатюк, О.І. Антибіотикорезистентність мікрофлори до препаратів за кон'юнктивітів котів бактеріального походження. Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Ґжицького. Серія: Ветеринарні науки, 25(110), 20-25. DOI:10.32718/nvlvet11004
118. Rota, A., Corrà, M., Drigo, I., Bortolami, A., & Börjesson, S. (2015). Isolation of coagulase-positive staphylococci from bitches' colostrum and milk and genetic typing of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains. *BMC veterinary research*, 11, 160. DOI:10.1186/s12917-015-0490-x
119. Sebola, D. C., Oguttu, J. W., Kock, M. M., & Qekwana, D. N. (2023). Hospital-acquired and zoonotic bacteria from a veterinary hospital and their

associated antimicrobial-susceptibility profiles: A systematic review. *Frontiers in veterinary science*, 9, 1087052. DOI:10.3389/fvets.2022.1087052

120. Frías-De León, M. G., Duarte-Escalante, E., Calderón-Ezquerro, M. del C., Jiménez-Martínez, M. del C., Acosta-Altamirano, G., Moreno-Eutimio, M. A., Zúñiga, G., García-González, R., Ramírez-Pérez, M., & Reyes-Montes, M. del R. (2015). Diversity and characterization of airborne bacteria at two health institutions. *Aerobiologia*, 32(2), 187–198. DOI:10.1007/s10453-015-9389-z

121. Кісера, Я. В., Божик, Л. Я., Гриневич, Н. Є., Мартинів, Ю. В. (2021). Видовий склад циркулюючої мікрофлори та її стійкість до антибактеріальних препаратів в умовах ветеринарної клініки «Імпульс» міста Львів. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 2 (168), 65–71. DOI:10.33245/2310-4902-2021-168-2-65-71

122. Mirzaei, R., Shahriary, E., Qureshi, M. I., Rakhshkhorshid, A., Khammary, A., & Mohammadi, M. (2014). Quantitative and qualitative evaluation of bio-aerosols in surgery rooms and emergency department of an educational hospital. *Jundishapur journal of microbiology*, 7(10), e11688. DOI:10.5812/jjm.11688

123. Mocherniuk, M., Kukhtyn, M., & Horiuk, Y. (2023). Sensitivity of microbiota of bioaerosol and surfaces of boxes for holding animals in veterinary clinics to antimicrobial drugs. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 25(109), 53-58. DOI:10.32718/nvlvet10909

124. Kozajda, A., Ježak, K., & Kapsa, A. (2019). Airborne *Staphylococcus aureus* in different environments-a review. *Environmental science and pollution research international*, 26(34), 34741–34753. DOI:10.1007/s11356-019-06557-1

125. Mandal, S. M., Ghosh, A. K., & Pati, B. R. (2015). Dissemination of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S aureus* strains isolated from hospital effluents. *American journal of infection control*, 43(12), e87–e88. DOI:10.1016/j.ajic.2015.08.015

126. Concepción Porrero, M., Harrison, E. M., Fernández-Garayzábal, J. F., Paterson, G. K., Díez-Guerrier, A., Holmes, M. A., & Domínguez, L. (2014). Detection of *mecC*-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in river water: a potential role for water in the environmental dissemination. *Environmental microbiology reports*, 6(6), 705–708. DOI:10.1111/1758-2229.12191
127. Гаркавенко, Т.О., Горбатюк, О. І., Козицька, Т. Г., Андріяшук, В. О., Мусієць, І. В., Ординська, Д. О., Карватко Т. М. (2021). Поширення стафілококозу серед тварин та птиці на території України за період 2015–2020 рр. Бюлетень “Ветеринарна біотехнологія”, 38, 36–46. DOI:10.31073/vet_biotech38-03
128. Kozajda, A., Ježak, K., & Kapsa, A. (2019). Airborne *Staphylococcus aureus* in different environments-a review. *Environmental science and pollution research international*, 26(34), 34741–34753. DOI:10.1007/s11356-019-06557-1
129. Zhong, Z., Chai, T., Duan, H., Miao, Z., Li, X., Yao, M., Yuan, W., Wang, W., Li, Q., Zucker, B. A., & Schlenker, G. (2009). REP-PCR tracking of the origin and spread of airborne *Staphylococcus aureus* in and around chicken house. *Indoor air*, 19(6), 511–516. DOI:10.1111/j.1600-0668.2009.00618.x
130. Stobnicka-Kupiec, A., Gołofit-Szymczak, M., & Górny, R. (2019). Microbial contamination level and microbial diversity of occupational environment in commercial and traditional dairy plants. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 26(4), 555–565. DOI:10.26444/aaem/112381
131. Гаркавенко, Т. О., Козицька, Т. Г. (2016) Механізм резистентності та методи виявлення метицилінрезистентного стафілокока (MRSA) (Оглядова Стаття). *Ветеринарна Біотехнологія* 28, 42. <http://vetbiotech.kiev.ua/uk/arhiv/36-28/373-garkavenko-t-kozitska-t>
132. Stobnicka-Kupiec, A., Gołofit-Szymczak, M., & Górny, R. (2019). Microbial contamination level and microbial diversity of occupational environment in commercial and traditional dairy plants. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 26(4), 555–565. DOI:10.26444/aaem/112381

133. Reygart W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482–501. DOI:10.3934/microbiol.2018.3.482
134. 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
135. Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology*, 10, 539. DOI:10.3389/fmicb.2019.00539
136. Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert review of anti-infective therapy*, 11(3), 297–308. DOI:10.1586/eri.13.12
137. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Nielsen, S. S., Bicout, D. J., Calistri, P., Canali, E., Drewe, J. A., Garin-Bastuji, B., Gonzales Rojas, J. L., Gortazar Schmidt, C., Herskin, M., Michel, V., Miranda Chueca, M. A., Padalino, B., Pasquali, P., Roberts, H. C., Sihvonen, L. H., Spoolder, H., Stahl, K., Velarde, A., Viltrop, A., Alvarez, J. (2021). Assessment of animal diseases caused by bacteria resistant to antimicrobials: Dogs and cats. *EFSA journal*. European Food Safety Authority, 19(6), e06680. DOI:10.2903/j.efsa.2021.6680
138. Kasela, M., Ossowski, M., Dzikóń, E., Ignatiuk, K., Wlazło, Ł., & Malm, A. (2023). The Epidemiology of Animal-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(6), 1079. DOI:10.3390/antibiotics12061079
139. Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, 431(18), 3472–3500. DOI:10.1016/j.jmb.2019.04.002

140. Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, 431(18), 3472–3500. DOI:10.1016/j.jmb.2019.04.002
141. Opal, S.M., & Pop-Vicas, A.E. (2010). *Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria*. pp. 235-251.e3.
142. El Feghaly, R. E., Stamm, J. E., Fritz, S. A., & Burnham, C. A. (2012). Presence of the bla(Z) beta-lactamase gene in isolates of *Staphylococcus aureus* that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 74(4), 388–393. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2012.07.013
143. Archer, G. L., & Niemeyer, D. M. (1994). Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends in microbiology*, 2(10), 343–347. DOI:10.1016/0966-842x(94)90608-4
144. Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00020-18. DOI:10.1128/CMR.00020-18
145. Andrade, M. M., Luiz, W. B., da Silva Oliveira Souza, R., & Amorim, J. H. (2020). The History of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 2020, 1721936. DOI:10.1155/2020/1721936
146. Ola Ojo M. (1972). Bacteriophage types and antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from swabs of the noses and skins of dogs. *The Veterinary record*, 91(6), 152–153. DOI:10.1136/vr.91.6.152
147. Devriese, L. A., Van Damme, L. R., & Fameree, L. (1972). Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, 19(7), 598–605. DOI:10.1111/j.1439-0450.1972.tb00439.x

148. Шаганенко, Р. В., Козій, Н. В., Шаганенко, В. С., Авраменко, Н. В., Тарануха, С. І. (2023). Вплив тривалості курсу антибіотикотерапії на розвиток атибіотикорезистентності. Науковий вісник ветеринарної медицини, 1(180), 113–124. Internet Archive. DOI:10.33245/2310-4902-2023-180-1-113-124
149. Algammal, A. M., Hetta, H. F., Elkelish, A., Alkhalifah, D. H. H., Hozzein, W. N., Batiha, G. E., El Nahhas, N., & Mabrok, M. A. (2020). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. *Infection and drug resistance*, 13, 3255–3265. DOI:10.2147/IDR.S272733
150. Rodríguez-López, P., Filipello, V., Di Ciccio, P. A., Pitozzi, A., Ghidini, S., Scali, F., Ianieri, A., Zanardi, E., Losio, M. N., Simon, A. C., & Alborali, G. L. (2020). Assessment of the Antibiotic Resistance Profile, Genetic Heterogeneity and Biofilm Production of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from The Italian Swine Production Chain. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(9), 1141. DOI:10.3390/foods9091141
151. Vanderhaeghen, W., Hermans, K., Haesebrouck, F., & Butaye, P. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiology and infection*, 138(5), 606–625. DOI:10.1017/S0950268809991567
152. Schijffelen, M. J., Boel, C. H., van Strijp, J. A., & Fluit, A. C. (2010). Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC genomics*, 11, 376. DOI:10.1186/1471-2164-11-376
153. Titouche, Y., Akkou, M., Houali, K., Auvray, F., & Hennekinne, J. A. (2022). Role of milk and milk products in the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the dairy production chain. *Journal of food science*, 87(9), 3699–3723. DOI:10.1111/1750-3841.16259
154. Harrison, E. M., Paterson, G. K., Holden, M. T., Larsen, J., Stegger, M., Larsen, A. R., Petersen, A., Skov, R. L., Christensen, J. M., Bak Zeuthen, A.,

Heltberg, O., Harris, S. R., Zadoks, R. N., Parkhill, J., Peacock, S. J., & Holmes, M. A. (2013). Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO molecular medicine*, 5(4), 509–515. DOI:10.1002/emmm.201202413

155. Grönthal, T., Eklund, M., Thomson, K., Piiparinen, H., Sironen, T., & Rantala, M. (2017). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(4), 1021–1030. DOI:10.1093/jac/dkw559

156. Kizerwetter-Świda, M., Chrobak-Chmiel, D., Rzewuska, M., & Binek, M. (2017). Changes in the population structure of canine methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Poland. *Veterinary microbiology*, 208, 106–109. DOI:10.1016/j.vetmic.2017.07.025

157. Morais, C., Costa, S. S., Leal, M., Ramos, B., Andrade, M., Ferreira, C., Abrantes, P., Pomba, C., & Couto, I. (2023). Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with skin and soft-tissue infections in companion animals in Lisbon, Portugal. *Frontiers in microbiology*, 14, 1167834. DOI:10.3389/fmicb.2023.1167834

158. Broekema, N. M., Van, T. T., Monson, T. A., Marshall, S. A., & Warshauer, D. M. (2009). Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of *mecA*-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* in a Large-Scale Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 217–219. DOI:10.1128/jcm.01506-08

159. Swenson, J. M., Lonsway, D., McAllister, S., Thompson, A., Jevitt, L., Zhu, W., & Patel, J. B. (2007). Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 58(1), 33–39. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2006.10.022

160. Skov, R., Varga, A., Matuschek, E., Åhman, J., Bemis, D., Bengtsson, B., Sunde, M., Humphries, R., Westblade, L., Guardabassi, L., & Kahlmeter, G.

(2020). EUCAST disc diffusion criteria for the detection of *mecA*-Mediated β -lactam resistance in *Staphylococcus pseudintermedius*: oxacillin versus cefoxitin. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(1), 122.e1–122.e6. DOI:10.1016/j.cmi.2019.05.002

161. Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 52(4), 1701–1718. DOI:10.1007/s42770-021-00624-x

162. de Carvalho C. C. C. R. (2017). Biofilms: Microbial Strategies for Surviving UV Exposure. *Advances in experimental medicine and biology*, 996, 233–239. DOI:10.1007/978-3-319-56017-5_19

163. Tuchscher, L. P., Buzzola, F. R., Alvarez, L. P., Caccuri, R. L., Lee, J. C., & Sordelli, D. O. (2005). Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. *Infection and immunity*, 73(12), 7932–7937. DOI:10.1128/IAI.73.12.7932-7937.2005

164. Quan, K., Hou, J., Zhang, Z., Ren, Y., Peterson, B. W., Flemming, H. C., Mayer, C., Busscher, H. J., & van der Mei, H. C. (2022). Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage and transport functions. *Critical reviews in microbiology*, 48(3), 283–302. DOI:10.1080/1040841X.2021.1962802

165. Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in microbiology*, 28(8), 668–681. DOI:10.1016/j.tim.2020.03.016

166. Yan, J., & Bassler, B. L. (2019). Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell host & microbe*, 26(1), 15–21. DOI:10.1016/j.chom.2019.06.002

167. Garnett, J. A., & Matthews, S. (2012). Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective. *Current protein & peptide science*, 13(8), 739–755. DOI:10.2174/138920312804871166

168. Shirliff, M. E., Mader, J. T., & Camper, A. K. (2002). Molecular interactions in biofilms. *Chemistry & biology*, 9(8), 859–871. DOI:10.1016/s1074-5521(02)00198-9
169. Lavryk, G., Korniychuk, O., & Tymkiv, M. (2017). Ultrastructural changes in biofilm forms of staphylococci cultivated in a mixed culture with lactobacilli. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 98-103. DOI:10.15421/021717
170. Mack, D., Davies, A. P., Harris, L. G., Rohde, H., Horstkotte, M. A., & Knobloch, J. K. (2007). Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(2), 399–408. DOI:10.1007/s00216-006-0745-2
171. Sadowska, B., Walencka, E., Wieckowska-Szakiel, M., & Różalska, B. (2010). Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Folia microbiologica*, 55(5), 497–501. DOI:10.1007/s12223-010-0082-x
172. Alotaibi, G. F. (2021). Factors Influencing Bacterial Biofilm Formation and Development. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 12(6), 617–626. DOI:10.34297/ajbsr.2021.12.001820
173. Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Goffredo, E., Goga, B. T., & Paparella, A. (2016). Influence of Incubation Conditions on Biofilm Formation by *Pseudomonas Fluorescens* Isolated from Dairy Products and Dairy Manufacturing Plants. *Italian journal of food safety*, 5(3), 5793. DOI:10.4081/ijfs.2016.5793
174. Vashchenko, A. O., Voronkova, Y. S., Kulyk, E. E., Snisar, O. S., Sidashenko, O. I., & Voronkova, O. S. (2021). Influence of sugars on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(2), 321-325. DOI:10.15421/022143
175. Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaioli, S., & Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 7. DOI:10.3389/fcimb.2015.00007

176. Schönborn, S., & Krömker, V. (2016). Detection of the biofilm component polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* infected cow udders. *Veterinary microbiology*, 196, 126–128. DOI:10.1016/j.vetmic.2016.10.023
177. Foster T. J. (2019). The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. *Trends in microbiology*, 27(11), 927–941. DOI:10.1016/j.tim.2019.06.007
178. Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F., & Peschel, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and immunity*, 69(5), 3423–3426. DOI:10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001
179. Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 84(3), e00026-19. DOI:10.1128/MMBR.00026-19
180. Samrot, A. V., Abubakar Mohamed, A., Faradjeva, E., Si Jie, L., Hooi Sze, C., Arif, A., Chuan Sean, T., Norbert Michael, E., Yeok Mun, C., Xiao Qi, N., Ling Mok, P., & Kumar, S. S. (2021). Mechanisms and Impact of Biofilms and Targeting of Biofilms Using Bioactive Compounds-A Review. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(8), 839. DOI:10.3390/medicina57080839
181. Abdul Hamid, A. I., Cara, A., Diot, A., Laurent, F., Josse, J., & Gueirard, P. (2021). Differential Early in vivo Dynamics and Functionality of Recruited Polymorphonuclear Neutrophils After Infection by Planktonic or Biofilm *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology*, 12, 728429. DOI:10.3389/fmicb.2021.728429
182. Arima, S., Ochi, H., Mitsuhashi, M., Kibe, R., Takahashi, K., & Kataoka, Y. (2018). *Staphylococcus pseudintermedius* biofilms secrete factors that induce inflammatory reactions in vitro. *Letters in applied microbiology*, 67(3), 214–219. DOI:10.1111/lam.13018
183. Cangui-Panchi, S. P., Ñacato-Toapanta, A. L., Enríquez-Martínez, L. J., Salinas-Delgado, G. A., Reyes, J., Garzon-Chavez, D., & Machado, A. (2023).

Battle royale: Immune response on biofilms - host-pathogen interactions. *Current research in immunology*, 4, 100057. DOI:10.1016/j.crimmu.2023.100057

184. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 95–108. DOI:10.1038/nrmicro821

185. Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 81(1), 7–11. DOI:10.1016/j.jcma.2017.07.012

186. Kher, L., Kelley, K., & Santoro, D. (2023). Ultrastructural Analysis of Differences in the Growth and Maturation of *Staphylococcus pseudintermedius* Biofilm on Biotic and Abiotic Surfaces. *Microbiology spectrum*, 11(2), e0357722. Advance online publication. DOI:10.1128/spectrum.03577-22

187. Goswami, A. G., Basu, S., Banerjee, T., & Shukla, V. K. (2023). Biofilm and wound healing: from bench to bedside. *European journal of medical research*, 28(1), 157. DOI:10.1186/s40001-023-01121-7

188. Thaarup, I. C., Iversen, A. K. S., Lichtenberg, M., Bjarnsholt, T., & Jakobsen, T. H. (2022). Biofilm Survival Strategies in Chronic Wounds. *Microorganisms*, 10(4), 775. DOI:10.3390/microorganisms10040775

189. 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

190. Pedersen, R. R., Krömker, V., Bjarnsholt, T., Dahl-Pedersen, K., Buhl, R., & Jørgensen, E. (2021). Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Frontiers in veterinary science*, 8, 656810. DOI:10.3389/fvets.2021.656810

191. Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial resistance and infection control*, 8, 76. DOI:10.1186/s13756-019-0533-3

192. Kranjec, C., Morales Angeles, D., Torrissen Mårli, M., Fernández, L., García, P., Kjos, M., & Diep, D. B. (2021). Staphylococcal Biofilms: Challenges

and Novel Therapeutic Perspectives. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 10(2), 131. DOI:10.3390/antibiotics10020131

193. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2023. Disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing—version 13.0. <http://www.eucast.org>

194. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, NCCLS Document M31-A2, 2nd ed.; NCCLS: Wayne, PA, USA, 2002

195. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 31th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA: 2018. CLSI supplement M100.

196. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 31th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA: 2020. CLSI supplement M100.

197. Ah Tow, L., & Cowan, D. A. (2003). Non-specificity of *Staphylococcus* generic primers. *Microbiology* (Reading, England), 149(Pt 7), 1605–1607. DOI:10.1099/mic.0.C0114-0

198. Meroni, G., Soares Filipe, J. F., Drago, L., & Martino, P. A. (2019). Investigation on Antibiotic-Resistance, Biofilm Formation and Virulence Factors in Multi Drug Resistant and Non Multi Drug Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Microorganisms*, 7(12), 702. DOI:10.3390/microorganisms7120702

199. Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., McGuinness, L. A., ... Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* (Clinical research ed.), 372, n71. DOI:10.1136/bmj.n71

200. Shevchenko, M., Andriichuk, A., Bilyk, S., Dovhal, O., Mazur, T., & Tsarenko, T. (2023). Biofilm forming ability of coagulase-positive staphylococci

isolated from animals in Ukraine . *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(4), 576-580. DOI:10.15421/022384

201. Shevchenko, M., Andriichuk, A., Goncharenko, V., & Dovhal, O. (2023). Mastitis prevention and control: Integration of microbiological and management approaches. *Scientific Horizons*, 26(7). Internet Archive. DOI:10.48077/scihor7.2023.19

202. Shevchenko, M., Andriichuk, A., Naumchuk, V., Petruk, I., Bilyk, S., & Tsarenko, T. (2023). Zoonotic *Staphylococcus* spp. among domestic animals in Ukraine: antibiotic resistance and diagnostic approaches. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(3), 378–385. DOI:10.15421/10.15421/022356

203. Шевченко, М.В., Тишківська, Н.В., Андрійчук, А.В., Мартиненко, О.А., Царенко, Т.М. (2022). Внутрішньолабораторна апробація протоколу ПЛР для молекулярно-генетичної ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus* spp. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 1(173), 81–91. Internet Archive. DOI:10.33245/2310-4902-2022-173-1-81-91

204. Шевченко, М.В. , Андрійчук, А.В (2023). Антибіотикорезистентність ізолятів *Staphylococcus* spp. та *Streptococcus* spp., що спричиняють мастит на молочних фермах України. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 1(180), 81–88. Internet Archive. DOI:10.33245/2310-4902-2023-180-1-81-88

205. Shevchenko, M., & Tsarenko, T. (2023). Microbiological and molecular genetic characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*. *Naukovij Vìsник Veterinarної Medicini*, 2 (184), 135–144. Internet Archive. DOI:10.33245/2310-4902-2023-184-2-135-144

206. Шевченко, М. В., Тарасов, О. А., Андрійчук, А. В., Гончаренко, В. П., Царенко Т. М. (2023). Оптимізація лабораторних плр-протоколів для точної ідентифікації *S. aureus* та *S. pseudintermedius* у собак. *Бюлетень “Ветеринарна біотехнологія”* 43, 175–185. DOI:10.31073/vet_biotech43-17

207. Вішован, Ю. Ю. (2023). Біологічні властивості бактерій роду *Staphylococcus* та розробка засобів їх індикації [Дис. д-ра філософії в галузі вет. медицини, Національний університет біоресурсів і природокористування України]. https://nubip.edu.ua/sites/default/files/u145/dis_vishovan.pdf
208. Козицька, Т. (2021). Метицилінрезистентний снауфілокок: поширення, біологічні властивості та діагностика [Дис. д-ра філософії в галузі вет. медицини, Національний університет біоресурсів і природокористування України]. https://nubip.edu.ua/sites/default/files/u316/aref_kozicka.pdf
209. Sleiniute, J., & Siugzdaite, J. (2015). Distribution of coagulase-positive staphylococci in humans and dogs. *Acta Veterinaria Brno*, 84(4), 313–320. DOI:10.2754/avb201584040313
210. Chasioti M, Petinaki E, Sarrou S, Zafeiriou E, Roussaki-Schulze A (2019). Prevalence and colonization of *S.aureus* in nasal cavity of domestic animals and of those who are taking care of them. *Animal Husbandry, Dairy and Veterinary Science*, 3(4). DOI:10.15761/ahdvs.1000169
211. Wedley, A. L., Dawson, S., Maddox, T. W., Coyne, K. P., Pinchbeck, G. L., Clegg, P., Jamrozy, D., Fielder, M. D., Donovan, D., Nuttall, T., & Williams, N. J. (2014). Carriage of *Staphylococcus* species in the veterinary visiting dog population in mainland UK: molecular characterisation of resistance and virulence. *Veterinary microbiology*, 170(1-2), 81–88. DOI:10.1016/j.vetmic.2014.01.015
212. Bzdil, J., Zouharova, M., Nedbalcova, K., Sladeczek, V., Senk, D., & Holy, O. (2021). Oxacillin (Methicillin) Resistant Staphylococci in Domestic Animals in the Czech Republic. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1585. DOI:10.3390/pathogens10121585
213. Moerer, M., Lübke-Becker, A., Bethe, A., Merle, R., & Bäumer, W. (2023). Occurrence of Antimicrobial Resistance in Canine and Feline Bacterial Pathogens in Germany under the Impact of the TÄHAV Amendment in 2018. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(7), 1193. DOI:10.3390/antibiotics12071193
214. Schmidt, V. M., Pinchbeck, G., Nuttall, T., Shaw, S., McIntyre, K. M., McEwan, N., Dawson, S., & Williams, N. J. (2018). Impact of systemic

antimicrobial therapy on mucosal staphylococci in a population of dogs in Northwest England. *Veterinary dermatology*, 29(3), 192–e70. DOI:10.1111/vde.12538

215. Ventrella, G., Moodley, A., Grandolfo, E., Parisi, A., Corrente, M., Buonavoglia, D., & Guardabassi, L. (2017). Frequency, antimicrobial susceptibility and clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in canine clinical samples submitted to a veterinary diagnostic laboratory in Italy: A 3-year retrospective investigation. *Veterinary microbiology*, 211, 103–106. DOI:10.1016/j.vetmic.2017.09.015

216. Стрoїч, В. В., Горюк, Ю. В. (2023). Ідентифікація мікробіоти шкіри здорових собак та за піодермії. Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки, 25(110), 46-53. DOI:10.32718/nvlvet11008

217. Morrissey, I., Moyaert, H., de Jong, A., El Garch, F., Klein, U., Ludwig, C., Thiry, J., & Youala, M. (2016). Antimicrobial susceptibility monitoring of bacterial pathogens isolated from respiratory tract infections in dogs and cats across Europe: ComPath results. *Veterinary microbiology*, 191, 44–51. DOI:10.1016/j.vetmic.2016.05.020

218. Bourély, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Leblond, A., Madec, J. Y., Haenni, M., & Gay, E. (2019). Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. *Epidemiology and infection*, 147, e121. DOI:10.1017/S0950268818003278

219. Soimala, T., Lübke-Becker, A., Hanke, D., Eichhorn, I., Feßler, A. T., Schwarz, S., & Eule, J. C. (2020). Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from ocular surfaces of dogs and cats suffering from ophthalmological diseases. *Veterinary microbiology*, 244, 108687. DOI:10.1016/j.vetmic.2020.108687

220. Чемеровська, І. О., Рубленко, І. О. (2023) Моніторинг мікрофлори за інфекційної патології у собак і котів. Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки, 25(112), 3-15. DOI:10.32718/nvlvet11201

221. Milne, E., Nuttall, T., Marioni-Henry, K., Piccinelli, C., Schwarz, T., Azar, A., Harris, J., Duncan, J., & Cheeseman, M. (2020). Cytological and microbiological characteristics of middle ear effusions in brachycephalic dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 34(4), 1454–1463. DOI:10.1111/jvim.15792
222. Moyaert, H., de Jong, A., Simjee, S., Rose, M., Youala, M., El Garch, F., Vila, T., Klein, U., Rzewuska, M., & Morrissey, I. (2019). Survey of antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from dogs and cats with respiratory tract infections in Europe: ComPath results. *Journal of applied microbiology*, 127(1), 29–46. DOI:10.1111/jam.14274
223. Paterson G. K. (2021). Genomic epidemiology of the opportunistic pathogen *Staphylococcus coagulans* from companion dogs. *Journal of medical microbiology*, 70(8), 001407. DOI:10.1099/jmm.0.001407
224. Bierowiec, K., Mischczak, M., Korzeniowska-Kowal, A., Wzorek, A., Płókarz, D., & Gamian, A. (2021). Epidemiology of *Staphylococcus pseudintermedius* in cats in Poland. *Scientific reports*, 11(1), 18898. DOI:10.1038/s41598-021-97976-z
225. Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature reviews. Microbiology*, 17(4), 203–218. DOI:10.1038/s41579-018-0147-4
226. de Jong, A., Youala, M., El Garch, F., Simjee, S., Rose, M., Morrissey, I., & Moyaert, H. (2020). Antimicrobial susceptibility monitoring of canine and feline skin and ear pathogens isolated from European veterinary clinics: results of the ComPath Surveillance programme. *Veterinary dermatology*, 31(6), 431–e114. DOI:10.1111/vde.12886
227. Hritcu, O. M., Schmidt, V. M., Salem, S. E., Maciuca, I. E., Moraru, R. F., Lipovan, I., Mareş, M., Solcan, G., & Timofte, D. (2020). Geographical Variations in Virulence Factors and Antimicrobial Resistance Amongst

Staphylococci Isolated From Dogs From the United Kingdom and Romania. *Frontiers in veterinary science*, 7, 414. DOI:10.3389/fvets.2020.00414

228. Kaspar, U., von Lützau, A., Schlattmann, A., Roesler, U., Köck, R., & Becker, K. (2018). Zoonotic multidrug-resistant microorganisms among small companion animals in Germany. *PloS one*, 13(12), e0208364. DOI:10.1371/journal.pone.0208364

229. Moyaert, H., Morrissey, I., de Jong, A., El Garch, F., Klein, U., Ludwig, C., Thiry, J., & Youala, M. (2017). Antimicrobial Susceptibility Monitoring of Bacterial Pathogens Isolated from Urinary Tract Infections in Dogs and Cats Across Europe: ComPath Results. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 23(3), 391–403. DOI:10.1089/mdr.2016.0110

230. Haag, A. F., Fitzgerald, J. R., & Penadés, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology spectrum*, 7(3), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019. DOI:10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019

231. Netsvyetayeva, I., Fraczek, M., Piskorska, K., Golas, M., Sikora, M., Mlynarczyk, A., Swoboda-Kopec, E., Marusza, W., Palmieri, B., & Iannitti, T. (2014). *Staphylococcus aureus* nasal carriage in Ukraine: antibacterial resistance and virulence factor encoding genes. *BMC infectious diseases*, 14, 128. DOI:10.1186/1471-2334-14-128

232. Salmanov, A., Shcheglov, D., Artyomenko, V., Svyrydiuk, O., Maliarchuk, R., Bortnik, I., Mamonova, M., Korniyenko, S., Rud, V., Gudym, M., Shuba, V., & Loskutov, O. (2023). Nosocomial transmission of multi-drug-resistant organisms in Ukrainian hospitals: results of a multi-centre study (2019-2021). *The Journal of hospital infection*, 132, 104–115. DOI:10.1016/j.jhin.2022.12.008

233. Salmanov, A. G., Terekhov, V. A., Voloshynovych, N. S., Hrynychuk, O. B., Ishchak, O. M., Rud, V. O., & Kolesnik, A. V. (2022). Healthcare-associated tubo-ovarian infections in ukraine: results of a multicenter study (2020-2022). *Wiadomości Lekarskie*, 75(8), 2003–2009. Internet Archive. DOI:10.36740/wlek202208211

234. Пономаренко, А. М., Салманов, А. Г., (2013) Епідеміологія Антибіотикорезистентності Нозокоміальних Штамів *Staphylococcus Aureus* в Україні: Результати Багатоцентрових Досліджень, Науковий Журнал МОЗ України 2, 60.
235. Bergot, M., Martins-Simoes, P., Kilian, H., Châtre, P., Worthing, K. A., Norris, J. M., Madec, J. Y., Laurent, F., & Haenni, M. (2018). Evolution of the Population Structure of *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *Frontiers in microbiology*, 9, 3055. DOI:10.3389/fmicb.2018.03055
236. Chehabi, C. N., Nonnemann, B., Astrup, L. B., Farre, M., & Pedersen, K. (2019). In vitro Antimicrobial Resistance of Causative Agents to Clinical Mastitis in Danish Dairy Cows. *Foodborne pathogens and disease*, 16(8), 562–572. DOI:10.1089/fpd.2018.2560
237. Nonnemann, B., Lyhs, U., Svennesen, L., Kristensen, K. A., Klaas, I. C., & Pedersen, K. (2019). Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of dairy science*, 102(3), 2515–2524. DOI:10.3168/jds.2018-15424
238. Pascu, C., Herman, V., Iancu, I., & Costinar, L. (2022). Etiology of Mastitis and Antimicrobial Resistance in Dairy Cattle Farms in the Western Part of Romania. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(1), 57. DOI:10.3390/antibiotics11010057
239. Vakkamäki, J., Taponen, S., Heikkilä, A. M., & Pyörälä, S. (2017). Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta veterinaria Scandinavica*, 59(1), 33. DOI:10.1186/s13028-017-0301-4
240. Thomas, V., de Jong, A., Moyaert, H., Simjee, S., El Garch, F., Morrissey, I., Marion, H., & Vallé, M. (2015). Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *International journal of antimicrobial agents*, 46(1), 13–20. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2015.03.013

241. Salat, O., Lemaire, G., Durel, L., & Perrot, F. (2023). Etiology of severe mastitis in French dairy herds. *PloS one*, 18(12), e0295614. DOI:10.1371/journal.pone.0295614
242. Elias, L., Balasubramanyam, A. S., Ayshpur, O. Y., Mushtuk, I. U., Sheremet, N. O., Gumeniuk, V. V., Musser, J. M. B., & Rogovskyy, A. S. (2020). Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli* Isolated from Mastitic Dairy Cattle in Ukraine. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(8), 469. DOI:10.3390/antibiotics9080469
243. Zaatout, N., & Hezil, D. (2022). A meta-analysis of the global prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. *Journal of applied microbiology*, 132(1), 140–154. DOI:10.1111/jam.15192
244. Beça, N., Bessa, L. J., Mendes, Â., Santos, J., Leite-Martins, L., Matos, A. J., & da Costa, P. M. (2015). Coagulase-Positive *Staphylococcus*: Prevalence and Antimicrobial Resistance. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 51(6), 365–371. DOI:10.5326/JAAHA-MS-6255
245. Bhooshan, S., Negi, V., & Khatri, P. K. (2020). *Staphylococcus pseudintermedius*: an undocumented, emerging pathogen in humans. *GMS hygiene and infection control*, 15, Doc32. DOI:10.3205/dgkh000367
246. James, A. L., Perry, J. D., Chilvers, K., Robson, I. S., Armstrong, L., & Orr, K. E. (2000). Alizarin-beta-D-galactoside: a new substrate for the detection of bacterial beta-galactosidase. *Letters in applied microbiology*, 30(4), 336–340. DOI:10.1046/j.1472-765x.2000.00669.x
247. Carricajo, A., Treny, A., Fonsale, N., Bes, M., Reverdy, M. E., Gille, Y., Aubert, G., & Freydiere, A. M. (2001). Performance of the chromogenic medium CHROMagar *Staph Aureus* and the Staphychrom coagulase test in the detection and identification of *Staphylococcus aureus* in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 39(7), 2581–2583. DOI:10.1128/JCM.39.7.2581-2583.2001
248. Gaillot, O., Wetsch, M., Fortineau, N., & Berche, P. (2000). Evaluation of CHROMagar *Staph. aureus*, a new chromogenic medium, for isolation and

presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 38(4), 1587–1591. DOI:10.1128/JCM.38.4.1587-1591.2000

249. Sirobhushanam, S., Parsa, N., Reed, T. J., & Kahlenberg, J. M. (2019). Chromagar™ requires secondary confirmation strategies to minimize false positive/negative results for detection of *Staphylococcus aureus*. *Journal of microbiological methods*, 161, 71–73. DOI:10.1016/j.mimet.2019.04.013

250. Іщенко, В. Д., Волощук, Н. М., Стерлікова, О. М., Гуменюк, Л. В., Скляр, В. В., Калакайло, Л. І., Іщенко, Я. А., Іщенко, Л. М. (2019). Внутрішньолабораторна апробація праймерів для молекулярно-генетичної ідентифікації грибів роду *Fusarium* Link. *Наукові доповіді НУБіП України*, 6(82). DOI:10.31548/dopovidi2019.06.017

251. Ulrich, S., Gottschalk, C., Straubinger, R. K., Schwaiger, K., & Dörfelt, R. (2020). Acceleration of the identification of sepsis-inducing bacteria in cultures of dog and cat blood. *The Journal of small animal practice*, 61(1), 42–45. DOI:10.1111/jsap.13056

252. Коваленко В. Л., Гаркавенко Т.О., Горбатюк О. І., Козицька Т. Г., Гаркавенко В. М., Ординська Д. О. (2019) Визначення бактерицидної активності та контролю відсутності бактериостатичного ефекту дезінфікуючих засобів: методичні рекомендації. К., 28 с.

253. Jantorn, P., Heemamad, H., Soimala, T., Indoung, S., Saising, J., Chokpaisarn, J., Wanna, W., Tipmanee, V., & Saeloh, D. (2021). Antibiotic Resistance Profile and Biofilm Production of *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs in Thailand. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(6), 592. DOI:10.3390/ph14060592

254. Othmany, R. E., Zahir, H., Zhanane, C., Mazigh, D., Ellouali, M., & Latrache, H. (2021). Adaptation of Congo Red Agar Method and Microtiter Plate Assay to Study Biofilm Formation in *Streptomyces*. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 18(1), 113–123. Portico. DOI:10.13005/bbra/2901

255. Bostanghadiri, N., Ardebili, A., Ghalavand, Z., Teymouri, S., Mirzarazi, M., Goudarzi, M., Ghasemi, E., & Hashemi, A. (2021). Antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-associated genes among *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *BMC research notes*, 14(1), 151. DOI:10.1186/s13104-021-05567-y
256. Casagrande Proietti, P., Stefanetti, V., Hyatt, D. R., Marenzoni, M. L., Capomaccio, S., Coletti, M., Bietta, A., Franciosini, M. P., & Passamonti, F. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* for biofilm formation. *The Journal of veterinary medical science*, 77(8), 945–951. DOI:10.1292/jvms.15-0043
257. Luo, W., Zhong, B. L., & Chiu, H. F. (2021). Prevalence of depressive symptoms among Chinese university students amid the COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology and psychiatric sciences*, 30, e31. DOI:10.1017/S2045796021000202
258. Wang, Z., Guo, L., Li, J., Li, J., Cui, L., Dong, J., Meng, X., Qian, C., & Wang, H. (2022). Antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence factors of isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from healthy dogs and dogs with keratitis. *Frontiers in veterinary science*, 9, 903633. DOI:10.3389/fvets.2022.903633
259. Šmitran, A., Sladojević, Ž., Božić, L., Gajić, I., Marković, T., Kasagić, D., Subić, I., Katalina, G., & Golić, B. (2023). Comparison of biofilm production and virulence genes distribution among human and canine isolates of *Staphylococcus aureus*. *Iranian journal of veterinary research*, 24(1), 74–80. DOI:10.22099/IJVR.2022.43373.6331
260. Andrade, M., Oliveira, K., Morais, C., Abrantes, P., Pomba, C., Rosato, A. E., Couto, I., & Costa, S. S. (2022). Virulence Potential of Biofilm-Producing *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus coagulans* Causing Skin Infections in Companion Animals. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(10), 1339. DOI:10.3390/antibiotics11101339

261. Gajewska, J., & Chajęcka-Wierzchowska, W. (2020). Biofilm Formation Ability and Presence of Adhesion Genes among Coagulase-Negative and Coagulase-Positive Staphylococci Isolates from Raw Cow's Milk. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(8), 654. DOI:10.3390/pathogens9080654
262. Shah, M. S., Qureshi, S., Kashoo, Z., Farooq, S., Wani, S. A., Hussain, M. I., Banday, M. S., Khan, A. A., Gull, B., Habib, A., Khan, S. M., & Dar, B. A. (2019). Methicillin resistance genes and in vitro biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 64, 117–124. DOI:10.1016/j.cimid.2019.02.009
263. Silva, V., Correia, E., Pereira, J. E., González-Machado, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2022). Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* from Pets, Livestock, and Wild Animals: Relationship with Clonal Lineages and Antimicrobial Resistance. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(6), 772. DOI:10.3390/antibiotics11060772
264. François, P., Schrenzel, J., & Götz, F. (2023). Biology and Regulation of Staphylococcal Biofilm. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5218. DOI:10.3390/ijms24065218
265. Abouelkhair, M. A., Bemis, D. A., Giannone, R. J., Frank, L. A., & Kania, S. A. (2018). Characterization of a leukocidin identified in *Staphylococcus pseudintermedius*. *PloS one*, 13(9), e0204450. DOI:10.1371/journal.pone.0204450
266. Pitchenin, L. C., Brandão, L. N. S., Rosa, J. M. A., Kagueyama, F. C., Alves, A. D. S., Rocha, Í. S. M., Nakazato, L., & Dutra, V. (2018). Occurrence of toxin genes in *Staphylococcus pseudintermedius* from diseased dogs and other domestic and wild species. *Journal of infection in developing countries*, 11(12), 957–961. DOI:10.3855/jidc.8261
267. EMBL-EBI homepage | EMBL-EBI. URL: <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo> (дата звернення: 25.03.2024).
268. Web of Science. Clarivate. URL: <https://www.webofscience.com/wos/op/publications/add>

269. Europe PMC. Europe PMC. URL: <https://europepmc.org/>
270. Наукова періодика України. URL: <http://www.irbisnbuv.gov.ua/>
271. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України від 21.02.2006 р. № 3447-IV : станом на 6 листоп. 2023 р. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>
272. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. ECOLEX | The gateway to environmental law. URL: <https://www.ecolex.org/details/treaty/european-convention-for-the-protection-of-vertebrate-animals-used-for-experimental-and-other-scientific-purposes-tre-001042/>
273. Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах : Наказ МОН, молоді та спорту України від 01.03.2012 р. № 249. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12#Text>

ДОДАТКИ

Додаток А

Культуральні та ферментативні властивості ізолятів стафілококів

Таблиця А 1. Культуральні та ферментативні властивості *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* виділених від хворих котів та собак

№	Вид тварини	Ділянка відбору	Коагулаза	Капаза	Оксидаза	Ферментация маніта	Поліміксин Б	Фогес проскауер	Ріст на CHROagar orientetion	Ріст на CHROagar стафілококус
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Staph. pseudintermedius</i>										
617	Собака	Шкіра	+	+	-	+	14	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
623	Собака	Ніс	+	+	-	+	15	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
636	Собака	Шкіра	+	+	-	+	15	Слабкопозитивно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
789	Собака	Вухо	+	+	-	+	14	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
854	Собака	Вухо	+	+	-	+	15	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
884	Собака	Вухо	+	+	-	+	14	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
969	Собака	Шкіра	+	+	-	+	16	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
1138	Кіт	Ніс	+	+	-	+	16	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
1244	Собака	Око	+	+	-	+	16	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
1245	Собака	Шкіра	+	+	-	+	16	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення

Продовження додатку А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1246	Собака	Шкіра	+	+	-	+	15	Негативно	Рожеве забарвлення,	Сіро-блакитне забарвлення
1585	Собака	Молоко	+	+	-	+	16	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
1681	Собака	Вухо	+	+	-	+	14	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
1754	Собака	Шкіра	+	+	-	+	16	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
1758	Кіт	Шкіра	+	+	-	+	15	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
1759	Собака	Шкіра	+	+	-	+	16	Слабкопозитивно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
1884	Собака	Шкіра	+	+	-	+	14	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
1759	Собака	Шкіра	+	+	-	+	16	Слабкопозитивно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
1884	Собака	Шкіра	+	+	-	+	14	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
1933	Собака	Шкіра	+	+	-	+	16	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
2049	Собака	Шкіра	+	+	-	+	16	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
2369	кішка	Око	+	+	-	+	15	Негативно	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення

Продовження додатку А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2494	кіт	Вухо	+	+	-	+	15	Негативн о	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
2672	Собака	Шкіра	+	+	-	+	16	Негативн о	Рожеве забарвлення	Сіро-блакитне забарвлення
819	Собака	Шкіра	+	+	-	+	9	Позитивн а	Жовте забарвлення	Рожеве забарвлення
885	Кіт	Шкіра	+	+	-	+	10	Позитивн а	Жовте забарвлення	Рожеве забарвлення
1051	Собака	Шкіра	+	+	-	+	10	Позитивн а	Жовте забарвлення	Рожеве забарвлення
1059	Собака	Шкіра	+	+	-	+	10	Позитивн а	Жовте забарвлення	Рожеве забарвлення
2368	Кіт	Шкіра	+	+	-	+	9	Позитивн а	Жовте забарвлення	Рожеве забарвлення
2817	собака	Око	+	+	-	+	10	Позитивн а	Жовте забарвлення	Рожеве забарвлення

Таблиця А 2. Культуральні та ферментативні властивості *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* виділених від клінічно здорових собак

№	Вид тварини	Ділянка відбору	Коагулаза	Каталаза	Оксидаза	Ферментативна маніта	Ріст на CHROagar orientetion	Оксацалін	Полімік син Б
239	Собака	Ніс	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	0	14
217	Собака	Вуха	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	29	15
115	Собака	Вуха	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	28	16
130	Собака	Вуха	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	22	14
180	Собака	Вуха	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	25	16
202	Собака	Вуха	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	26	15
235	Собака	Ніс	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	27	16
250	Собака	Ніс	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	25	15
112	Собака	Вуха	+	+	-	+	Жовте забарвлення	23	9
127	Собака	Вуха	+	+	-	+	Жовте забарвлення	25	10
205	Собака	Ніс	+	+	-	+	Жовте забарвлення	24	9
233	Собака	Ніс	+	+	-	+	Жовте забарвлення	20	10

Таблиця А 3. Культуральні та ферментативні властивості *Staph. aureus* та виділень з молока хворих на мастит корів

№	Вид тварини	Форма маститу	Асоціація збудника	Коагулаза	Кага лаза	Оксидаза	Ферментативність	Ріст на CHROagar mastitis	Ріст на CHROagar orientation
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Корова	Субклінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
2	Корова	Субклінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
3	Корова	Субклінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
4	Корова	Субклінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
5	Корова	Субклінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
6	Корова	Субклінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
7	Корова	Субклінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
8	Корова	Субклінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
9	Корова	Субклінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
10	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
11	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
12	Корова	Клінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
13	Корова	Клінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
14	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення

Продовження додатку А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
15	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
16	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
17	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
18	Корова	Клінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
19	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
20	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
21	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
22	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
23	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
24	Корова	Клінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
25	Корова	Клінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
26	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
27	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
28	Корова	Клінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
29	Корова	Клінічний	Моноінфекція	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення
30	Корова	Клінічний	Асоціація збудників	+	+	-	+	Рожеве забарвлення	Жовте забарвлення

Додаток Б

Протокол випробувань з використанням методу Ідентифікація мікроорганізмів за допомогою MALDI-TOF



201864
ДСТУ ISO/IEC 17025

ВЦ ТОВ "Експертний центр діагностики та лабораторного супроводу "Біолайтс",
вул. Ялтинська, буд. 5-6, м. Київ, 02099
Місце проведення випробувань: м. Тернопіль, вул. Подільська, 46
Відділ прийому зразків: +38 096 054 86 57, zrazky@bls.com.ua, www.biolights.ua

* – Позначення методики (НД), що входить до сфери акредитації на відповідність ДСТУ ISO/IEC 17025.

Протокол випробувань № 4192/23

від 25.10.2023

Замовник: Шевченко Максим Віталійович
Адреса: м. Біла Церква, Героїв Чорнобиля 5
Власник зразків: Шевченко Максим Віталійович
Супровідна: б/н від 24.10.2023
Дата отримання: 25.10.2023
Кількість зразків: 2
Перелік матеріалу, що надіслано для випробування: Культура №1. (Чиста культура). 1246
Культура №2. (Чиста культура). 2368
Дата проведення випробувань: 25.10.2023

Результати випробувань:

Назва показників, одиниці вимірювань	Результати випробувань	Позначення НД на методи випробувань	Невизначеність вимірювання
1	2	3	4
Зразок: №4192/1/23 Культура №1. (Чиста культура). 1246 Вид та стан упаковки: чашка Петрі.			
Ідентифікація мікроорганізмів за допомогою MALDI-TOF	Виявлено Staphylococcus pseudintermedius	ПВ.БЛС.7.2-09/10 (MALDI-TOF)*	Не визначалась
Зразок: №4192/2/23 Культура №2. (Чиста культура). 2368 Вид та стан упаковки: чашка Петрі.			
Ідентифікація мікроорганізмів за допомогою MALDI-TOF	Виявлено Staphylococcus pseudintermedius	ПВ.БЛС.7.2-09/10 (MALDI-TOF)*	Не визначалась

Примітки:

- Чутливість методу (зазначається, при потребі, у стовпці «Результати випробувань»).
- Невизначеність вимірювання не визначалась згідно СОПБЛС 7.8-01.
- Лабораторія не несе відповідальності за інформацію, що надана замовником.

Результати випробувань стосуються зразку, що пройшов випробування. Цей протокол випробувань не може бути відтворений, тиражований та розповсюджений, повністю чи частково, як офіційний документ без дозволу керівництва ТОВ «Експертний центр БІОЛАЙТС».

Відповідальна особа
ТОВ «Експертний центр БІОЛАЙТС»



Івасюк Н. В.

Цей протокол є скороченим.
Кінець протоколу випробувань.



ЕКСПЕРТНИЙ ЦЕНТР ДІАГНОСТИКИ
ТА ЛАБОРАТОРНОГО СУПРОВОДУ

ПФ.БЛС 7.8-03/видання 05/від 04.10.2021

Аутентичність Протоколу випробувань можна перевірити в Інтернеті: <https://bls.lims.com.ua/protocol/check/1838940160>

Сторінка 1 з 2

Додаток В

Діаметр зон затримки росту

Таблиця В 1. Зони затримки росту навколо диску з антибіотиком ізолятів *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* виділених від хворих собак та котів

№	Вид тварини	Оксацілін	Цефтріаксон	Гентаміцин	Триміприм сульфаметоксазол	Пеніцилін	Тетрациклін	Ерітроміцин	Амоксицилін та клавулонова кислота	Ципрофлоксацин
1	2	4		5	6	7	8	9	10	11
<i>Staph. pseudintermedius</i>										
617	Собака	22	25	22	0	25	26	26	24	-
623	Собака	29	30	20	0	30	25	0	24	-
636	Собака	24	24	0	0	0	15	10	27	-
789	Собака	26	22	30	20	30	30	28	26	-
854	Собака	27	25	24	14	30	20	26	25	-
884	Собака	22	28	25	18	36	21	24	29	10
969	Собака	20	25	24	17	27	24	24	25	-
1138	Кіт	21	30	15	11	42	15	25	22	21
1244	Собака	22	25	21	8	35	25	25	23	-
1245	Собака	26	25	21	18	38	24	29	28	-
1246	Собака	24	31	21	17	5	20	0	28	-
1585	Собака	22	26	21	14	37	25	25	28	0
1681	Собака	20	26	20	18	30	30	24	32	-
1754	Собака	20	25	24	10	35	22	25	28	-
1758	Кіт	20	31	20	20	30	30	27	30	-
1759	Собака	22	28	20	16	28	26	26	31	-
1884	Собака	23	25	17	0	36	27	21	30	-
1933	Собака	24	23	20	0	34	34	22	28	21

1	2	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Staph. pseudintermedius</i>									
2049	Собака	23	24	28	1	35	22	29	21
2369	Кіт	29	25	26	17	31	25	30	15
2494	Кіт	28	28	26	14	30	25	28	-
2672	Собака	24	28	25	0	0	2	30	30
<i>Staph. aureus</i>									
819	Собака	20	25	24	0	7	0	24	-
885	Кіт	26	28	23	14	32	30	29	21
1051	Собака	28	30	17	17	14	28	23	0
1059	Собака	20	30	16	16	22	30	21	23
2368	Кіт	28	25	20	13	40	24	27	19
2817	Собака	22	25	22	12	35	27	29	21

Таблиця В 2 Зони затримки росту навколо диску з антибіотиком ізолятів *Staph. aureus* виділених з молока хворих на мастит корів

№	Форма маститу	Амоксицилін	Цефалексин	Кліндаміцин	Тетрациклі	Канаміцин	Ципрофлоксацін
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Субклінічний	0	0	20	26	10	20
2	Субклінічний	14	25	24	22	25	25
3	Субклінічний	15	24	24	23	24	30
4	Субклінічний	10	25	0	20	24	15
5	Субклінічний	0	26	23	25	25	51
6	Субклінічний	17	23	23	23	20	28
7	Субклінічний	22	23	25	15	20	50

Продовження додатку В

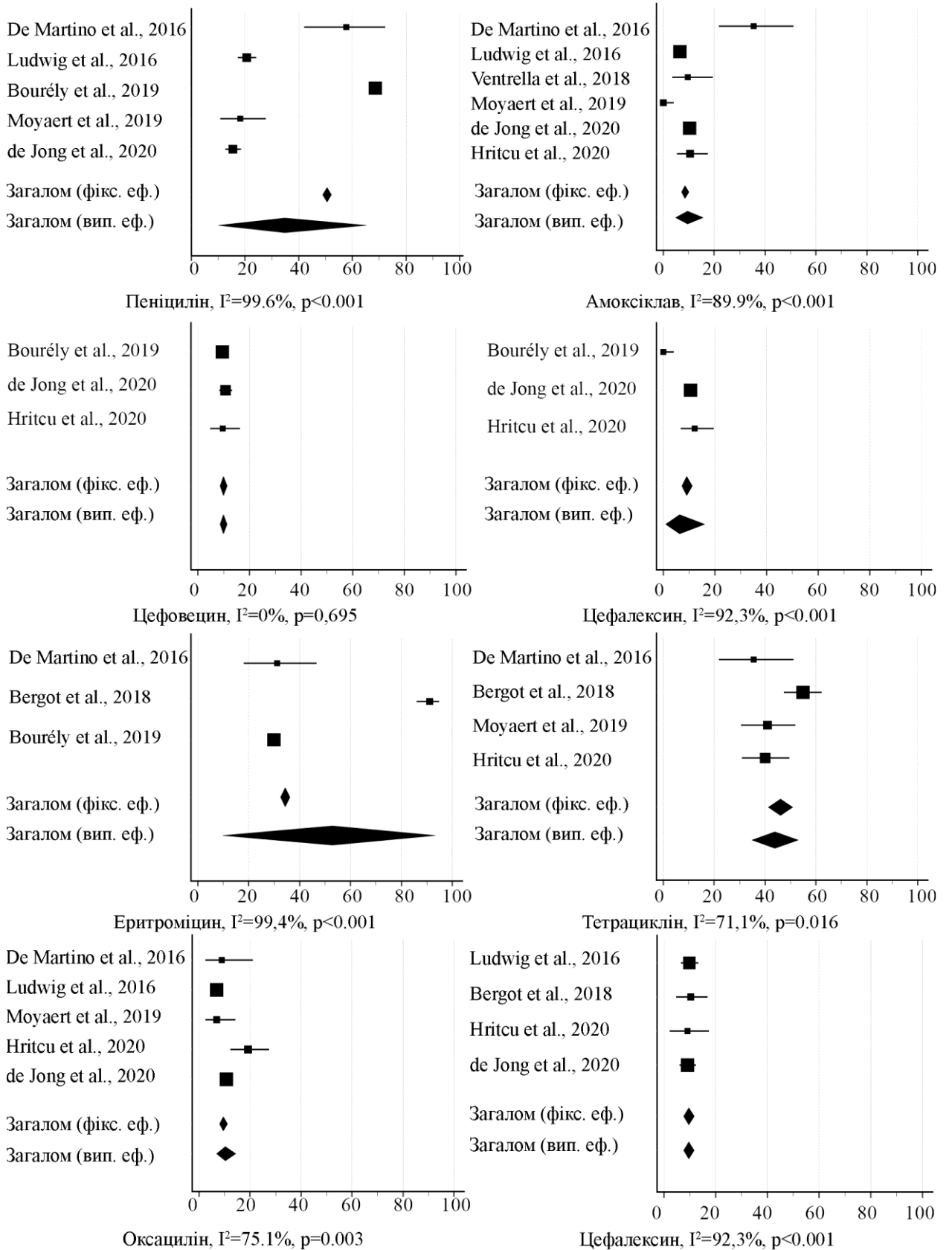
1	2	3	4	5	6	7	8
8	Субклінічний	15	18	15	25	21	35
9	Субклінічний	25	28	29	24	21	50
10	Клінічний	16	14	23	27	17	48
11	Клінічний	20	23	23	25	22	18
12	Клінічний	23	23	10	25	25	47
13	Клінічний	18	25	25	10	23	51
14	Клінічний	25	24	25	27	25	55
15	Клінічний	22	26	24	25	23	45
16	Клінічний	12	15	24	0	15	28
17	Клінічний	10	29	25	22	22	29
18	Клінічний	23	25	23	23	22	27
19	Клінічний	9	23	26	25	21	50
20	Клінічний	0	12	23	11	23	26
21	Клінічний	25	26	23	25	25	0
22	Клінічний	8	15	25	23	19	51
23	Клінічний	10	25	0	23	22	35
24	Клінічний	20	24	25	25	8	38
25	Клінічний	21	27	24	25	10	35
26	Клінічний	0	0	25	24	25	0
27	Клінічний	0	27	24	23	25	52
28	Клінічний	21	25	24	17	22	50
29	Клінічний	9	28	25	23	23	20
30	Клінічний	22	25	14	25	22	53

Результати систематичного огляду та мета-аналізу

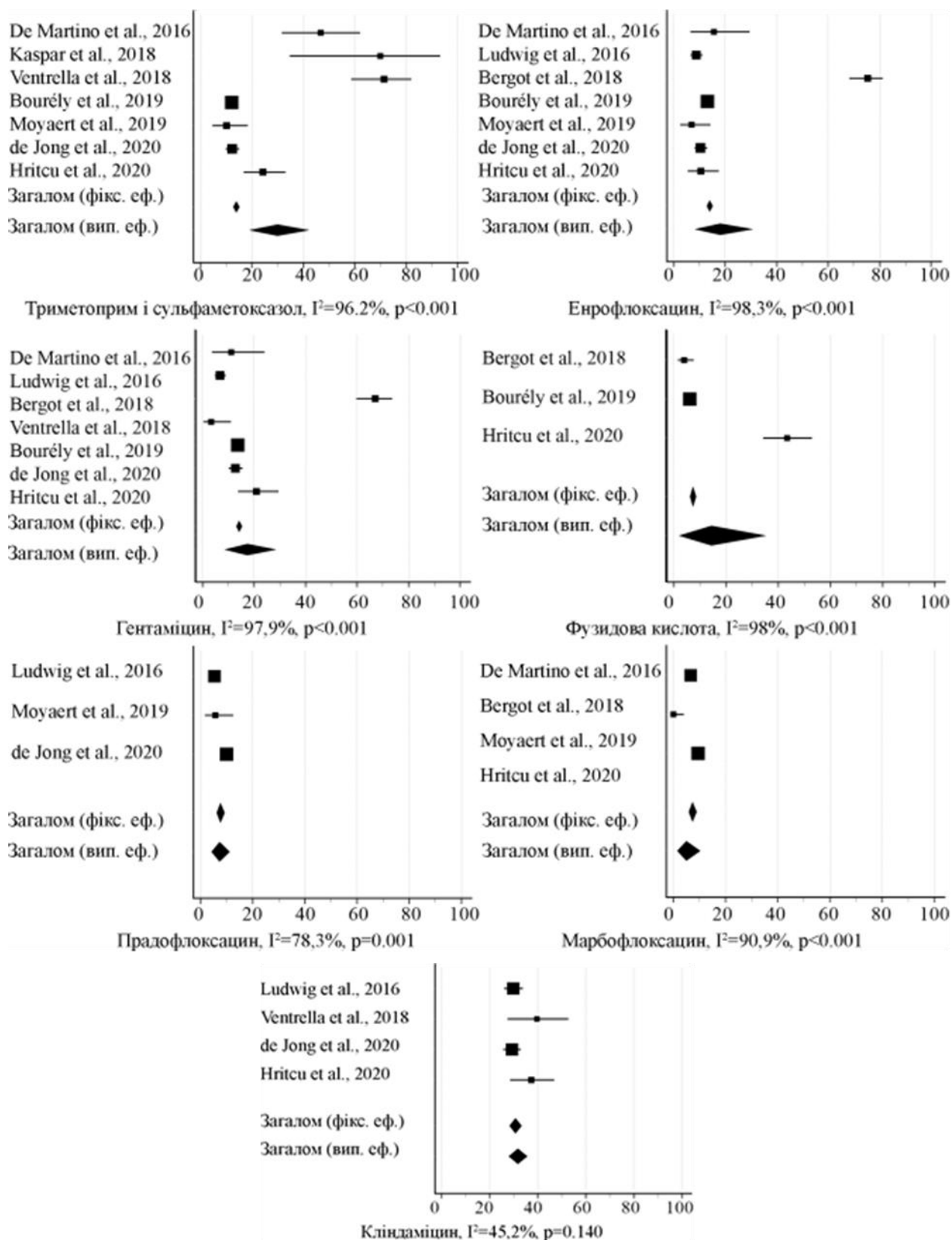
Таблиця Г 1. Характеристика публікацій відібраних для мета-аналізу

Вид тварин	Джерело зразків	Вид бактерій	Кількість проб	Досліджені антибіотики	Метод визначення стійкості до антибіотиків	Посилання
Собаки	Клінічний отит	<i>S. pseudintermedius</i>	45	PEN, OXA, AMC, CRO, NOR, ENR, GEN, KAN, NEO, STR, VAN, ERY, VAC, DOX, TET, LIN, SXT	Дифузія в агар	[114]
Собаки, коти	Носові ходи, ураження різних частин тіла	<i>S. aureus</i>	53	KAN, TET, GEN, ERY, CLN, FUS, SXT, RIM	Дифузія в агар	[209]
Собаки, коти	Піодермія та ранові інфекції	<i>S. pseudintermedius</i> <i>S. aureus</i>	556 45	PEN, AMX, AMP, OXA, CLN, CHL, GEN, ENR, MBF, ORB, PRA	Мінімальна інгібуюча концентрація	[217]
Собаки	Шкіра, ух, сечова система, ВДХ	<i>S. pseudintermedius</i>	63	SXT, CLI, CIP, DOX, GEN, AMC	Дифузія в агар	[215]
Собаки, коти	Верхні дихальні шляхи	<i>S. pseudintermedius</i> <i>S. aureus</i>	88 23	PEN, OXA, SXT, TET, ENR, PRA	Мінімальна інгібуюча концентрація	[221]
Собаки	Клінічний отит	<i>S. pseudintermedius</i> <i>S. aureus</i>	2513 294	PEN, SXT, ENR, CVN, GEN, ERY, FUS	Дифузія в агар	[218]
Собаки, коти	Піодермія та ранові інфекції	<i>S. pseudintermedius</i> <i>S. aureus</i>	618 66	AMC, AMP, CEF, CEX, CVN, OXA, PEN, CLN, CHL, GEN, ENR, MBF, ORB, PRA, SXT	Мінімальна інгібуюча концентрація	[225]
Собаки, коти	Передні носові ходи	<i>S. pseudintermedius</i>	115	OXA, CVN, CFX, AMC, CLN, SXT, GEN, TET, CHL, ENR, FUS	Дифузія в агар	[226]

Рисунок Г 1. Візуалізація даних мета-аналізу стійкості *Staph. pseudintermedius* до антибіотиків

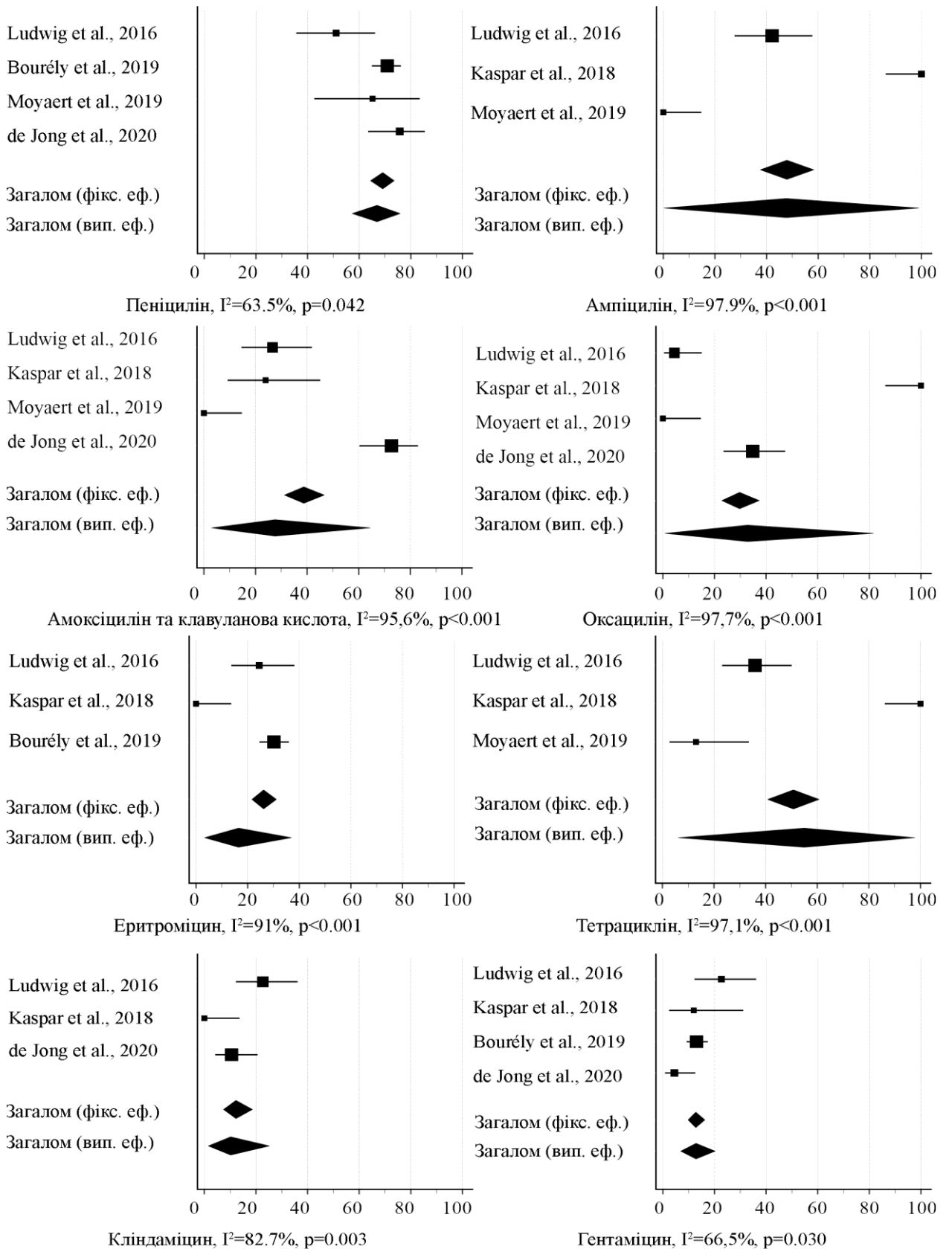


Продовження додатку Г

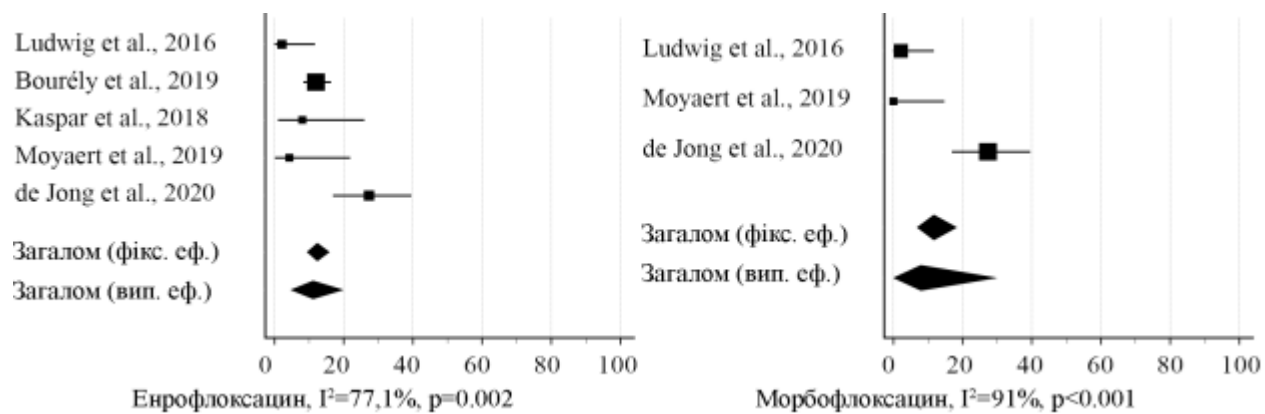


Продовження додатку Г

Рисунок Г 2. Візуалізація даних мета-аналізу стійкості *Staph. aureus* до антибіотиків



Продовження додатку Г



Фактори патогенності ізолятів стафілококів

Таблиця Д 1. Фактори патогенності та показники щільності біоплівки ізолятів *Staph. pseudintermedius* виділених від хворих собак та котів

№	Вид тварини	Гени міжклітинної адгезії	Гени ексфоліативно го токсину	Гени лейктотоксину	Вимірювання 1, ODS90	Вимірювання 2, ODS90	Вимірювання 3, ODS90
617	Собака	<i>icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,424	0,541	0,752
623	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	1,149	0,946	0,866
636	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,372	0,352	0,379
789	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,817	1,072	0,985
854	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,680	0,458	0,477
884	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,741	0,824	0,986
969	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,804	0,515	0,485
1138	Кіт	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,368	0,471	0,336
1244	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,818	0,713	1,069
1245	Собака	<i>icaA</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,320	0,258	0,308
1246	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,289	0,208	0,380
1585	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,269	0,235	0,274
1681	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,419	0,630	0,485
1754	Собака	<i>icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,266	0,317	0,274
1758	Кіт	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,370	0,589	0,373
1759	Собака	<i>icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,393	0,330	0,247
1884	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,278	0,569	0,372
1933	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,478	0,341	0,544
2049	Собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	1,197	1,129	1,248
2369	Кіт	<i>icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,252	0,339	0,316
2494	Кіт	<i>icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukF</i>	0,598	0,408	0,407
2672	собака	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukF</i>	0,495	0,523	0,542

Таблиця Д 2. Показники щільності біоплівки ізолятів *Staph. aureus* виділених від хворих собак та котів

№	Вид тварини	Вимірювання 1	Вимірювання 2	Вимірювання 3
819	Собака	1,261	1,159	2,435
885	Кіт	0,490	0,320	0,485
1051	Собака	0,474	0,336	0,271
1059	Собака	0,335	0,463	0,560
2368	Кіт	0,441	0,330	0,386
2817	Собака	0,266	0,286	0,264

Таблиця Д 3. Фактори патогенності та показники щільності біоплівки ізолятів *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* виділених клінічно здорових собак

Вид тварини	Ділянка ізоляції	Зона затримки росту навколо диску з оксациліном	Гени міжклітинної адгезії	Гени ексфоліативного токсину	Гени лейктотоксини	Вимірювання 1, OD590	Вимірювання 2, OD590	Вимірювання 3, OD590
<i>Staph. pseudintermedius</i>								
Собака	Ніс	0	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,833	0,928	0,826
Собака	Вухо	29	<i>icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,221	0,245	0,321
Собака	Вухо	28	<i>NG</i>	<i>siet</i>	<i>lukF</i>	0,231	0,204	0,238
Собака	Вухо	22	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,762	0,715	0,751
Собака	Вухо	25	<i>icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,522	0,470	0,548
Собака	Вухо	26	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,457	0,419	0,363
Собака	Ніс	27	<i>icaA</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,238	0,244	0,318
Собака	Ніс	25	<i>icaA+icaD</i>	<i>siet</i>	<i>lukS+lukF</i>	0,310	0,367	0,346
<i>Staph. aureus</i>								
Собака	Вухо	23	–	–	–	0,278	0,261	0,245
Собака	Вухо	25	–	–	–	0,387	0,434	0,480
Собака	Ніс	24	–	–	–	0,858	0,777	0,753
Собака	Ніс	20	–	–	–	0,313	0,398	0,333

Таблиця Д 4. Показники щільності біоплівки ізольованих з молока хворих на мастит корів

№	Вид тварини	Форма маститу	Вимірювання 1, OD590	Вимірювання 2, OD590	Вимірювання 3, OD590
1	Корова	Субклінічний	0,45	0,409	0,425
8	Корова	Субклінічний	1,005	1,124	1,148
10	Корова	Клінічний	0,221	0,239	0,214
16	Корова	Клінічний	1,358	1,401	1,387
20	Корова	Клінічний	0,556	0,696	0,374
22	Корова	Клінічний	0,855	0,897	0,905
26	Корова	Клінічний	0,6	0,632	0,645

Додаток Е

Відсеквеновані послідовності двох ізолятів *Staph. pseudintermedius*
Staphylococcus pseudintermedius strain SP11 thermonuclease gene, partial
 cds

GenBank: OR555770.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS OR555770 866 bp DNA linear BCT 21-OCT-2023

DEFINITION *Staphylococcus pseudintermedius* strain SP11 thermonuclease gene,
 partial cds.

ACCESSION OR555770

VERSION OR555770.1

KEYWORDS .

SOURCE *Staphylococcus pseudintermedius*

ORGANISM [Staphylococcus pseudintermedius](#)

Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae;

Staphylococcus; *Staphylococcus intermedius* group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 866)

AUTHORS Shevchenko,M. and Tsarenko,T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-SEP-2023) Department of epizootology and infectious
 diseases, BILA TSERKVA NATIONAL AGRARIAN UNIVERSITY, Soborna
 Square, 8/1, Bila Tserkva 09117, Ukraine

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..866

/organism="*Staphylococcus pseudintermedius*"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="SP11"

/isolation_source="healthy animal"

/db_xref="taxon:[283734](#)"

/country="Ukraine"

/PCR_primers="fwd_name: pse-f2, fwd_seq:

trggcagtaggattcgtaa, rev_name: pse-r5, rev_seq:

cttttgctcymttttgg"

[CDS](#) 400..>866

/codon_start=1

/transl_table=[11](#)

/product="thermonuclease"

/protein_id="[WOC30847.1](#)"

/translation="MKKITTGVLILVIAIVVLIFQYINGDGPFKSSTDVRGESYLVK

RVIDGDTIIIDKDGQDERVRLIGVDTPETVKPNTVPYQPYGKAASNFTKKHLTNQRVRL
EYDREPKDKYGRTLAYVWLGDEMFINVKLAKEGLARAKFYPPNDKYRILIEQAQ"

ORIGIN

1 tgettatttt tgegactccc ctttttatta atctcagttg ttagtcttat cacgtgatat
61 tattatgagt ttttgaatt acgccgttct ctcttgatt taatgagttg cgtaatgaac
121 ccacctaaaa caccgagtaa tacgccgata aatgcgcctg caatgagagg taagtgaat
181 acatattgca aagcataacc gattatcact gcaacaatca cगतgattag agacagacga
241 ttttactaa aagtctcat tttttggtt cactcctaat cgttttgatt ataacatttt
301 tcactgaaaa gaacagtgtc atatgtgtgt aaaattgacg cttatagtta ggattacata
361 tगतatगतg gtgtaatca tacataaaaa ggagtcgcta tgaaaaaat tacaacaggc
421 gttttaatcc tcgctattgc cattgtcgtt ttaactttc aatatacaaa tggagatggc
481 ccttttaaaa agtcttaac ggatgtgaga ggcgaatcat atctcgtaa acgcgtaatc
541 gatggagata ccattattat cgataaagat gggcaagatg aacgtgtacg cttaattggt
601 gtggatacac cagaaacagt taaaccgaat acgccagtgc aaccatacgg aaaagctgca
661 tcaaatthta caaagaaaca ttaacgaat caactgttta gattggaata tगतcgtgaa
721 ccaaaagata aatacggacg tacattgct tatgtttggt taggagacga aatgtttaat
781 gtaaaattag caaagaagg ttagctaga gccaaatttt atccaccgaa tgataaatat
841 cगतatattga ttgaacaagc ccaaaa

//

Staphylococcus pseudintermedius strain SP17 thermonuclease gene, partial

cds

GenBank: OR555771.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS OR555771 814 bp DNA linear BCT 21-OCT-2023

DEFINITION *Staphylococcus pseudintermedius* strain SP17 thermonuclease gene,
partial cds.

ACCESSION OR555771

VERSION OR555771.1

KEYWORDS .

SOURCE *Staphylococcus pseudintermedius*

ORGANISM [Staphylococcus pseudintermedius](#)

Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae;

Staphylococcus; *Staphylococcus intermedius* group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 814)

AUTHORS Shevchenko,M. and Tsarenko,T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-SEP-2023) Department of epizootology and infectious
diseases, BILA TSERKVA NATIONAL AGRARIAN UNIVERSITY, Soborna
Square, 8/1, Bila Tserkva 09117, Ukraine

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..814

/organism="Staphylococcus pseudintermedius"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="SP17"

/isolation_source="healthy animal"

/db_xref="taxon:[283734](#)"

/country="Ukraine"

/PCR_primers="fwd_name: pse-f2, fwd_seq:

trggcagtaggattcgtaa, rev_name: pse-r5, rev_seq:

cttttgctcymtttgg"

[CDS](#) 399..>814

/codon_start=1

/transl_table=[11](#)

/product="thermonuclease"

/protein_id="[WOC30848.1](#)"

/translation="MKKITTGVLILVIAIVLIFQYINGDGPFKKSSTDVRGESYLVK

RVIDGDTIIIDKDGQDERVRLIGVDTPETVKPNTVPYQPYGKAASNFTKKHLTNQVRVL

EYDREPKDKYGRTLAYVWLGDEMFNVKLAKEGLARA"

ORIGIN

1 gctattttt gcgactcccc ttttattaa tctcagttgt tagtcttacc acgtgatatt
61 attatgagtt tttggaatta cgccgttctc tcttgattt aatgagttgc gtaatgaacc
121 cacctaaaac accgagtaac acgccgataa atgcgcctgc aatgagaggt aagttgaata
181 catattgcaa agcataaccg attatcactg caacaatcac gatgattaga gacagacgat
241 tttcactaaa agtcttcatt ttttggttc actcctaate gttttgatta taacattttt
301 cactgaaaag aacagtgta tatgtgtgta aaattgacgc ttatagttag gattacatat
361 gatatgatgg tgtaaatcat acataaaaag gagtegtat gaaaaaatt acaacaggeg
421 ttttaactct cgctattgcc attgtcgttt taactttca atatatcaat ggagatggcc
481 cttttaaaaa gtcttcaacg gatgtgagag gcgaatcata tctcgttaaa cgcgtaatcg
541 atggagatac cattattatc gataaagatg ggcaaatga acgtgtacgc ttaattggtg
601 tggatacacc agaaacagtt aaaccgaata cgccagtgc accatacggg aaagctgcat
661 caaatttac aaagaacat ttaacgaatc aacgtgttag attggaatat gatcgtgaac
721 caaaagataa atacggacgt acattggctt atgtttggtt aggagacgaa atgtttaatg
781 taaaattagc aaaagaaggt ttagctagag ccaa

//

Результати біоетичної експертизи

Висновок № 3/17

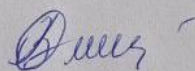
Етичного комітету у БНАУ з питань поводження з тваринами
у наукових дослідженнях та освітньому процесі

Заявка № 3/17 від «27» березня 2024 р. щодо експертизи завершеної науково-дослідної роботи на тему: «Staphylococcus pseudintermedius та Staphylococcus aureus: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність», яка була виконана в рамках виконання дисертаційної роботи.

Заявка, подана на розгляд аспірантом кафедри епізоотології та інфекційних хвороб М.В. Шевченко (науковий керівник кандидат ветеринарних наук, доцент Т.М. Царенко), розглянута Етичним комітетом на засіданні «28» березня 2024 р., Протокол № 17.

Рішення Етичного комітету:
Схвалити проведені дослідження.

Голова:
доктор економічних наук,
професор



Варченко О.М.

Секретар



Пахомова А.О.

«28» березня 2024 р.

Додаток И

Акти та картки зворотного зв'язку про впровадження матеріалів дисертаційної роботи у навчальний процес та наукові дослідження України

Додаток И 1

Затверджую

Директор Інституту ветеринарної
медицини НААН
д-р вет. наук, професор, член-кор НААН
Начис. с. 18

18 грудня 2024 р.

АКТ

**про впровадження/використання результатів
кандидатської дисертаційної роботи
у наукові дослідження**

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана Шевченком Максимом Віталійовичем впроваджено у науково-дослідну роботу Інституту ветеринарної медицини НААН для проведення досліджень, що стосуються ідентифікації, детекції та оцінки збудників стафілококів тварин.

Результати дисертаційної роботи Шевченка Максима Віталійовича щодо поширеності серед тварин, мікробіологічної та молекулярно-генетичної характеристики *Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus* використовуються під час проведення діагностичних мікробіологічних досліджень, а також під час проведення наукових досліджень Лабораторії зоонозних інфекцій та оцінки ризиків та Лабораторії “Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин” (діюча акредитація за стандартом ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019, атестат акредитації № 202302) в Інституті ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України (м. Київ).

Завідувач лабораторії зоонозних інфекцій та оцінки ризиків
Інституту ветеринарної медицини НААН,
канд. вет. наук, ст. наук. співр.

О.А. Тарасов

Завідувач лабораторії
“Науково-дослідний навчальний центр
діагностики хвороб тварин”
Інституту ветеринарної медицини НААН,
канд. вет. наук, доцент

Я.П. Криця

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової та
інноваційної діяльності
Білоцерківського національного
аграрного університету,

 О.М. Варченко

“20” Березня 2024 р.

АКТ
про впровадження/використання результатів
кандидатської дисертаційної роботи
у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Staphylococcus pseudintermedius та Staphylococcus aureus: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана Шевченко Максимом Ваталійовичом впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Епізоотологія, інфекційні хвороби та профілактична медицина».

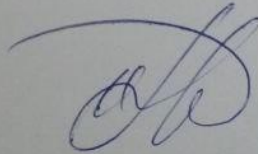
Результати дисертаційної роботи Шевченка Максима Віталійовича щодо поширеності серед тварин, мікробіологічної та молекулярно-генетичної характеристики Staphylococcus pseudintermedius та Staphylococcus aureus використовуються під час читання лекцій, проведення лабораторних занять, а також під час проведення наукових досліджень на кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб у підготовці фахівців ОС «Магістр» за напрямом ветеринарна медицина зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Білоцерківському Національному Аграрному Університеті.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Білоцерківського національного аграрного університету (протокол № 15 від 18 березня 2024 р.).

Декан факультету
ветеринарної медицини,
доктор ветеринарних наук

 Власенко С.А.

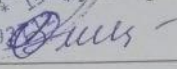
Завідувач кафедри епізоотології
та інфекційних хвороб,
кандидат ветеринарних наук, доцент

 Царенко Т.М.

Продовження додатку И 2



Проректор з наукової та
інноваційної діяльності
Білоцерківського національного
аграрного університету,

 О.М. Варченко

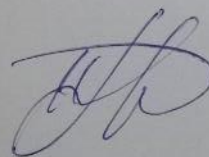
"20" березня 2024 р.

ДОВІДКА ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріали дисертаційної роботи Шевченка Максима Віталійовича «Staphylococcus pseudintermedius та Staphylococcus aureus: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність» використовуються в навчальному процесі при викладанні дисципліни «Епізоотологія, інфекційні хвороби та профілактична медицина» і наукових дослідженнях на кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб Білоцерківського національного аграрного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Білоцерківського національного аграрного університету (протокол № 15 від 18 березня 2024 р.).

Завідувач кафедри епізоотології
та інфекційних хвороб,
кандидат ветеринарних наук, доцент



Царенко Т.М.

Додаток И 3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заступник директора
Волинської регіональної
державної лабораторії
Державної служби України з
питань безпеки харчових
продуктів та захисту
споживачів



Богдан ГОЛОВКО

21 березня 2024 р.

АКТ

про впровадження/використання результатів

кандидатської дисертаційної роботи

у наукові дослідження

Результати дисертаційної роботи Шевченко Максима Віталійовича на тему: «*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, , впроваджено у роботу Волинської регіональної державної лабораторії Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів, використовуються під час досліджень (моніторингу, діагностики) бактерій роду *Staphylococcus spp.* у тварин.

Заступник директора

Богдан ГОЛОВКО

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної
роботи Національного
університету біоресурсів і
природокористування України

Тонха О.Л.

«26» березня 2024 р.

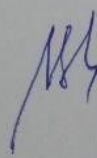
АКТ

Про провадження результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

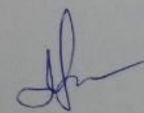
Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина», виконана **Шевченком Максимом Віталійовичем** впроваджені у навчальний процес при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин», «Лабораторна діагностика інфекційних хвороб» у підготовці фахівців ОС «Магістр» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології факультету ветеринарної медицини, Національного університету біоресурсів і природокористування України, м.Київ.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології, протокол № 3 від «20» березня 2024 року.

Декан факультету ветеринарної
медицини, д-р біол. наук, професор,
академік НААН України


М. І. Цвіліховський

Завідувач кафедри епізоотології,
Мікробіології і вірусології
канд. вет. наук., доцент


В. В. Мельник

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної

Тонха О.Л.
20 березня 2024 р.

ДОВІДКА ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріали дисертаційної роботи **Шевченко Максима Віталійовича** «*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність» використовуються в навчальному процесі за викладання дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин», «Лабораторна діагностика інфекційних хвороб» у підготовці фахівців ОС «Магістр» за спеціальностями 211 «Ветеринарна медицина» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології факультету ветеринарної медицини, Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології, протокол № 3 від «20» березня 2024 року.

Завідувач кафедри епізоотології,
Мікробіології і вірусології
канд. вет. наук., доцент

В.В. Мельник

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної та
методичної роботи Одеського
державного аграрного університету
Інна МАЛЕЦЬКА
27 лютого 2024 р.



КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи **Шевченко Максима Віталійовича** на тему: «*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність», використовуються в навчальному процесі при викладанні дисциплін «Інфекційні хвороби домашніх, декоративних та екзотичних тварин», «Спеціальна епізоотологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби» на кафедрі епізоотології, паразитології та мікробіології ім. професора В. Я. Атамася Одеського державного аграрного університету.

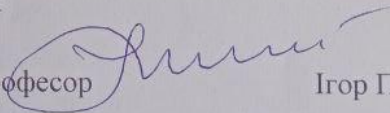
Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри епізоотології, паразитології та мікробіології ім. проф. В. Я. Атамася (протокол № 10 від 20 лютого 2024 р.).

Завідувач кафедри епізоотології,

паразитології та мікробіології

ім. професора В. Я. Атамася,


доктор ветеринарних наук, професор



Ігор ПАНКАР

Декан факультету ветеринарної медицини,

кандидат ветеринарних наук, доцент



Катерина РОДІОНОВА

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної та
методичної роботи Одеського
державного аграрного університету

Інна МАЛЕЦЬКА

27 лютого 2024 р.



АКТ

**Про провадження результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес**

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана **Шевченком Максимом Віталійовичем** впроваджені у навчальний процес за викладання дисциплін «Інфекційні хвороби домашніх, декоративних та екзотичних тварин», «Спеціальна епізоотологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби» у підготовці фахівців зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри епізоотології, паразитології та мікробіології ім. професора В.Я. Атамася Одеського державного аграрного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри епізоотології, паразитології та мікробіології ім. проф. В. Я. Атамася (протокол № 10 від 20 лютого 2024 р.).

Завідувач кафедри епізоотології,
паразитології та мікробіології
ім. професора В. Я. Атамася,
доктор ветеринарних наук, професор

Ігор ПАНІКАР

Декан факультету ветеринарної медицини,
кандидат ветеринарних наук, доцент

Катерина РОДІОНОВА

“ЗАТВЕРДЖУЮ”



Поліського національного
університету, доктор економічних
наук, професор

О. В. Скидан

22 Серпень 2024 р.

АКТ

про провадження результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана **Шевченком Максимом Віталійовичем** впроваджені у навчальний процес при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби», «Крайова епізоотологія та профілактика хвороб» у підготовці фахівців ОС «Магістр» за спеціальностями 211 «Ветеринарна медицина» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології, Поліського національного університету. Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології, протокол № 13 від 19.03. 2024 року.

Завідувач кафедри мікробіології, фармакології

та ветеринарної епідеміології,

д-р, вет. наук, професор

О. С. Галатюк

Секретар, кандидат ветеринарних наук,

доцент

Діана ФЕЩЕНКО

“ЗАТВЕРДЖУЮ”



Доктор Поліського національного
університету, доктор економічних
наук, професор

О. В. Скидан

“22” Березня 2024 р.

КАРТКА ЗВОРТНОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи Шевченка Максима Віталійовича «*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність» використовуються в навчальному процесі при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби», «Крайова епізоотологія та профілактика хвороб», а також при проведенні курсів підвищення кваліфікації та наукових дослідженнях на кафедрі мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології Поліського національного університету. Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології (протокол № 13 від 19.03. 2024 року).

Завідувач кафедри мікробіології, фармакології

та ветеринарної епідеміології,

доктор, вет. наук, професор

Олександр ГАЛАТЮК

Секретар, кандидат ветеринарних наук,

доцент

Діана ФЕЩЕНКО

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

В.о. проректора з наукової та міжнародної діяльності Сумського національного аграрного університету
Лариса КАЛАЧЕВСЬКА
« 6 » 2024 р.



АКТ

про впровадження/використання результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

Матеріали дисертаційної роботи Шевченка Максима Віталійовича «*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність» використовуються в навчальному процесі при викладанні дисципліни «Диференційна патологоанатомічна діагностика хвороб тварин» та «Методи наукових досліджень» і виконанні наукових досліджень на кафедрі вірусології, патанатомії та хвороб птиці Сумського національного аграрного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри вірусології, патанатомії та хвороб птиці Сумського національного аграрного університету (протокол № 12 від «5» березня 2024 р.).

Завідувач кафедри,
доктор ветеринарних наук, професор

Роман ПЕТРОВ

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**Статті у наукових фахових виданнях України:**

1. **Шевченко, М. В.**, Савченко, М. О., Ярчук, Б. М., Сахнюк, Н. І. та Царенко Т. М. (2021). Коагулазопозитивні стафілококи у собак та їх антимікробна резистентність (систематичний огляд). Науковий вісник ветеринарної медицини, 1, 104–118. DOI: 10.33245/2310-4902-2021-165-1-104-118 (здобувач провів аналіз літературних джерел, систематизував дані сформував висновки та брав участь у написанні статті, 0,63 д.а.).

2. **Шевченко, М. В.**, Тишківська, Н. В., Андрійчук, А. В., Мартиненко, О.А. та Царенко, Т. М. (2022) Внутрішньолабораторна апробація протоколу ПЛР для молекулярно-генетичної ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus spp.* Науковий вісник ветеринарної медицини, 2, 81–91. DOI: 10.33245/2310-4902-2022-173-1-81-91 (здобувач визначив оптимальні умови та апробував протокол ПЛР сформулював висновки та брав участь у написанні статті, 0,42 д.а.).

3. **Шевченко, М. В.**, Тарасов, О. А., Андрійчук, А. В., Гончаренко, В. П. та Царенко, Т. М. (2023). Оптимізація лабораторних ПЛР-протоколів для точної ідентифікації *S. aureus* та *S. pseudintermedius* у собак. Ветеринарна біотехнологія, 43, 175–185. DOI: 10.31073/vet_biotech43-17 (здобувач визначив оптимальні умови та апробував протокол ПЛР, проаналізував генетичну послідовність стафілококів, порівняв її з базами даних та сформулював висновки, 0,42 д.а.).

4. **Шевченко, М. В.** та Андрійчук, А. В. (2023). Антибіотикорезистентність ізолятів *Staphylococcus spp.* та *Streptococcus spp.*, що спричиняють мастит на молочних фермах України. Науковий вісник ветеринарної медицини, 1, 81–88. DOI: 10.33245/2310-4902-2023-180-1-81-88 (здобувач провів мікробіологічні дослідження, систематизував дані та брав участь у написанні статті, 0,3 д.а.).

5. **Shevchenko M.** & Tsarenko T. (2023) Microbiological and molecular genetic characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*. *Nauk. visn. vet. med.* 135–144. DOI: 10.33245/2310-4902-2023-184-2-135-144 (здобувач провів морфологічні та культуральні дослідження сформулював висновки та брав участь написанні статті 0,3 д.а.).

Статті в наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of Science Core Collection:

6. **Shevchenko, M.**, Andriichuk, A., Goncharenko, V. & Dovhal. O. (2023) Mastitis prevention and control: Integration of microbiological and management approaches. *Scientific Horizons.* 26 (7), 19–33. DOI: 10.48077/scihor7.2023.19 (здобувач брав участь у мікробіологічних дослідженнях, систематизував дані та брав участь у написанні статті, 0,63 д.а.).

7. **Shevchenko, M.**, Andriichuk, A., Bilyk, S., Dovhal, O., Mazur, T., & Tsarenko, T. (2023). Biofilm forming ability of coagulase-positive staphylococci isolated from animals in Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(4), 576–580. DOI: 10.15421/022384 (здобувач вивчив біоплівкоутворювальні властивості стафілококів, систематизував дані та брав участь у написанні статті, 0,33 д.а.).

8. **Shevchenko, M.**, Andriichuk, A., Naumchuk, V., Petruk, I., Bilyk, S., & Tsarenko, T. (2023). Zoonotic *Staphylococcus spp.* among domestic animals in Ukraine: Antibiotic resistance and diagnostic approaches. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(3), 378–385. DOI: 10.15421/10.15421/022356 (здобувач брав участь у мікробіологічних дослідженнях, систематизував дані та брав участь у написанні статті, 0,21 д.а.).

Матеріали науково-практичних конференцій:

9. **Шевченко, М. В.** та Царенко Т. М. (2021). Коагулазопозитивні стафілококи за концепцією “Єдине здоров’я”. Біобезпека, захист та благополуччя тварин: тези доповідей Міжнародної науково-практичної

конференції. Київ. 129–131 (*здобувач провів аналіз літературних джерел та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.*).

10. **Шевченко, М. В.** Виявлення колонізації собак бактеріями роду *Staphylococcus spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції. Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин: матеріали II Науково-практичної міжнародної дистанційної конференції. Харків. 63–65.

11. **Шевченко, М. В.** та Царенко, Т. М. (2022). Оптимізація протоколу визначення *Staphylococcus spp.* методом ПЛР. Ветеринарна медицина: сучасні виклики і актуальні проблеми науки, освіти та продовольчої безпеки: матеріали Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції. Житомир. 256–258 (*здобувач провів оптимізацію протоколу дослідження та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.*).

12. **Шевченко, М. В.** та Царенко, Т. М. (2022). Ідентифікація коагулазопозитивних стафілококів (CoPS) мікробіологічними методами. Єдине здоров'я – 2022: матеріали Міжнародної наукової конференції. Київ. 304-306 (*здобувач вивчив діагностичні протоколи та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.*).

13. **Шевченко, М. В.,** Андрійчук, А. В. та Царенко, Т. М. (2022). Використання ПЛР для виявлення метицилінрезистентних штамів стафілококів. Досягнення та перспективи ветеринарної науки: тези доповідей Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції молодих вчених. Полтава. 113–115 (*здобувач провів дослідження генів стійкості до метициліну *tesA* та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.*).

14. **Шевченко, М. В.,** Андрійчук, А. В. та Царенко, Т. М. (2022). Ідентифікація родин *Staphylococcus spp.* групи КПС мікробіологічними методами. Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту: матеріали міжнародної науково-практичної конференції. Біла Церква. 48–50 (*здобувач провів дослідження стафілококів мікробіологічними методами та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.*).

15. **Шевченко, М. В.**, Білик, Б. П. та Царенко, Т. М. (2022). Диференціація *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* методом ПЛР. Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини. Житомир. 303–305 (*здобувач провів дослідження стафілококів методом ПЛР та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.*).

16. **Шевченко, М. В.**, Андрійчук, А. В., Білик, Б. П. та Царенко, Т. М. (2022). Бактеріальні збудники нозокоміальні інфекцій в ветеринарній медицині. Біобезпека, захист та благополуччя тварин: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. Київ. 136–139 (*здобувач провів аналіз літературних джерел та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.*).

17. **Шевченко, М. В.**, Савченко, М. О., Андрійчук, А. В., Довгаль, О. В., Білик С.А. та Царенко Т.М. (2023). Контамінація серветок для вимені та її вплив на розповсюдження інфекційних маститів. III Міжнародна науково-практична конференції “Актуальні аспекти розвитку науки і освіти”. Одеса. 152–155 (*здобувач провів дослідження стафілококів мікробіологічними методами та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.*).

18. **Шевченко, М. В.**, Савченко, М. О., Андрійчук, А. В., Довгаль, О.В., Білик, С.А. та Царенко, Т.М. (2023). Секвенування фрагмента *pis* гена *S. pseudintermedius*. Міжнародна науково-практична конференція “Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту”. Біла Церква. 75–76 (*здобувач провів дослідження стафілококів мікробіологічними методами та взяв участь у написанні тез, 0,08 д.а.*).

Методичні рекомендації:

19. **Шевченко, М. В.**, Андрійчук, А. В., Тарасов, О. А., Мазур, Т. Г., Богатко, Н. М., Наумчук, В. С., Петрук, І. П., Савченко, М. О., Царенко, Т. М. (2024). Сучасні підходи до дослідження стафілококів: мікробіологічні та молекулярно-генетичні методи діагностики. Біла Церква. 46 с. (*Здобувач брав безпосередню участь у проведенні досліджень, підготовці та написанні рекомендацій 1,9 д.а.*).

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

УДК 579.6:579.2:577:636.09

*Затверджено Вченою радою
 факультету ветеринарної медицини
 Протокол № 7 від 22 лютого 2024*

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

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

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

Біла Церква
 2024

© БНАУ, 2024