

УДК 579.26:579.61:579.62
КП
№ держреєстрації 0116U002667
Інв. №

Міністерство освіти та науки України
Сумський державний університет
(СумДУ)
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2
тел. (0542) 33-54-79 факс (0542) 33-54-79

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
д-р фіз-мат наук, професор

_____ А.М. Черноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ
«ОЦІНКА ЕКОЛОГІЧНОГО РИЗИКУ, ПОВ'ЯЗАНОГО З
РОЗПОВСЮДЖЕННЯМ АНТИБІОТОРЕЗИСТЕНТНОСТІ СЕРЕД
МІКРООРГАНІЗМІВ»

(остаточний)

Начальник НДЧ
канд.фіз.-мат. наук, с.н.с.

Д.І. Курбатов

Керівник НДР
д-р. вет.наук, професор

О.М.Бергілевич

2018

Рукопис завершено 20 грудня 2018 р.

Результати цієї роботи розглянуто науковою радою СумДУ протокол № 6 від 27 грудня 2018р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, д.вет.н, професор	(25.12.2018)	Бергілевич О. М. (вступ, висновки)
д.вет.н, професор	(25.12.2018)	Касянчук В. В. (розділ 3, 4)
аспірант	(25.12.2018)	Ткаченко І. А. (розділ 1, 3)
аспірант	(25.12.2018)	Шубін П. А. (розділ 1, 2)
аспірант	(25.12.2018)	Буцик А.С. (розділ 2)
студент	(25.12.2018)	Конєва А. О. (розділ 1)
студент	(25.12.2018)	Чернецький І. С. (розділ 1)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 50 с., 8 рис., 13 табл., 66 джерел.

МІКРООРГАНІЗМИ, АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ, БЕЗПЕКА ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ, ГРОМАДСЬКЕ ЗДОРОВ'Я, ЕКОЛОГІЧНИЙ РИЗИК.

Об'єкт дослідження – детальна оцінка екологічного ризику, пов'язаного з розповсюдженням антибіотокорезистентності серед мікроорганізмів.

Предмет дослідження – антибіотокорезистентність серед мікроорганізмів (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*).

Мета роботи – підвищення ефективності контролю за розповсюдженням антибіотокорезистентних бактерій у навколишньому середовищі.

В заключному звіті вивчено та проведено аналіз антибіотикорезистентності *S. aureus* та мікроорганізмів з родини *Enterobacteriaceae*, ізольованих з проб сирого коров'ячого молока та об'єктів навколишнього середовища, виділених з молочних ферм Сумської області. Також одним із завдань було вивчення антибактеріальних властивостей меду щодо метицилінрезистентних стафілококів.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
1 ВИЯВЛЕННЯ ГЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО МЕТИЦИЛІНУ В ІЗОЛЯТАХ <i>S. AUREUS</i> , ВИДІЛЕНИХ ІЗ МОЛОКА КОРІВ	9
2 СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТИЦИЛІНРЕЗИСТЕНТНОГО <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (MRSA) ТА ДИФЕРЕНЦЮВАННЯ ЙОГО СЕРЕД ІНШИХ ІЗОЛЯТІВ ДАНОГО ВИДУ МІКРООРГАНІЗМУ ЯК ТАКОГО, У ЯКОГО НАЯВНИЙ АБО ВІДСУТНІЙ ГЕН <i>MESA</i>	21
3 РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ІЗОЛЯТІВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ВИДІЛЕНИХ З ПОВЕРХНІ ТУШ СВИНЕЙ ДО АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ	25
4 ВИВЧЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МЕДУ ЩОДО МЕТИЦИЛІНРЕЗИСТЕНТНИХ СТАФІЛОКОКІВ.....	35
ВИСНОВКИ.....	44
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ.....	45

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БГКП – бактерії групи кишкової палички

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ГОСТ – Міждержавний стандарт

ДСТУ – національний стандарт України

ЄС – Європейський союз

ЗУ – Закон України

КМАФАНМ – кількість мезофільних аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів

КУО – колонієутворюючі одиниці

pH – водневий показник

СОТ – Світова організація торгівлі

ФАО – Всесвітня продовольча та сільськогосподарська організація ООН

ВСТУП

Основними лікувальними засобами в сучасній медицині є антибіотики. Антибіотики - незамінні препарати для лікування великої кількості інфекційних захворювань, які до їх відкриття, вважалися невиліковними або супроводжувалися високою летальністю (туберкульоз, чума, холера, черевний тиф, бруцельоз, пневмонія, менінгіт, ендокардит, різні септичні процеси). Відкриття антибіотиків додало приблизно 20 років до середньої тривалості життя людини в розвинених країнах. Антибіотики - стимулювали розвиток таких галузей медицини як хірургія, трансплантологія, ендопротезування [3, 8, 18]. Однак, неконтрольоване та надмірне використання антимікробних препаратів в медицині, в аграрному секторі, а також в побуті стало однією з головних причин зростання резистентності серед бактерій. За оцінкою Експертної комісії по боротьбі з антимікробною резистентністю (АМР) - в світі щорічно використовується 73 млрд. разових доз або 300 тис. тонн антибіотиків [11, 13].

На даний час, в світовій практиці лікування, як у гуманній так і ветеринарній медицині важливою проблемою є мала ефективність існуючих протимікробних засобів. Основною причиною цього є широке розповсюдження антибіотикостійких бактерій. Стійкість до антибіотиків є однією з найбільш серйозних загроз для прогресу сучасної медицини і світової економіки. За прогнозами ВООЗ, у 2050 році кількість смертей через цю проблему в світі може досягти 10 млн. осіб на рік, а річні втрати для світової економіки перевищать 100 трлн доларів США [3].

За даними ВООЗ встановлено 12 видів бактерій, стійких до дії антибіотиків, та які становлять найбільшу загрозу для здоров'я людини:

- бактерії, які мають високо критичний рівень пріоритету (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*);

- бактерії високого рівня пріоритету (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus spp.* в т.ч. *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella*, *Neisseria gonorrhoeae*);

- бактерії середнього рівня пріоритету (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella spp.*).

Основна причина розвитку стійкості у цих бактерій – надмірне застосування антибіотиків в багатьох частинах світу (особливо при незначних інфекціях) а також недостатнього застосування через відсутність фінансової підтримки для забезпечення повного курсу лікування.

Швидке накопичення резистентних форм мікроорганізмів сприяє формуванню “супербактерій”, стійких практично до всіх відомих антибіотиків. В результаті тяжкий перебіг, висока летальність, складність діагностики і терапії, надмірне подорожчання лікування. До 2050 року супербактерії вбиватимуть 10 млн осіб на рік. Збиток для світової економіки складе близько 100 трильйонів доларів на рік. Розвиток резистентності збудників потребує використання альтернативних, менш безпечних та ефективних антимікробних препаратів [3, 9, 10].

Сьогодні антибіотикорезистентність є серйозною глобальною загрозою для здоров'я населення, наслідки якої виходять далеко за межі сектору охорони здоров'я. Стійкість збудників захворювань до антибіотиків починає розглядатися як соціальна проблема в контексті негативного зовнішнього впливу охорони громадського здоров'я.

Ще в 1984 році світова спільнота активно почала приймати рішення щодо розробки заходів боротьби з антибіотикорезистентністю. Наслідком цього була перша резолюція ВООЗ із закликом до раціонального використання лікарських засобів. В подальшому, у 2001 році, була схвалена глобальна стратегія ВООЗ по стримуванню використання антибіотиків. У 2011 році був прийнятий Європейській стратегічний план дій по проблемі

антибіотиків та на Всесвітньому дні здоров'я було винесене наступне рішення: “Стійкість до протимікробних засобів – якщо сьогодні не вжити заходи, завтра залишимося без ліків”. У 2016 році резолюція ВООЗ закликає держави-члени зміцнювати системи контролю та управління в галузі лікарських засобів, підтримувати наукові дослідження по правильному використанню антибіотиків, заохочувати науковців до створення нових засобів для лікування.

У 2017 р. в штаб-квартирі Європейського агентства з лікарських засобів в Лондоні, відбулася нарада з антибіотикорезистентності. У заході взяли участь експерти Європейської комісії, ВООЗ. Експерти ВООЗ розробили список із 12 антибіотикостійких бактерій, для боротьби з якими терміново потрібно створити нові лікарські засоби. Серед цих бактерій зазначені також метицилінрезистентні стафілококи (MRSS)[10,17].

В Україні розроблена Державна стратегія щодо реалізації державної політики зі стримування розвитку стійкості до протимікробних препаратів на 2018 – 2022 роки (проект). Дана стратегія висвітлює питання стримування стійкості бактерій до антибіотиків та необхідності подальших наукових досліджень, спрямованих на заповнення існуючих прогалин в знаннях та сприяння інноваціям у сфері розробки антибактеріальних препаратів [1, 6, 7, 16].

1 ВИЯВЛЕННЯ ГЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО МЕТИЦИЛІНУ В ІЗОЛЯТАХ *S. AUREUS*, ВИДІЛЕНИХ ІЗ МОЛОКА КОРІВ

Експерти ВООЗ вважають, що антибіотикорезистентність – це проблема глобального масштабу: вона актуальна для всіх країн і для різних галузей народного господарства. Тому для її вирішення необхідно зустрічний рух бізнесу і влади, науки та об'єднання зусиль усіх країн на всіх континентах. *S. aureus* є широко розповсюдженим мікроорганізмом, який вважається людським патогеном, а також однією із причин виникнення септичних інфекцій, що є загрозою для життя людини [1, 2, 3,4, 6, 15]. В корів *S. aureus* викликають мастит. Стафілококи є коменсалами шкіри та слизових оболонок тварин і людей. Захворювання великої рогатої худоби, спричинені *S. aureus*, можуть мати перебіг у вигляді абсцесів шкіри, слизових оболонок і маститів до сепсису [13, 14, 16].

Стафілококи – рід широко поширених грампозитивних бактерій. Вони не утворюють спор і являють собою круглі нерухомі клітини, розташовані гронами. Представники роду стійкі до впливу температур, висушування, підвищеному вмісту хлористого натрію та інших хімічних реагентів.

Staphylococcus aureus один з п'яти представників коагулаза-позитивних стафілококів і тільки він є патогенним для людини. У нормальних умовах він частина нормальної мікрофлори слизових і не викликає захворювань. Однак, викликає широкий спектр шкірних захворювань у людей зі зниженим імунітетом. Це зробило *S. aureus* основною причиною внутрішньолікарняних інфекцій в США. Також він небезпечний для новонароджених, у яких він викликає синдром обварений шкіри.

S. aureus також вражає велику рогату худобу, коней та інших домашніх тварин. Можливість передачі тварин штамів до людини розширяють зону ризику на людей, які працюють в сфері тваринництва, лікарів ветеринарної

медицини та власників домашніх тварин.

S. aureus факультативний анаероб і може виживати на НЕ живих поверхнях. В таких умовах він виділяє ентеротоксин (SEs; від SEA до SEE, від SEG до SEI, від SER до SET) і стафілокок-подібні (SEI) протеїни, ще не вписуючіся в загальну модель (SEIL and SEIQ) і мало вивчені (SEIJ, SEIK, від SEIM до SEIP, SEIU, SEIU2 і SEIV). SEs і SEIs зазвичай відносять до класів (SEA to SEE) і нові (SEG to SEIU2) типи. Стафілококовий ентеротоксин викликає харчові отруєння. Це особливо характерно для молочних продуктів. Велика рогата худоба є основним джерелом зараження молока ентеротоксин стафілококів.

Інтерес викликає стійкість *S. aureus* до широкого спектру антибіотичних препаратів, зокрема до метициліну (MRSA). Вперше MRSA був виявлений як внутрілікарняна інфекція. Пізніше, були виділені позалікарняних (CAMRSA - community associated MRSA) і зооніческого походження (LAMRSA - livestock associated MRSA). LAMRSA вперше був зафіксований як причина маститу у корів в Бельгії в 1960-х. Найбільш виділяється штам ST398, вперше отриманий від свиней, зараз він виділений і у людини.

Резистентність *S. aureus* обумовлюється наявністю хромосомної касети *mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec* - SCC*mec*). У ній розташований ген *mecA*, який дозволяє виробляти пеніцилін білок 2a (penicillin-binding protein 2a - PBP 2a or PBP 2'). PBP2a розташовується в клітинній стінці бактерії і має низьку зв'язує Аффинной для бета-лактам. Виявлено п'ять типів SCC*mec* (типи I, II, III переважно асоціюються з внутрішньолікарняними інфекціями, типи IV, V зазвичай є позалікарняними і зооніческіми інфекціями).

До складу SCC*mec* входять гени резистентності до антибіотичних препаратів інших груп. Так ген *aadD* відповідає за резистентність до

тромбаміцину і канкміцину, ген *ermA* – до еритроміцину ген, *tetK* – до тетрацикліну.

Для визначення типу MRSA зазвичай використовують полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). Вона дає найбільш точні результати для вибору стратегії боротьби з інфекцією.

Ще одним фактором резистентності є R-плазміді. Багато R-плазміді є трансмісійними і віддаються всередині популяції. R-плазміді можуть передавати ген прозвальноючий продукувати бета-лактамази. Вони розділені на кілька класів. Класом А володіє *S. aureus*.

До молока *S. aureus*, можуть потрапити з вим'я корів, хворих на мастит. Особливу небезпеку в даному випадку має субклінічний стафілококовий мастит. Молоко є гарним середовищем для росту та розмноження великої кількості мікроорганізмів, у тому числі *S. aureus* [2, 5, 16]. Бактеріальне забруднення молока зазвичай відбувається в процесі доїння, і це залежить від санітарного стану навколишнього середовища, посуду для доїння та доярів [1, 9, 14].

Ще декілька десятиліть тому штами *S. aureus* були чутливими до пеніцилінази β-лактамів (MSSA) [8]. Тісний контакт між людьми та різними видами тварин і широке застосування цих антибіотиків в медицині, ветеринарії та в кормах для тварин сприяло виникненню та поширенню MRSA. Але, на відміну від гуманної медицини, інформація про появу і властивості MRSA у тварин малочисельна та суперечлива. MRSA- термін, який означає стійкість *S. aureus* до всіх β-лактамів, включаючи всі пеніциліни та цефалоспорини Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) склала список з 12 антибіотикорезистентних бактерій, що завдають найбільшої шкоди здоров'ю людини. Бактерії з цього переліку мають найбільшу резистентністю до дії антибіотиків. До цього переліку входить і MRSA [2, 3, 6, 9]. Згідно з науковою літературою, MRSA, в першу чергу, ідентифікується

за наявності гену *mecA*, що має хромосомну локалізацію (мобільний генетичний елемент (MGE) стафілококової хромосомної касети (*SCCmec*)) і відповідає за синтез ПСБ_{2a} (пеніцилінзв'язуючого/шунтуючого білка). Сучасна класифікація *SCCmec* елементів (типи I, II, III, IVa, b, c, d та V) базується саме на аналізі *mec/ccr* генів [8,10,18].

Антибіотикорезистентні *S. aureus* на даний час представляють серйозний виклик як ветеринарним та медичним працівникам, так і виробникам молочної продукції оскільки вони негативно впливають на результати лікування [5, 7, 9,12, 13].

Поширеність резистентності до антибіотиків зазвичай коливається між ізолятами з різних проб і навіть між ізолятами з різних стад на одній фермі [16]. Антибіотикорезистентні характеристики у патогенних штамів кодуються за допомогою окремих генів, які можуть мати локалізацію на бактеріальній хромосомі, плазмідах, транспозонах або в касетах, які входять до інтегронів, що дозволяє їм легко переноситись між ізолятами [8, 10, 15].

За повідомленнями ВООЗ, у багатьох місцях Європейського регіону в 60% випадків інфікування *S.aureus* виявляється його стійкість до метициліну (MRSA), а це означає, що лікування за допомогою стандартних антибіотиків не дає результатів. За оцінками фахівців, ймовірність смерті хворого, інфікованого MRSA на 64% вище, ніж пацієнта із захворюванням, викликаним нерезистентним штамом *S. aureus* [6, 7, 9, 17]. У ВООЗ також зроблено висновок про те, що більшість країн в Є С мають добре налагоджені національні та міждержавні системи відстеження стійкості до антибіотиків, проте в інших країнах європейського регіону такі системи необхідно терміново зміцнити або створити.

В Україні створено державну систему за антибіотикостійкими бактеріями. Але цю систему необхідно зміцнювати, крім того дуже важливим є науковий супровід такої системи, у тому числі на регіональному рівні. В

2015 році ВООЗ заявила, що кожна країна повинна розробити план по боротьбі із антибіотикорезистентністю [2].

Визначення чутливості *Staphylococcus spp.* до бета-лактамних антибіотиків повинно включати виконання двох тестів: (I) визначення чутливості до бензилпеніциліну або виявлення продукції бета-лактамаз (пеніциліназ) та (II) визначення чутливості до оксациліну або виявлення гену *tesA* [6].

Дані про резистентність до антибіотиків можуть використовуватися для характеристики цих патогенів, що може додатково обмежити ризики, пов'язані з споживанням забрудненого молока та його продуктів [8, 10, 18].

На даний час вдосконалюються методи дослідження стійкості до протимікробних препаратів, які базуються на передових генетичних технологіях, таких як ПЛР. Цими методами специфічні генетичні маркери можуть бути виявлені протягом декількох годин, що дає змогу проводити прямі зв'язки з джерелами спалахів і відстежувати їх поширення. Визначення рівнів поширення *S. aureus* та оцінка антибіотикорезистентних генотипів ізолятів може служити інструментом для визначення гігієнічних норм.

За прогнозами, до 2050 року «супербактерії» (антибіотикорезистентні) вбиватимуть 10 млн осіб на рік. Збиток для світової економіки складе близько 100 трильйонів доларів на рік [7, 17].

Проведення наукових досліджень антибіотикорезистентних бактерій у тому числі MRSA із застосуванням ефективних методів визначення бактеріальної чутливості до антибіотиків сприятиме розробці нової стратегії попередження потенційних спалахів хвороб корів, поліпшеною гігієнічних практик на молочних фермах та внести до існуючих наукових знань додаткові дані щодо MRSA. Кожен науковий внесок щодо MRSA підвищує рівень інформованості в зазначеному напрямку та вносить вклад в галузях охорони здоров'я, ветеринарії та виробничих гігієнічних практик, щоб

уповільнити прогресування цієї проблеми.

Метою роботи даного етапу було ізолювати *S. aureus* з проб сирого коров'ячого молока, отриманого з молочних ферм Сумської області та визначити їх сприйнятливість до антибіотиків.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження були проведені протягом 2016 – 2017 років. Всього було відібрано 36 проб збірного молока чорно-рябої породи віком 5-6 років на фермах Сумської області. Середній розмір стада на фермах був в межах від 50 до 500 корів. Доїння було автоматизованим у молокопровід. Проби молока відбирали з дотриманням правил асептики та одразу транспортували в лабораторію у сумках-холодильниках. Бактеріологічні дослідження проводили у акредитованій мікробіологічній лабораторії кафедри громадського здоров'я Сумського державного університету. Дослідження проводили протягом 2-х годин після відбору проб. Для ідентифікації бактерій *S. aureus* були використані класичні бактеріологічні методи: робили посіви десятикратних розведень молока у фізрозчині на кров'яний агар та жовточно-сольовий агар. Інкубували посіви в аеробних умовах при 37°C протягом 18 – 24 год. З характерних колоній готували препарати для мікроскопії та фарбували за методом Грамом, досліджувати на оксидазу та ставили коагулазний тест. Тести на коагулазу та оксидазу було виконано згідно з стандартних методик. Отримані ізоляти *S. aureus* досліджували на антибіотикочутливість диско-дифузійним методом. На поверхню поживного агару розкладали по 4 – 5 диски з антибіотиками. Інкубували при 37°C протягом 18 – 24 год. Після інкубування вимірювали зони затримки росту ізолятів. Ізоляти, які бактеріологічними методами були ідентифіковані як MRSA тримали в 30%-ному гліцерині для подальшого дослідження методом ПЛР для підтвердження наявності гена *mecA*.

При проведенні досліджень методом ПЛР, для виділення ДНК використовували набір «ДНК-сорб» (ДНКІБШМ). Реакцію проводили в

об'ємі 0,025 см³ на термоциклері «Т1» (Biometra, Німеччина). З метою мінімізації утворення неспецифічних димерів праймер-матриця і їх ампліфікації був використаний метод приготування реакційної суміші з фізичним розділенням компонентів ПЛР. Для приготування „нижньої” реакційної суміші змішували праймери МесА147-F 5'-GTGAAGATATACCAAGTGATT-3' і МесА147-R 5'-ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT-3' [18], які фланкують фрагмент гена *mesA*, та нуклеотидтрифосфати (2мМ) в одній пробірці з розрахунку по 0,025 см³ кожного компоненту (по 0,0125 см³ обох праймерів з кінцевою концентрацією кожного 10-20 пМоль/зразок). Після змішування на вортексі, суміш розкапували в підготовлені для ПЛР мікропробірки по 0,005 см³ і нашаровували зверху по 0,015 см³ розплавленого воску. Після застигання воску в пробірці вносили по 0,017 см³ „верхньої” суміші та по 2 краплі мінерального масла. До складу „верхньої” ПЛР-суміші в розрахунку на 1 зразок входило: 0,005 см³ 5-х ПЛР-буферу, 0,0025 см³ 50 мМ MgSO₄, 0,009 см³ H₂O MilliQ та 0,0005 см³ Taq-полімерази (5 од/мкл). Досліджувану ДНК вносили під масло, в об'ємі 0,003 см³. Термопрофіль реакції: 95° С 4 хв (1цикл), наступні 35 циклів 95° С 30 с, 50° С 30 с, 72° С 30 с; 72° С 7 хв (1 цикл).

Аналіз продуктів ампліфікації проводили шляхом розділення фрагментів ДНК в 1,5% гелі агарози (Sigma, США), а розташування смуг ДНК реєстрували за допомогою системи гель-документування «Gel DocXR Plus» (BioRad Laboratories, США).

Результати досліджень. Було досліджено 36 проб сирого збірного молока на присутність у них патогенних (коагулазо - позитивних) *S. aureus*. До коагулазо - позитивних стафілококів відносили бактерії, що на кров'яному агарі, який містив 5% бичачої крові, росли блискучими, гладкими, опуклими, напівпрозорими колоніями, які мали добре виражену зону бета-гемолізу. На

жовточно-сольовому агарі утворювали гладенькі, округлі, опуклі, з рівним краєм колонії з жовтуватим відтінком.

Із 36 проб молока у трьохкратному повторі було виділено 12 ізолятів коагулазопозитивних *S. aureus*, які були досліджені на антибіотикорезистентність до 3-х бета-лактамних антибіотиків. Результати досліджень наведено у таблицях 1.1 –1. 2.

Таблиця 1.1 – Результати досліджень чутливості коагулазо-позитивних ізолятів *S. aureus* до бета-лактамних антибіотиків

№ ізоляту	Зони затримки росту, мм		
	Пеніцилін	Оксацилін	Амоксицилін
1	37±2	15±1	27±2
2	41±2	16±2	20±2
3	13±1	8±1	12±2
4	48±3	28±3	24±3
5	35±2	16±1	22±1
6	10±2	6±2	10±2
7	39±3	16±1	22±3
8	46±2	31±3	28±1
9	10±2	5±1	9±1
10	37±1	28±2	23±2
11	32±2	17±2	21±3
12	34±2	16±1	19±2

Дані, що наведені у таблиці 1.1 свідчать, що ізоляти *S.aureus* №3, 6 ,9 мали найменші зони затримки росту до бета-лактамних антибіотиків, а отже вони можуть бути віднесені до антибіотикостійких (MRSA). Ці три ізоляти ми також дослідили на чутливість до інших антибіотиків (Табл.1.2)

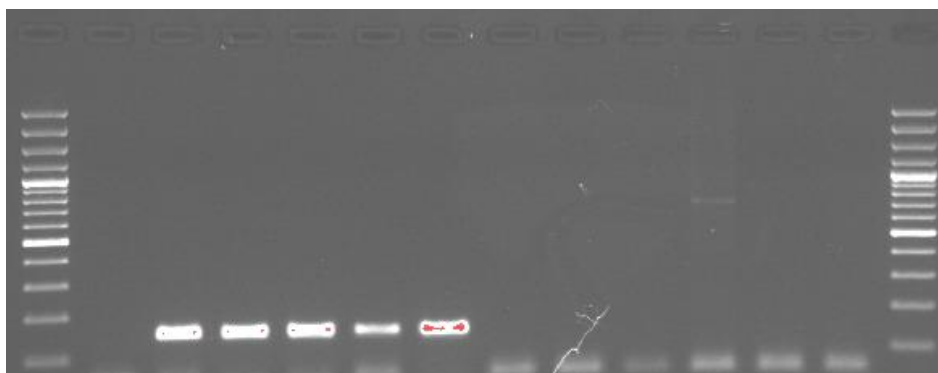
Таблиця 1.2 – Результати досліджень MRSA ізолятів на антибіотикочутливість

Досліджувані антибіотики	Зони затримки росту, мм,		
	Нормативні значення	Мінімальні значення	Максимальні значення
Пеніцилін, ПЕН ¹⁰	≤ 28	10±2	13±1
Амоксицилін, АМХ ¹	≤ 15	9±1	12±1
Оксацилін, ОХ ¹	≤ 10	5±1	9±1
Цефазолін, CZ ³⁰	≤ 15	10±1	15±1
Гентаміцин, GEN ¹⁰	≤ 12	14±1	29±1
Ванкоміцин, VA ³⁰	≤ 12	22±1	45±1
Тетрациклін, ТЕ ³⁰	≤ 14	10±2	12±1
Лінкомицин L ¹⁵	≤ 17	18±1	34±2
Еритроміцин E ¹⁵	≤ 17	11±1	14±1
Рифампіцин, РИФ ¹⁵	≤ 16	17±2	23±2

Примітка: Критерії інтерпретації результатів визначення рівня чутливості до антибіотиків (граничні значення діаметрів зон пригнічення росту(мм), визначали згідно [4], де для резистентних до антибіотиків мікроорганізмів визначено наступні зони затримки росту: Пеніцилін, ПЕН¹⁰ - ≤ 28 ; Амоксицилін, АМХ¹⁰ - $10 \text{ мкг} \leq 15$; Оксацилін, ОХ¹ - $1 \text{ мкг} \leq 10$; Цефазолін, CZ³⁰ - $30 \text{ мкг} \leq 15$; Гентаміцин, GEN¹⁰ - $10 \text{ мкг} \leq 12$; Ванкоміцин, VA³⁰ - $30 \text{ мкг} \leq 12$; Тетрациклін, ТЕ³⁰ - $30 \text{ мкг} \leq 14$; Лінкомицин L¹⁵ - $15 \text{ мкг} \leq 17$; Еритроміцин E¹⁵ - $15 \text{ мкг} \leq 17$; Рифампіцин, РИФ¹⁵ - $15 \text{ мкг} \leq 16$.

Порівняльним аналізом нормативних значень зон затримки росту досліджуваних ізолятів із даними наших досліджень ми визначали рівні чутливості до антибіотиків. Як свідчать дані таблиці 1.2, досліджувані ізоляти коагулазопозитивних *S. aureus* проявляли найбільшу стійкість крім пеніциліну, амоксициліну, оксациліну, ще до цефазоліну, тетрацикліну, еритроміцину. Слід зазначити, що до цих антибіотиків ці ізоляти *S. aureus*, проявляли менші діаметри затримки росту, порівняно до нормативних

значень, що свідчить про їх високу стійкість. До таких антибіотиків як: гентаміцин, ванкоміцин, лінкомицин, рифампіцин ці ізоляти були чутливими. Три ізоляти (3,6,9), які відібрані за результатами мікробіологічних досліджень, як потенційні MRSA, були перевірені в ПЛР на наявність *mecA* гену. Для порівняння, досліджувалися ізоляти, виділені від інших видів тварин та людини (рис.1.1).



М НКВ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 М

Рисунок 1.1 - Електрофоретичний аналіз в 1,5% гелі агарози продуктів ампліфікації гену *mecA*. Варіанти: НКВ-негативний контроль виділення; М - маркер розміру фрагментів ДНК “100 bp Plus DNA Ladder” (Thermo Fisher Scientific); 1,2,3-ізоляти *St. aureus* (ВРХ); 4,5-ізоляти *St. aureus* (*mecA*+) (людина); 6-8-ізоляти *St. aureus* (свині); 9-11-ізоляти *St. aureus* (риба).

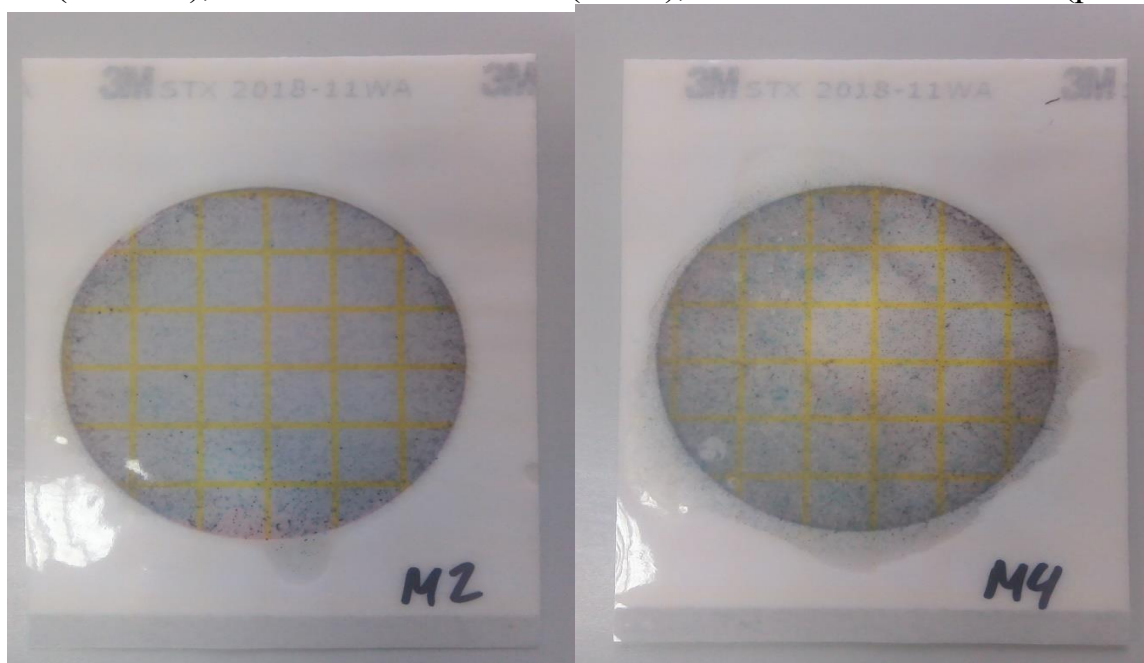


Рисунок 1.2- 3М Petrifilm Staph Express CountPlate

В ході дослідження були отримані наступні результати: стійкість до метициліну та еритроміцину була виявлена у 13 (56,5%) та 5 (21,7%) ізолятів *S. aureus*, відповідно. Виявлено, що стійкість до гентаміцину та тетрацикліну однакова для обох лікарських засобів - 20 ізолятів (87%). Штами, виділені з молока, найбільш стійкі до гентаміцину (100%) і тетрацикліну (80%). За ступенем цих ізолятів були стійкі до метициліну (50%) та еритроміцину (30%). Штамми, виділені з м'яса, стійкі до тетрацикліну (92%) та гентаміцину (77%). Вони були менш стійкі до метициліну (62%) та еритроміцину (15%).

Для проведення дослідження на мінімальну інгібуючу концентрацію було відібрано 5 ізолятів *S. aureus*, що виявилися найбільш стійкими до АБП. Випробування антимікробної сприйнятливості лікарських засобів на ізолятах проводили на поживному агарі (HiMedia) дискодифузним методом. Були використані тести мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) виробництва HiMedia (Рис. 3) відповідно до інструкції виробника тесту. Антимікробними агентами, що випробовувались, включали ампіцилін, цефазолін, ципрофлоксацин, гентаміцин, офлоксацин (таб. 1.3).

Таблиця 1.3 – Результати MIC-тесту для зразків молока

Антибіотик	Значення			Проба 1 M2	Проба 2 M4	Проба 3 M5	Проба 4 M8	Проба 5 M9	Резист- ентні
	S	I	R						
Ampicillin	0.25	-	0.5	0,128	0,128	0,032	0,124	0,256	0%
Cefazolin	2	4	8	0,1	0,1	10	2	10	20%
Ciprofloxacin	1	2	4	0,1	0,01	0,25	5	0,25	20%
Gentamicin	4	8	16	8	0,512	1,024	16	16	60%
Ofloxacin	1	2	4	0,1	0,15	0,15	2	0,5	20%

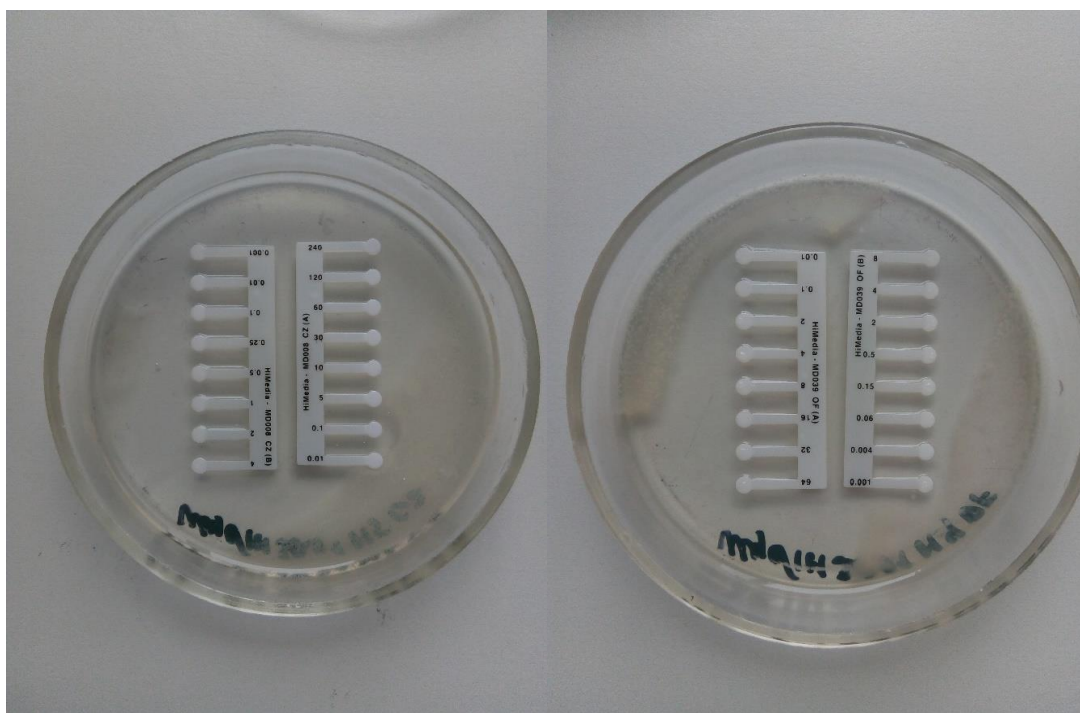


Рисунок 1.3- MIC- тести

Ізоляти *S. aureus* отримані з молока на центральному ринку міста Сум виявили стійкість до гентаміцину (60%), цефазоліну (20%), ципрофлоксацину (20%), офлоксацину (20%). Всі ізоляти виявили чутливість до ампіциліну.

Висновки до розділу

Слід відмітити, що серед ізолятів можуть зустрічатися варіанти з надлишковою продукцією бета-лактамази, які частково втрачають чутливість до оксациліну (BORSA), або штами з модифікованим пеніцилінзв'язуючим білком (MODSA), але у обох варіантів псевдо-MRSA *tesA* ген відсутній. Наукові дослідження, що були проведені у різних країнах, показали широке розповсюдження *tesA* гена у світі. Наші результати показують, що 25% ізолятів *S. aureus* виділених в Сумській області з молока корів містили ген *tesA*, тобто їх можна віднести до MRSA.

2 СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТИЦИЛІНРЕЗИСТЕНТНОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) ТА ДИФЕРЕНЦЮВАННЯ ЙОГО СЕРЕД ІНШИХ ІЗОЛЯТІВ ДАНОГО ВИДУ МІКРООРГАНІЗМУ ЯК ТАКОГО, У ЯКОГО НАЯВНИЙ АБО ВІДСУТНІЙ ГЕН *MECA*

Staphylococcus aureus має два механізми резистентності до антибіотичних препаратів β-лактамної групи. Перший пов'язаний з наявністю гену *blaZ*, який кодує ферменти β-лактамази. У свою чергу β-лактамази гідролізують препарати β-лактамної групи. Другий механізм резистентності пов'язаний із наявністю генетичної мобільної касети *SCCmec*, до складу якої входить ген *meсA*.

Було отримано 45 ізолятів *Staphylococcus aureus* із проб матеріалу, що був відібраний з гнійних уражень людей, тварин, та з об'єктів навколишнього середовища (грунт, вода). З цих ізолятів було отримано і досліджено 13 штамів *Staphylococcus aureus*. Для виділення чистих культур було застосовано середовище агар Байрд-Паркера. Виділені культури мали позитивні результати на коагулазну та каталазну активність.

Зразки було досліджено методом растрової електронної мікроскопії, за допомогою скануючого мікроскопу (нами був використаний електронний мікроскоп фірми «SELMІ» – РЭМ-106И, Україна) (рис. 2.1).

У кожній групі було досліджено по 125 окремих клітин.

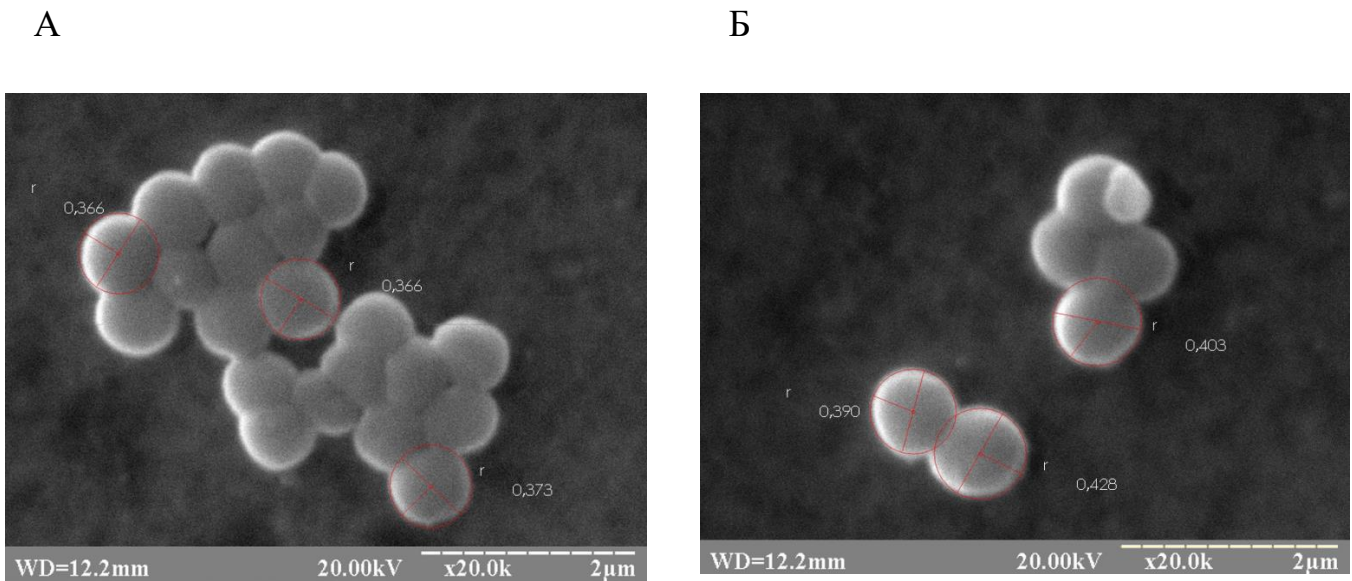


Рисунок 2.1 – *Staphylococcus aureus* з різними механізмами резистентності: А - *Staphylococcus aureus* (MRSA) з наявним геном *mecA*; Б - *Staphylococcus aureus* з відсутнім геном *mecA*

Таблиця 2.1 – Кількісні вимірювання радіусів бактерій *Staphylococcus aureus*

Статистичні показники	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) із наявним геном <i>mecA</i> , μm	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) із відсутнім геном <i>mecA</i> , μm
Кількість промірів	125	125
Максимальне значення радіусу клітин	0,591	0,613
Мінімальне значення радіусу клітин	0,291	0,306
Середнє значення радіусу клітин	0,397	0,431
Похибка середнього	0,068	0,058

При вимірюванні радіусу окремих бактерій цього виду виявилось, що метицилінрезистентний *Staphylococcus aureus* (MRSA), з наявним геном *mecA*, має менші розміри порівняно з метицилінчутливим *Staphylococcus aureus* (MSSA) з відсутнім геном *mecA*. Ці розміри для *Staphylococcus aureus* (MRSA) становлять 0,397 μm , а для *Staphylococcus aureus* (MSSA) 0,431 μm

(таб. 2.1). Статистичний аналіз кількісних даних показав, що похибка вимірювань становить для $mesA^+ \pm 0,0677$, для $mesA^- \pm 0,0578$. Згідно статистичних показників достовірність отриманих результатів є високою. Отже, результати дослідження вважаються достовірними.

Висновки до розділу

1. Із 36 досліджуваних проб молока, у 33,3% було виявлено коагулазопозитивні *S. aureus*, серед яких 25% за результатами бактеріологічних досліджень було віднесено до потенційних MRSA варіантів.

2. Ідентифіковані MRSA ізоляти мали величини діаметрів затримки росту, які характеризували їх як високо резистентні до шести антибіотиків: пеніциліну, амоксициліну, оксациліну, цефазоліну, тетрацикліну, еритроміцину із 10-ти досліджуваних. До гентаміцину, ванкоміцину, лінкомицину, рифампіцину ці ізоляти були чутливими.

3. Методом ПЛР підтверджена наявність гена *mesA* у трьох ізолятів *S. aureus*, що були виділені з проб молока, а також в 19,4% випадках підтверджено наявність даного гена в інших ізолятах *S. aureus* від людей та в ізолятах *S. aureus*, які були виділені від свиней, великої рогатої худоби та з риби. Це підтверджує можливість міжвидового перехресного контамінування MRSA.

4. Інформація, отримана в ході цього дослідження, корисна для розуміння поширення *S. aureus* та його чутливості до антибіотиків у молочних фермах і може бути корисною для місцевого та національного моніторингу або для розробки конкретних програм контролю MRSA ізолятів в харчовому ланцюгу виробництва молока. Крім того, вивчення антибіотикорезистентності серед ізолятів *S. aureus* у кожному господарстві є дуже важливим, особливо для успішного лікування стафілококових інфекцій

тварин для попередження перехресного контамінування ними через харчові продукти.

3 РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ІЗОЛЯТІВ *ESCHERICHIA COLI*, ВИДІЛЕНИХ З ПОВЕРХНІ ТУШ СВИНЕЙ ДО АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

В останні роки викликає тривогу швидке поширення штамів *E.coli*, які мають стійкість до антибіотиків третього і четвертого поколінь з широким спектром дії. Це особливо небезпечно в зв'язку з тим, що дані бактерії нерідко проявляють стійкість і до інших антимікробних засобів, наприклад, фторхінолонів [47]. *E. coli* відносяться до коменсальних бактерій, широко розповсюджені в довкіллі, а також часто контамінують харчові продукти [45]. *E.coli* можуть контамінувати туші забійних тварин із вмісту кишечника на момент забою, що створює проблему для забезпечення безпечності м'ясних продуктів [36, 37, 41, 43, 46, 49].

E. coli розглядається як індикаторний організм антимікробної резистентності для широкого кола бактерій. Тому дослідники з багатьох країн наводять дані про АМР ізолятів *E. coli*. Більшість досліджень стосуються АМР ізолятів *E. coli* виділених із об'єктів тваринництва. Вчені зазначають, що при виборі антибіотиків для тестування АМР *E. coli* необхідно зважувати на високу геномну пластичність цих мікроорганізмів, що може змінювати їх властивості дуже часто. Крім того, до *E. coli* можуть бути перенесені гени резистентності з інших АБР штамів бактерій. Тому *E. coli* тестують на резистентність до великої кількості антимікробних препаратів, у тому числі до амоксициліну пеніциліну, рифампіцину, окациліну, ванкоміцину, метициліну, амоксициліну, тетрацикліну тощо. Причому більшість дослідників відмічають про 100% стійкість *E. coli* до окациліну, рифампіцину і пенициліну. До інших антибіотиків відмічено регіональні відмінності відносно резистентності *E. coli* до різних антибіотиків [36, 45, 47, 48]. Слід відмітити, що думки вчених сходяться, на доцільності використання антибіотиків фторхінолонового ряду для

терапевтичних цілей тому що вони характеризуються широким спектром антимікробної дії та активні до багатьох збудників, в тому числі, до *E. coli* [42, 43].

Таким чином, актуальним питанням є проведення постійного моніторингу для визначення тенденцій резистентності *E. coli* до різних антибіотиків, що має важливе значення для економічного та громадського здоров'я. Оскільки продукти тваринного походження є найпоширенішою причиною захворювань, які передаються з їжею, існує актуальна необхідність проведення досліджень на АМР основних збудників харчових захворювань у тому числі і *E. coli*.

У зв'язку із цим, в країнах ЄС проводиться постійний моніторинг за *E. coli* відповідно до пріоритетних об'єктів. До таких пріоритетів відноситься продукція тваринного походження у тому числі і свинина. Контроль за виробництвом свинини включає моніторинг поширення АБР ізолятів *E. coli* на тушах свиней.

В Україні, за офіційними даними, в останні роки серед збудників інфекційних захворювань тварин та птиці, які були віднесені до АМР, найбільша частка належить *E. coli* - близько 40 %. Найбільший рівень резистентності *E. coli* проявляється до β -лактамів, а на другому місці до фторхінолонів та тетрациклінів. Рівні чутливості/резистентності мікроорганізмів до різних антибактеріальних препаратів в Україні мають відмінності залежно від регіону та збудника: відсоток виділення стійких бактерій до АБП найнижчий в Одеській області, а в Сумській він складає до 60% [36].

На міжнародному рівні для мінімізації проблеми АМР бактерій Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ), Продовольча та сільськогосподарська організація Об'єднаних націй (ФАО), Міжнародне епізоотичне бюро (МЕБ) та Комісія Кодекс Аліментаріус розробили

стратегію, основою якої є проведення моніторингу за АБР бактерій. Група експертів з Європейської організації з безпечності харчових продуктів (EFSA) з оцінки біологічних ризиків, зробила висновок про те, що їжа може стати засобом для передачі резистентних бактерій до людини. Експерти EFSA розробили рекомендації з профілактики та боротьби АМР та підтвердили необхідність моніторингу за АМР у тому числі за *E.coli* у тварин і у продуктах харчування [39, 40, 44, 45, 47].

ВООЗ розробила шляхи вирішення проблеми АМР, у тому числі для стримування поширення АМР і для цього необхідно використовувати підходи, які забезпечують безпечність харчових продуктів для населення. Крім того, для розуміння причин виникнення і тенденцій поширення резистентності до антибіотиків необхідний моніторинг за стійкістю до антибіотиків зоонозних і сапрофітних бактерій, виділених від різних сільськогосподарських тварин і з продукції тваринництва. Такий моніторинг повинен включати безперервний збір інформації про частоту виділення резистентних штамів, її аналіз і публікацію результатів, що дозволить здійснювати нагляд за стійкістю до антибіотиків, а також дозволяє ідентифікувати специфічні випадки резистентності як, наприклад до *E. coli* [36, 38, 47].

Таким чином, на даний час, стійкість до антибіотиків стала актуальною проблемою для охорони громадського здоров'я більшості країн світу.

Враховуючи те, що в Україні незначна кількість досліджень у даному напрямку, а також те, що всесвітньо визначена актуальність проведення моніторингу антибіотикорезистентності, ми вирішили провести дослідження по вивченню поширення АМР *E.coli* при виробництві свинини.

Метою даного етапу роботи є вивчення резистентності до антибіотиків ізолятів *E.coli*, виділених із поверхні туш свиней на м'ясопереробних підприємствах Одеської та Сумської областей.

Матеріал та методи досліджень. Матеріалом для досліджень були стійкі до АБП ізоляти *E.coli*, виділені із змивів з туш та подрібненого м'яса свиней. Відбір проб змивів проводили на м'ясопереробних підприємствах Одеської та Сумської областей. Мікробіологічні дослідження проводили в Одеській регіональній лабораторії ветеринарної медицини та в мікробіологічній лабораторії кафедри громадського здоров'я Сумського державного університету.

Відбір проб змивів здійснювали протягом 2017 р. Було відібрано 645 проб змивів згідно з вимогами ISO 17604. Проби відбирали у холодильній камері двічі: перед охолодженням туш свиней та не менше як через 12 год. після забою методом тампону з площі 100 см². Відбір змивів проводили із наступних 4-х місць поверхні туш свиней: задня голяшка, зовнішня поверхня тазостегнового відрубу, середина зовнішньої поверхні спинно - поперекового відрубу, внутрішня поверхня падини. Відбір проб змивів проводили щотижня. Кожного тижня у різний день проводили відбір проб від туш, щоб кожен день тижня був охоплений контролем. Проби змивів відбирали випадковою вибіркою, згідно чинних нормативних вимог від 3 – 5 туш щоденно. Змиви відбирали відповідно правил асептики, використовували фізіологічний розчин. Змиви досліджували в лабораторії протягом 2-х год після відбору змивів.

Мікробіологічні дослідження змивів з метою виділення ізолятів *E.coli* проводили шляхом посіву 5-го десятикратного розведення на одноразові чашки Петрі «Compact Dry» з селективним агаром для коліформ та *E.coli* (виробник NISSUI pharma). Посіви інкубували протягом 48 год при 37°C. До загальних *E.coli* відносили блакитні колонії, які в подальшому досліджували мікроскопічно та біохімічними тестами згідно чинних вимог.

Антимікробну резистентність *E.coli* визначали диско-дифузійним методом в чашках Петрі на Мюллер-Хінтон агарі, який попередньо був

засіяний суспензією із ізолятів *E.coli* щільністю 0,5 по МакФарленду. Після нанесення 0,5 мл суспензії на поверхню агара через 30 – 45 хв розміщували наступні диски антибіотиків: пеніцилін (10 мкг), метицилін (15 мкг), ванкоміцин (30 мкг), лінкоміцин (15 мкг), оксацилін (10 мкг), гентаміцин (30 мкг), офлоксацин (10 мкг), рифампіцин (25 мкг), ампицилін (10 мкг), стрептоміцин (20 мкг).

На кожен чашку розміщали по 4 диски антибіотиків. Досліджували у двократному повторі. Через 24 год інкубування за температури 37 ± 2 °C вимірювали лінійкою діаметри зон затримки росту в мм. Оцінку рівнів резистентності оцінювали згідно до критеріїв інтерпретації результатів визначення рівня чутливості до антибіотиків [36].

Крім диско-дифузійного методу, визначали значення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) для виділених АМР ізолятів *E.coli*, для чого використовували смужки Е-тесту HiComb, МІС – Test для *E.coli* (ТМ Himedia), які містять різні концентрації досліджуваного антибіотика від максимальної до мінімальної. Ми дослідили Е-тестом два антибіотики: ампицилін (β -лактамна група) до якого нами була виявлена висока стійкість досліджуваних ізолятів *E. coli* та офлоксацин (фторхінолонова група), до якого була встановлена найбільша чутливість цих ізолятів.

Ступінь чутливості визначали у найвужчому місці еліпсоїдної зони пригнічення росту у мм відповідно до значень, наведених у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Критерії оцінювання рівня чутливості ізолятів *E. coli* до офлоксацину та ампициліну

Назва антибіотика	Критерії оцінки мм		
	Чутливий <=	Проміжний	Стійкий >=
Офлоксацину	2	4	8
Ампициліну	8	16	32

Згідно з інструкцією, якщо зони затримки росту не виявлено, тоді МІК більша за найвищу концентрацію, що зазначена на смужці, а якщо зона інгібування менша за найнижчу концентрацію, тоді вважають, що МІК нижча за найнижчу концентрацію.

Результати досліджень та обговорення. Із досліджуваних 645 проб змивів з поверхонь туш свиней: 318 з Одеської області та 327 із Сумської області, відповідно були виділені ізоляти *E.coli* у 15,3% (49 проб) та 19,2% (63 проб) випадків. Результати досліджень ізолятів *E.coli* на наявність у них резистентності до антибіотиків наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Результати досліджень ізолятів *E.coli*, виділених із поверхні туш свиней на резистентність до антибактеріальних препаратів

Антибіотики	Кількість ізолятів з Одеської області			Кількість ізолятів з Сумської області		
	Досліджених	Виявлено АМР	%	Досліджених	Виявлено АМР	%
пеніцилін	49	25	51,1	63	47	74,6
метицилін	49	29	59,2	63	45	71,4
ампіцилін	49	33	67,3	63	51	80,6
ванкоміцин	49	9	18,4	63	26	41,3
лінкоміцин	49	11	22,4	63	33	52,4
оксацилін	49	21	42,9	63	42	66,7
гентаміцин	49	12	24,5	63	28	44,4
офлоксацин	49	2	4,1	63	3	4,8
рифампіцин	49	10	20,4	63	26	41,3
стрептоміцин	49	18	36,7	63	37	58,7

Дані таблиці 3.2 свідчать про те, що у змивах з поверхонь туш свиней з Одеської області були виділені стійкі до антибіотиків ізоляти *E.coli* у середньому в 34,7% випадків, а в Сумській області у 53,7 %. Усього при тестуванні 10 антибіотиків з ізолятами *E.coli* з Одеської області було проведено 490 досліджень (40 ізолятів *E.coli* дослідили на чутливість стійкість до 10 антибіотиків), а з ізолятами із Сумської області – 630 (63

ізоляти *E.coli* дослідили на чутливість стійкість до 10 антибіотиків). При цьому, в змивах з поверхні туш свиней з Одеської області було виявлено 170 антибіотикорезистентних штамів *E.coli*, що складає 34,7%, а в змивах із Сумської області виявлено 338 антибіотикорезистентних штамів *E.coli* (53,7%). Більша кількість випадків прояву резистентності в ізолятах *E.coli* була виявлена по відношенню до пеніциліну, метициліну, ампіциліну (від 46,9% до 67,3% випадків) в Одеській області, а в Сумській – пеніциліну, метициліну, ампіциліну, оксациліну та стрептоміцину (від 71,4 до 80,6% випадків).

В межах 18,4%–24,5% ізоляти *E.coli* були стійкими до ванкоміцину, лінкоміцину, гентаміцину, рифампіцину (Одеська область), а Сумській області до цих антибіотиків *E.coli* проявляли стійкість у 41,3% до 52,4% випадків.

Необхідно звернути увагу на те, що стійкі ізоляти *E.coli* до АБП, які були виділені з туш в Одеській області, та ті, що були виділені у Сумській області не мали резистентності до офлоксацину у 95,9% та 95,2% випадків відповідно, що може свідчити про високу антибактеріальну ефективність цього антибіотику щодо АБР *E.coli*.

Отже досліджувані ізоляти *E.coli* були стійкими до бета-лактамних антибіотиків та чутливі фторхінолонів (офлоксацин).

Слід відмітити, АБР ізоляти *E.coli* проявляли як моно- так і мультирезистентність до досліджуваних нами антибіотиків (табл.3.3).

Таблиця 3.3 – Кількість моно - та мультистійких ізолятів *E.coli* до АБП, що були виділені із туш свиней

К-ть ізолятів <i>E.coli</i>	АБР	Кількість антибіотиків, до яких проявляли стійкість АБР ізоляти <i>E.coli</i> , (к-ть ізолятів /%)			
		1	2	3	4
Одеська область					
49		22/44,9	17/34,7	5/10,2	5/10,2
Сумська область					
63		31/49,3	19/30,1	7/11,1	6/9,5
Всього					
112		53/47,4	36/32,1	12/10,7	11/9,8

Із таблиці 3.3 видно, що найбільша кількість АМР ізолятів *E.coli* проявляла моностійкість до антибіотиків (від 44,9% до 47,4%). Найбільш часто АБР ізоляти *E.coli* були резистентними до двох антибіотиків, що склало 32,1%. В меншій мірі досліджувані ізоляти *E.coli* проявляли одночасну стійкість 4-х антибіотиків.

Ефективність виявлення стійкості бактерій, традиційним диско-дифузним методом дозволяє лише опосередковано зробити висновок про величину МІК, а результатом цього дослідження є віднесення мікроорганізму до однієї з категорій чутливості (моночутливість, полістійка антибіотикорезистентність), тому ці дослідження рекомендується підтверджувати додатковими тестами [41, 48].

Для підтвердження ефективності диско-дифузійного методу, ми використали Е-тест для *E. coli* на чутливість до офоксацину (до нього висока чутливість досліджуваних ізолятів) та до ампіциліну (висока стійкість досліджуваних ізолятів). Результати досліджень проілюстровані на рисунку 1.

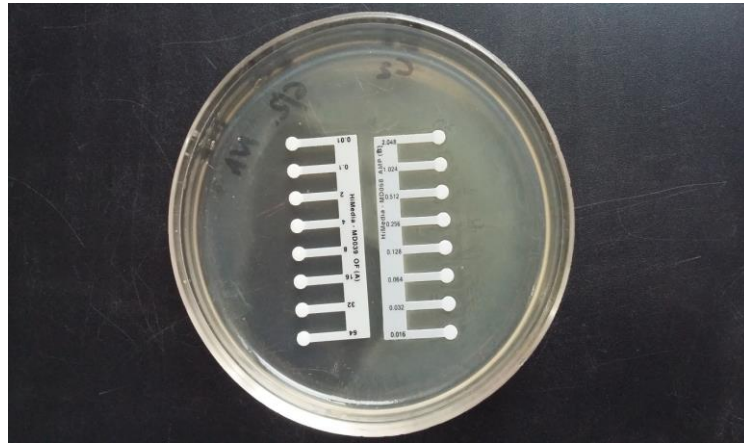


Рисунок 3.1 - Дослідження ізолятів *E.coli*, виділених із змивів з поверхні туш свиней Е-тестом.

Примітка : *Смужка зліва – ізолят E.coli чутливий до офлоксацину (OF), смужка справа- ізолят E.coli, резистентний до ампіциліну (AMP).*

Як видно із рис 3.1, по відношенню до офлоксацину зона затримки росту досліджуваних ізолятів *E. coli* має форму еліпсу. У найвужчій зоні цього еліпсу визначали значення МІК, яке у даному випадку для АМР ізолятів *E. coli*, становить 0,01 мкг/мл, що є найменшою концентрацією цього антибіотику на даній Е- тест смужці. Це підтверджує ті результати про високу чутливість ізолятів *E. coli* до офлоксацину, які були отримані нами дисковим методом. Е-тестом підтверджено також високу резистентність досліджуваних ізолятів *E.coli* до ампіциліну.

За результатами вимірювання зони затримки росту ізолятів *E.coli* у найвужчому місці еліпсу в Е-тесті відносно офлоксацину, було встановлено, що вона є меншою ніж 2 мм (МІК дорівнює 0,01 мкг/мл), що свідчить про те, що ізоляти слід віднести до чутливих до даного антибіотику .

Отже, як показали наші дослідження, більшість ізолятів АМР *E.coli*, були стійкими до бета-лактамних антибіотиків, тобто мали здатність продукувати бета-лактамази. Особливо інтенсивно проявлялась дія бета-лактамаз у досліджуваних ізолятів *E.coli* по відношенню до ампіциліну. Слід

підкреслити те, що ампіцилін відноситься до групи амінопеніцилінів широкого спектру дії та використовується як для лікування людей так і у ветеринарній практиці та вважається як «критично важливий» для контролю за АМР бактеріями.

Бактерії, що мають здатність виробляти бета-лактамази вважаються великою проблемою для громадського здоров'я особливо ті, що виробляють *E. coli*.

Висновки до розділу

1. Результати досліджень свідчать, що в Одеській області в змивах з поверхонь туш свиней було виділено АМР ізоляти *E.coli* у середньому в 34,7% випадків, а в Сумській області у 53,7 %, найбільшу стійкість ізоляти проявляли до ампіциліну – у 67,3% випадках в Одеській області, та у 80,6% - Сумській.

2. АБР ізоляти *E.coli* у середньому від 45% - 47% випадків проявляли моностійкість до антибіотиків та – 32 % випадків були стійкими до 2-х антибіотиків і в найменшій їх стійкість проявлялась до 4-х антибіотиків.

3. АБР ізоляти *E.coli*, які були виділені з туш в Одеської та Сумської областей не мали резистентності до офлоксацину у 95,9% та 95,2% випадків.

4. Методом Е-тесту встановлено значення МІК до офлоксацину, що становить 0,01 мкг/мл і є найменшою концентрацією цього антибіотику у даному тесті. Е-тестом підтверджено резистентність досліджуваних АМР *E.coli* до ампіциліну, що дає підставу рекомендувати обмежене використання цього антибіотику у гуманній та ветеринарній медицині.

Перспективою подальших робіт передбачено проведення досліджень щодо встановлення розповсюдження АМР *E.coli* в ланцюгу виробництва м'ясопродуктів із свинини та наукове обґрунтування заходів по стримуванню поширення цих мікроорганізмів.

4 ВИВЧЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МЕДУ ЩОДО МЕТИЦИЛІНРЕЗИСТЕНТНИХ СТАФІЛОКОКІВ

Бджолиний мед з давніх часів застосовувався з лікувальною метою у багатьох народів для лікування кашлю, ангіни, інфікованих виразок на шкірі, при болі у вусі, для лікування кору, захворювання очей і виразки шлунка [61, 63].

В даний час лікувальна дія меду визнається не тільки медициною, а й фармакологією. Натуральний бджолиний мед містить цінні для організму мінеральні речовини, мікроелементи, вітаміни, ферменти, біологічно активні речовини, що мають бактерицидні властивості. Мед має сприятливу дію на нервову систему і на серцевий м'яз. Сучасна медицина рекомендує мед при багатьох захворюваннях від загоєння ран до лікування онкологічних хворих [66]. В останні роки, до меду почав проявлятися новий інтерес як до важливого природного ресурсу для нових методів лікування, що не мають тих побічних ефектів, які часто зустрічаються при використанні синтетичних хімічних лікарських засобів [53, 54, 65].

Цілющі властивості натурального меду проявляються завдяки наявності в ньому широкого спектра біологічно активних речовин: флавоноїдів, органічних кислот, ферментів, вітамінів, амінокислот та ін. До складу меду входять органічні (мурашина, молочна, винна, щавлева, лимонна) і неорганічні (фосфорна, соляна) кислоти, що створюють його кислотність, яка теж відіграє роль в його бактерицидних властивостях. Мед – це один з давніх видів ліків, який використовуються для загоєння ран для лікування ангін та інших захворювань [60,61].

Крім того, вченими було встановлено, що мед проявляє антибактеріальні властивості до тих бактерій до яких антибіотики були неефективні [65, 66].

Необхідно зазначити, що антибактеріальні властивості меду по відношенню до стійких до антибіотиків бактерій в нашій країні вивчені недостатньо.

Таким чином, у зв'язку з поширенням антибіотикорезистентності, актуальним напрямом щодо проведенням наукових досліджень є пошук альтернативних антибіотикам терапевтичних засобів які б мали виражену антибактеріальну дію. Особливо актуальним це питання стає відносно пошуку лікувальних засобів, які б мали ефективність відносно широко розповсюджених метицилінрезистентних стафілококів.

Метою даного етапу роботи було експериментальне вивчення антибактеріальних властивостей меду відносно до ізолятів метицилінрезистентних *Staphylococcus spp.* Щоб досягти поставленої мети ми розв'язували такі завдання: виділяли ізоляти *Staphylococcus spp.* та визначали рівні їх антибіотикочутливості до 10 антибіотиків, а також підбирали проби якісного меду для цих досліджень.

Матеріал та методи досліджень. Матеріалом для досліджень слугували антибіотикорезистентні ізоляти *Staphylococcus spp.* (methicillin-resistant *Staphylococcus spp.* – MRSS), ідентифіковані із молока корів та із носових виділень пацієнтів, хворих ГРЗ, які проявляли стійкість до бета-лактамних антибіотиків, у тому числі до метициліну), а також проби натурального бджолиного поліфлорного меду з пасік Одеської області.

Експериментальну частину роботи було виконано в акредитованій лабораторії мікробіологічних досліджень кафедри громадського здоров'я СумДУ. Визначали антибактеріальні властивості меду відносно антибіотикостійких ізолятів *Staphylococcus spp.*, виділених із збірного молока корів та із носових виділень від пацієнтів, хворих на гострі респіраторні захворювання. Ідентифікацію стафілококів проводили на сольовому агарі із 6,5% NaCl. Для мікроскопії відбирали круглі колонії, які

злегка піднімаються над поверхнею агару та з рівними краями, діаметром 2 – 3 мм. До *Staphylococcus spp.* відносили грам-позитивні бактерій, які мали сферичну форму (коки) і формували виноградоподібні кластери. Ізоляти *Staphylococcus spp.* були перевірені на стійкість до антибіотиків. Були відібрані ті ізоляти, які проявляли стійкість до бензиленициліну, еритроміцину, ванкомицину, лінкомицину, тетрацикліну, гентаміцину, оксациліну, пеніцилін, амоксициліну та метициліну.

Антибіотикорезистентність ізолятів *Staphylococcus spp.* визначали методом дисків в чашках Петрі на поживному агарі, який попередньо був засіяний суспензією із зазначених ізолятів щільністю 0,5 по МакФарленду. Після нанесення на поверхню агару 0,5 мл суспензії, через 15 хв розміщували диски вищезазначених 10-ти антибіотиків. Інкубацію посівів з дисками антибіотиків проводили при температурі $37\pm 1^\circ\text{C}$ протягом 16-20 год.

Антибактеріальні властивості меду вивчали лунковим методом на поживному агарі в чашках Петрі, засіяному суспензією досліджуваних бактерій *Staphylococcus spp.*, згідно до чинної методики [51]. Готували бактеріальну суспензію шляхом внесення стерильною бактеріологічною петлею декількох колодний *Staphylococcus spp.*, у пробірку з стерильним ізотонічним розчином. Для приготування суспензії використовували колонії 18 – 24 годинної культури *Staphylococcus spp.* Отриману суспензію доводили до отримання щільності 0,5 по стандарту МакФарланда шляхом добавлення до неї мікробної маси або раз бавлення її стерильним ізотонічним розчином (щільність 0,5 по стандарту МакФарланда відповідає приблизно концентрації бактерій $1 - 2 \times 10^8$ КУО/мл).

Підготовлену бактеріальну суспензію в кількості 0,5 мл наносили на поверхню поживного агару та круговими рухами чашок Петрі її розподіляли рівномірно по поверхні агару. Після підсихання суспензії на поверхні агару

(протягом 15-10 хв) на його поверхні в кожній чашці Петрі робили по 4 луночки стерильною скляною трубочкою діаметром 2 мм. Для вивчення антибактеріальних властивостей меду використовували розчини досліджуваних проб меду у стерильній дистильованій воді в співвідношенні мед/ розчинник 1:1;1:2; 2:1; 3:1. До лунок на поживному середовищі вносили суспензії ізолятів *Staphylococcus spp.*, приготовлених, як зазначалось вище. До кожної лунки вносили розчини меду не пізніше ніж 15 хв після приготування луночок. Інкубували посіви протягом 18 – 20 год при $37\pm 1^\circ\text{C}$. Оцінка результатів: чашку Петрі з агаром розміщували дном догори із закритою кришкою на темну поверхню. Вимірювання зон пригнічення росту проводили за допомоги лінійки. Усі дослідження, що зазначені вище проводили у трьохкратному повторі.

Результати досліджень та обговорення. Було досліджено 27 проб бджолиного меду, які були відібрані протягом 2016 – 2017 рр. безпосередньо в бджолярів на пасіках, що попереджувало їх фальсифікацію. Проби зберігалися в холодильнику при температурі $5\pm 1^\circ\text{C}$. Проби меду були досліджені на органолептично, на вміст вологи, кислотність, та вміст амінокислоти проліну відповідно до методів, що викладені в ДСТУ 4497:2015.

Таблиця 4.1 – Показники якості досліджуваних проб меду

№ проби	Колір меду	Консистенція	Кислотність	Вміст води, %	Пролін, мг/кг
2016					
2/2016	Жовтий	щільна	20	13,2	385,89
10/2016	Жовтий	щільна	30	15,1	439,11
2/2016	Жовтий	щільна	25	14,5	405,34
10/2016	Жовтий	щільна	35	16,3	461,01
7/2016	Темно-жовтий	в'язка	24	15,8	310,65
8/2016	Темно-жовтий	дуже вязка	35	17,9	356,6
9/2016	Темно-жовтий	щільна	33	13,6	322,12

Продовження табл. 4.1

7/2016	Темно-жовтий	в'язка	28	15,3	331,15
8/2016	Темно-жовтий	дуже вязка	35	18,8	373,32
9/2016	Темно-жовтий	щільна	31	16,2	389,14
14/2016	Світло-жовтий	в'язка	22	16,6	319,78
14/2016	Світло-жовтий	в'язка	27	18,4	338,12
4/2017	Світло-жовтий	щільна	28	16,7	391,21
4/2017	Світло-жовтий	щільна	27	17,4	371,16
2017					
2/2016	Жовтий	щільна	21	17,2	392,19
10/2016	Жовтий	щільна	33	18,1	421,12
2/2016	Жовтий	щільна	27	19,2	397,16
5/2017	Темно-жовтий	рідка	20	14,3	372,0
5/2017	Темно-жовтий	рідка	25	16,1	369,11
9/2017	Темно-жовтий	рідка	35	18,0	499,64
10/2017	Темно-жовтий	рідка	16	15,1	305,78
9/2017	Темно-жовтий	рідка	37	18,0	499,64
10/2017	Темно-жовтий	рідка	19	15,1	305,78
7/2017	Світло-жовтий	рідка	15	15,7	354,14
4/2017	Світло-жовтий	щільна	27	18,1	451,15
7/2017	Світло-жовтий	рідка	18	15,7	359,21

Примітка: згідно чинним в Україні вимогам до меду, у ньому норма кислотності – не більше 40, вміст води - не більше 18,5%; вміст проліну- не менше 300мг/ кг.

Як видно з таблиці 1 при визначенні якості меду за органолептичними показниками було встановлено, що відібрані нами зразки меду мали природній колір від світло-жовтого до темно-жовтого. Колір меду на основі затверджених стандартів колір є одним з основних характеристик для ботанічної класифікації меду. Як відомо, мед більш темного кольору має більш високу ферментну активність.

Вміст води в меді - один з ключових чинників, що визначає якість меду та залежить від ступеня зрілості меду, а також від терміну та умов його зберігання. У даному дослідженні, вміст води у пробах меду був в межах від 13,2 і 18,0 %, тобто відповідав встановленим нормам для якості меду.

Низький вміст вологи виставлений у більшості досліджених зразків

меду забезпечує кращу якість цих зразків меду, що також сприяє кращому зберіганню меду.

Показники загальної кислотності меду в наших дослідженнях коливались від 15 до 40,0. Загальна кислотність вище 40 є результатом закисання меду внаслідок порушення правил зберігання.

Вміст проліну в досліджуваних зразках меду був в межах норми від 305 мг/ кг до 499мг/ кг. Пролін є однією з найпоширеніших амінокислот в меді, і тому, як правило, цей показник вибирають в якості стандарту для кількісного визначення вмісту амінокислот. Амінокислоти виступають одними з найважливіших компонентів меду, оскільки в них міститься широкий спектр ферментів, білків пилкових зерен і вільні амінокислоти Крім того, вміст проліну є показником натуральності, зрілості меду та є також показником його фальсифікації. Менша норми кількість проліну свідчить про його фальсифікацію – бджіл кормили цукром або сумішшю меду з цукром, або піддавали нагріванню при високій температурі, щоб придати рідку консистенцію меду. Мінімальною кількістю проліну в меді вважається 300 мг/кг. При меншій кількості проліну в меді він не може бути віднесений до категорії «мед». Також було відмічено пряму залежність між умістом проліну та кислотністю меду. Тобто мед із високим умістом проліну мав більш високу кислотність порівняно з пробами меду, в яких був нижчий рівень проліну.

Нижче наведено рис. 4.1, який наглядно ілюструє, що водні розчини меду з проб № 2/2016 та 10/2016 проявляють достатньо високу ефективну дію по відношенню до антибіотикочутливих ізолятів *Staphylococcus spp.* Слід відмітити, що зони затримки росту за дії водних розчинів меду мали чіткі контури.

На рис. 4.1. видно, що водні розчини таких проб меду як № 2/2016 та 10/2016 проявляли антибактеріальну дію відносно *Staphylococcus spp.* майже

на однаковому рівні. Причому ця дія незначно відрізняється у різних розведеннях меду, але все ж таки, зазначаємо, що більш концентровані водні розчини меду мали більшу антибактеріальну дію ніж менш концентровані.

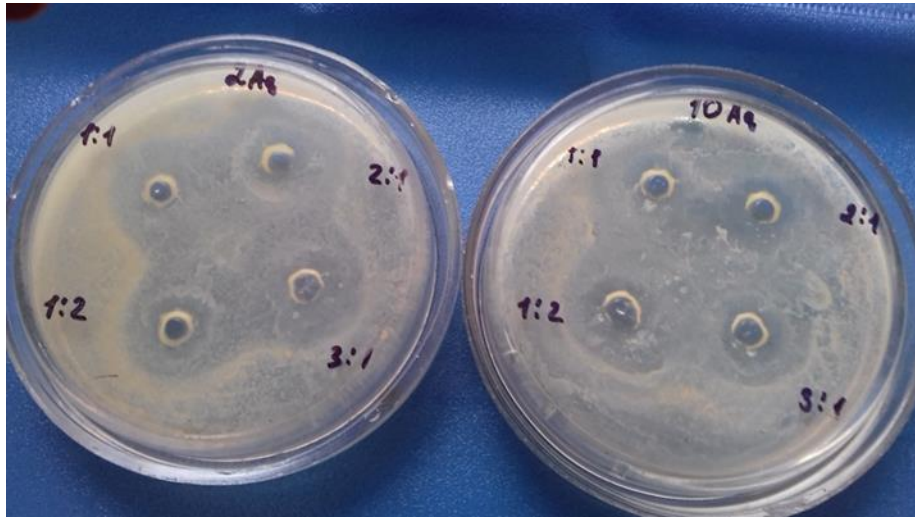


Рисунок 4.1 - Антибактеріальна дія водних розчинів меду (проби меду № 2/2016 та 10/2016)

Як видно із рис 4.1, проба меду № 10/2016 проявляє більш високий рівень антибактеріальної дії відносно *Staphylococcus spp.* У таких водних розчинах (співвідношення мед/вода) як 2:1 та 3:1, ми визначили вищу антибактеріальну дію порівняно з дією водних розчинів меду у розведеннях 1:1 та 1:2. Це підтверджено тим, що діаметри затримки росту при застосуванні водних розчинів меду в розведенні 2:1 та 3:1 були на 2,5- 3,7 мм більшими ніж від розчинів меду у співвідношеннях 1:1 та 1:2.

Результати вимірювань зон затримки росту антибіотикорезистентних ізолятів *Staphylococcus spp.* наведено у таблиці 2.

Таблиця 4.2 – Результати вимірювань зон затримки росту *Staphylococcus spp.* за використання водних розчинів меду(середні дані, мм)

Досліджувані проби, №	Зони затримки росту у мм	
	Мінімальні значення	Максимальні значення
2/2016	34±2	41±1
7/2016	29±1	34±1
8/2016	47±2	51±2
9/2016	27±1	34±1
10/2016	37±1	45±2
14/2016	21±1	23±1
4/2017	35±2	46±2
5/2017	46±1	57±2
7/2017	13±1	10±1
9/2017	16±2	29±2
10/2017	11 ±1	19±1

Дані таблиці свідчать, що у тих пробах меду, які мали більш високі значення умісту проліну, антибактеріальна активність була вищою (були більші зони затримки росту *Staphylococcus spp*) у порівнянні з тими пробами меду, у яких уміст проліну був меншим. Отримані результати досліджень необхідні при розробці антибактеріальних засобів із меду і свідчать про те, що перед приготуванням таких засобів слід досліджувати мед на уміст проліну. Крім того, отримані нами дані сприятимуть рекламуванню якісних характеристик вітчизняного меду та розширенню можливостей для торгівлі ним як на вітчизняному так і на міжнародному ринках.

Висновки до розділу

1. Експериментально встановлено, що більшість видів досліджуваних проб меду, які мали високі якісні показники проявляли антибактеріальну дію щодо антибіотикорезистентних ізолятів *Staphylococcus spp.*, причому більш високий рівень антибактеріальної дії проявляли проби меду, в яких був високий уміст проліну.

2. Встановлено, що антибактеріальна дія меду щодо антибіотикорезистентних ізолятів *Staphylococcus spp.* краще проявляється в більш концентрованих водних розчинах, а саме при розведенні у співвідношенні мед/розчинник як 2:1 та 3:1 (зони затримки росту від 34 мм до 58 мм) порівняно з розчинами меду розведеними в пропорціях 1:1 та 1:2(зони затримки росту від 10 мм до 15 мм).

Перспективою подальших досліджень буде вивчення впливу інших складників меду на його антибактеріальну активність. Крім того, планується вивчення антибактеріальної активності меду до інших видів мікроорганізмів.

ВИСНОВКИ

1. Слід відмітити, що з 36 досліджуваних проб молока, у 33,3% було виявлено коагулазопозитивні *S. aureus*, серед яких 25% за результатами бактеріологічних досліджень було віднесено до потенційних MRSA варіантів.

2. Ідентифіковані MRSA ізоляти мали величини діаметрів затримки росту, які характеризували їх як високо резистентні до шести антибіотиків: пеніциліну, амоксициліну, оксациліну цефазоліну, тетрацикліну, еритроміцину із 10-ти досліджуваних. До гентаміцину, ванкомицину, лінкомицину, рифампіцину ці ізоляти були чутливими.

3. Методом ПЛП підтверджена наявність гена *mecA* у трьох ізолятів *S. aureus*, що були виділені з проб молока, а також в 19,4% випадках підтверджено наявність даного гена в інших ізолятах *S. aureus* від людей та в ізолятах *S. aureus*, які були виділені від свиней, великої рогатої худоби та з риби. Це підтверджує можливість міжвидового перехресного контамінування MRSA.

4. Серед ізолятів можуть зустрічатися варіанти з надлишковою продукцією бета-лактамази, які частково втрачають чутливість до оксациліну (BORSA), або штами з модифікованим пеніцилінзв'язуючим білком (MODSA), але у обох варіантів псевдо-MRSA *mecA* ген відсутній. Наукові дослідження, що були проведені у різних країнах, показали широке розповсюдження *mecA* гена у світі. Наші результати показують, що 25% ізолятів *S. aureus* виділених в Сумській області з молока корів містили ген *mecA*, тобто їх можна віднести до MRSA.

5. Інформація, отримана в ході цього дослідження, корисна для розуміння поширення *S. aureus* та його чутливості до антибіотиків у молочних фермах і може бути корисною для місцевого та національного моніторингу або для розробки конкретних програм контролю MRSA ізолятів в харчовому ланцюгу виробництва молока. Крім того, вивчення антибіотикорезистентності серед ізолятів *S. aureus* у кожному господарстві є дуже важливим, особливо для успішного лікування стафілококових інфекцій тварин для попередження перехресного контамінування ними через харчові продукти.

6. Експериментально встановлено, що більшість видів досліджуваних проб меду, які мали високі якісні показники проявляли антибактеріальну дію щодо антибіотикорезистентних ізолятів *Staphylococcus spp.*, причому більш високий рівень антибактеріальної дії проявляли проби меду, в яких був високий уміст проліну. А саме при розведенні у співвідношенні мед/розчинник як 2:1 та 3:1 (зони затримки росту від 34 мм до 58 мм) порівняно з розчинами меду розведеними в пропорціях 1:1 та 1:2 (зони затримки росту від 10 мм до 15 мм).

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів/ Методичні вказівки № 9.9.5 - 143 - 2007/Міністерство охорони здоров'я України, Державна санітарно-епідеміологічна служба, Київ. – 2007. – 10 с.
2. Гаркавенко Т.О., Бергілевич О.М. Вивчення антибіотикорезистентності основних збудників бактеріальних захворювань тварин та птиці до β -лактамів в Україні/ Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія». – 2017. – Вип. 31. – С. 33–45.
3. Aubry-Damon Y. Antimicrobial Resistance in Commensal Flora of Pig Farm /Aubry-Damon Y., Grenet K.// *Emerging Infectious Diseases*. – 2004. – 10(5). – P. 8773–8779.
4. Blagojevic B. Ratio between carcass-and skin-microflora as an abattoir process hygiene indicator / B. Blagojevic, D.Antic, M.Ducic// *Food Control*. – 2011. – 22. – P.186–190.
5. Collignon P. Resistant *Escherichia coli* – we are what we eat /*Clinical Infectious diseases*. – 2009. – 49(2). – P.202–204.
6. European Food Safety Authority. Report of the Task Force of Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* from food animals. *EFSA Journal*. – 2008. – 141/ - P. 1 – 44 (<http://efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/141r.pdf>)
7. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009 [Electronic resource]// *Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. – 2010. – 208 p.
8. Hara-Kudo Y., Konishi N., Ohtsuka K. Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: a collaborative study. *Int. J. Food Microbiol.* – 2008. – Vol. 122(1-2). – P. 156 – 161.
9. Mevius M. Monitoring of antimicrobial resistance and antimicrobial usage in animals in the Netherlands in 2008. Lelystad, Veterinary Antibiotic Usage and Resistance Working Group, 2010. Retrieved from <http://www.cvi.wur.nl/NR/rdonlyres/DDA15856-1179-4CAB-BAC628C4728ACA03/>
10. McEwen S.A. and Fedorka-Cray P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis*. – 2002. – P. 34.
11. Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* from food animals 1 (Question

No EFSA-Q-2007-131) Adopted by the Task Force on 11-12 March 2008 The EFSA Journal, 2008. – №141. – 1–44.

12. Van Boeckel T.P. Global trends in antimicrobial use in food animals // T.P.Van Boeckel, C.Brower, M. Gilbert, B.T.Grenfell, S.A.Levin, T. P. Robinson, A.Teillant, R. Laxminarayan/ Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – №112(18). – P. 5649–5654.

13. Shao-Hung W. *Escherichia coli* contamination of pork carcasses in UK slaughterhouses. PhD thesis, University of Nottingham. – 2013. – P. 125.

14. Critically important antimicrobials for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use: report of the second WHO, Copenhagen, [Expert Meeting], (29 – 31 May 2007), ISBN 978 92 4 159574 2.

15. Zhao J. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment // J. Zhao, Z. Chen, S. Chen, Y. Deng, Y.Liu, W.Tian, X. Huang, C. Wu, Y. Sun, Y. Sun, Z.Zen, J.H. Liu // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – 54. – P. 4219–4224.

16. Valerie M. Bohaychuk. Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada /Valerie M. Bohaychuk, Gary E. Gensler, Pablo R. Barrios. // Can Vet J. – 2011. – Vol. 52(10). – P. 1095–1100.

17. Бергілевич А. Н., Лоцкін І. Н., Шубин П. А. и др. Анализ антибиотикорезистентности *Staphylococcus spp.*, выделенных из объектов молочных ферм //Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства, УО «Белорусская государственная с/х академия»: Горки.-БГСХА.-2017.- сб.науч. трудов. – Вып. 20. – Ч. 2 –С. 303 – 310.

18. Гаркавенко Т. О., Бергілевич О. М. Вивчення антибіотикорезистентності основних збудників бактеріальних захворювань тварин та птиці до β -лактамів в Україні.- Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія». – Вип.31. – 2017. – С. 33 – 45.

19. Дьяченко А. Г., Магінга Барака Муса. Чутливість стафілококових біоплівки до різних комбінацій антибіотиків. /Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції і пленуму Асоціації інфекціоністів Сумщини «Антибіотикорезистентність та шляхи її подолання», 30 – 31 травня, 2012. – с. 9 – 11.

20. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів/ Методичні вказівки № 9.9.5 - 143 - 2007/Міністерство охорони здоров'я України, Державна санітарно-епідеміологічна служба, Київ. – 2007. – 10с

21. Касянчук В. В., Бергілевич О. М., Скляр О. І., Лоцкін І. М. Вивчення чутливості до антибіотиків ізолятів *Staphylococcus spp.*, виділених

з об'єктів довкілля молочних ферм Сумської області. Збірник наукових праць ХЗДВА. – Харків, 2016. – с. 249 – 255.

22. Berhilevych O. M., Kasianchuk V. V., Kukhtyn M. D., Lotskin I. M., Garkavenko T. O., Shubin P. A. Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 2017. – Vol. 8(4) – P. 559 – 563.

23. Antibiotic/Antimicrobial Resistance Threat Report Centers for Disease Control and Prevention, 2013 www.cdc.gov <http://www.cdc.gov/drugresistance/>

24. Chamber H. F., DeLeo, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus* in the antibiotic era / *Nature Reviews Microbiology*, 2009. – Vol. 7(9) – P. 629 – 641. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871281/>

25. Dalia A. Hamza, Sohad M. Dorgham, Amany Arafa. Coagulase Gene Typing with Emphasis on Methicillin-Resistance *Staphylococci*: Emergence to Public Health// *Advances in Infectious Diseases*, 2015. – Vol.5. - №4. – P. 196 – 203.

26. Davies J., Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance/ *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010. – Vol.74 (3). – P. 417 – 33. <http://mmbr.asm.org/content/74/3/417/>

27. FDA Regulation to Help Ensure Judicious Use of Antibiotics in Food-Producing Animals” U.S. Food and Drug Administration, 2 Jun. 2015 <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm448620.htm>

28. Matsunaga T., Kamata S., Kakiichi N., Uchida K. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J Vet Med Sci.*, 1993. – Vol.55. – P. 297–300.

29. Larsen H.D., Sloth K.H., Elsberg C. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in nine Danish dairy herds. *Vet Microbiol.*, 2000. – Vol.71. – P.89 – 101.

30. Petinaki E., Miriagou V., Hatzi F., Kontos F., Maniati M., Maniatis A.N. Bacterial resistance study group. Survey of methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus aureus* in the hospitals of central Greece. *Int J Antimicrob Agents.*, 2001. – Vol.18. – P. 563 – 566.

31. Waage S., Bjorland J., Caugant D.A. Spread of *Staphylococcus aureus* resistant to penicillin and tetracycline within and between dairy herds. *Epidemiol Infect.* 2002. – Vol.129. – P.193–202.

32. WHO multi-country survey reveals widespread public misunderstanding about antibiotic resistance. The World Health Organization, 16 Nov. 2015 <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/antibiotic-resistance/en/>

33. Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., Louie T., Conly J.M. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of

staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol., 2005). – Vol.43(10). – P. 5026-33.

34. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів/ Методичні вказівки № 9.9.5 - 143 - 2007/Міністерство охорони здоров'я України, Державна санітарно-епідеміологічна служба, Київ. – 2007. – 10 с.

35. Гаркавенко Т.О., Бергілевич О.М. Вивчення антибіотикорезистентності основних збудників бактеріальних захворювань тварин та птиці до β -лактамів в Україні/ Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія». – 2017. – Вип. 31. – С. 33–45.

36. Aubry-Damon Y. Antimicrobial Resistance in Commensal Flora of Pig Farm /Aubry-Damon Y., Grenet K.// Emerging Infectious Diseases. – 2004. – 10(5). – P. 8773–8779.

37. Blagojevic B. Ratio between carcass-and skin-microflora as an abattoir process hygiene indicator / B. Blagojevic, D.Antic, M.Ducic// Food Control. – 2011. – 22. – P.186–190.

38. Collignon P. Resistant *Escherichia coli* – we are what we eat /Clinical Infectious diseases. – 2009. – 49(2). – P.202–204.

39. European Food Safety Authority. Report of the Task Force of Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. EFSA Journal. – 2008. – 141/ - P. 1 – 44 (<http://efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/141r.pdf>)

40. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009 [Electronic resource]// Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). – 2010. – 208 p.

41. Hara-Kudo Y., Konishi N., Ohtsuka K. Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: a collaborative study. Int. J. Food Microbiol. – 2008. – Vol. 122(1-2). – P. 156 – 161.

42. Mevius M. Monitoring of antimicrobial resistance and antimicrobial usage in animals in the Netherlands in 2008. Lelystad, Veterinary Antibiotic Usage and Resistance Working Group, 2010. Retrieved from <http://www.cvi.wur.nl/NR/rdonlyres/DDA15856-1179-4CAB-BAC628C4728ACA03/>

43. McEwen S.A. and Fedorka-Cray P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. Clin Infect Dis. – 2002. – P. 34.

44. Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals 1 (Question

No EFSA-Q-2007-131) Adopted by the Task Force on 11-12 March 2008 The EFSA Journal, 2008. – №141. – 1–44.

45. Van Boeckel T.P. Global trends in antimicrobial use in food animals // T.P.Van Boeckel, C.Brower, M. Gilbert, B.T.Grenfell, S.A.Levin, T. P. Robinson, A.Teillant, R. Laxminarayan/ Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – №112(18). – P. 5649–5654.

46. Shao-Hung W. *Escherichia coli* contamination of pork carcasses in UK slaughterhouses. PhD thesis, University of Nottingham. – 2013. – P. 125.

47. Critically important antimicrobials for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use: report of the second WHO, Copenhagen, [Expert Meeting], (29 – 31 May 2007), ISBN 978 92 4 159574 2.

48. Zhao J. Prevalence and dissemination of oqxAB in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment // J. Zhao, Z. Chen, S. Chen, Y. Deng, Y.Liu, W.Tian, X. Huang, C. Wu, Y. Sun, Y. Sun, Z.Zen, J.H. Liu // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – 54. – P. 4219–4224.

49. Valerie M. Bohaychuk. Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada /Valerie M. Bohaychuk, Gary E. Gensler, Pablo R. Barrios. // Can Vet J. – 2011. – Vol. 52(10). – P. 1095–1100.

50. Броварской В. Д. Украина наращивает экспорт меда : СМІ [Електронний ресурс]. // В. Д. Броварской / Ураїнський бізнес ресурс, 2010г. – Режим доступу : до статті <http://korrespondent.net>

51. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів/ Методичні вказівки № 9.9.5 - 143 – 2007 /Міністерство охорони здоров'я України, Державна санітарно-епідеміологічна служба, Київ. – 2007. 10с

52. Методика визначення та оцінка чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів (заснована на рекомендаціях EUCAST - Європейського комітету з визначення чутливості до антимікробних препаратів), 2016.

53. Дьяченко А. Г. Походження та поширення антибіотикорезистентності // А. Г. Дьяченко /Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції і пленуму Асоціації інфекціоністів Сумщини «Антибіотикорезистентність та шляхи її подолання»:., 30-31 травня 2012 р., м. Суми.- с. 7 – 9.

54. Каганець О.О. Вдосконалення ветеринарно-санітарного контролю бджолиного меду шляхом запровадження системного дослідження мікробіологічних ризиків // О.О. Каганець, В. В. Касянчук /111 міжнар. Наук.практконф. «Аграрний форум – 2010» .-Суми .- Вісник СНАУ.- вип. 3(26).-2010. С.65-70

55. Негай І. В. Мікроелементний склад меду Одеської області як показник його якості та географічного походження //І.В. Негай, В.В. Касянчук/ Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького, 2017, т 19, № 82 – с 148 – 153.
56. Пономарьов А. Контроль якості меду в світовому бджолярстві / А. Пономарьов // Бджолярство : Науково-виробничий журнал. – 2006. – №7. – С. 60–63.
57. Хабай М. Бджоли рахують економіку / М. Хабай // Економічний вісник. – 2011. – № 10. – С. 6 – 7. Інтернетт ресурс :<http://medbe.ru/news/pitanie-i-diety/pchelinyu-med-istochnik-novykh-antibiotikov/>
58. Allen K. L. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys // K.L. Allen, P.C. Molan, G.M.Reid / Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1991. – 43. –P. 817 – 822.
59. Al-Waili N. Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. // N. Al-Waili, A. AlGhamdi, M.J. Ansari, Y. Al-Attar, A. Osman, K. Salom / Archives of Medical Research. – 2013. – 44. – P. 307 – 316. doi: 10.1016/j.arcmed.2013.04.009.
60. Biglari B. Multicentre prospective observational study on professional wound care using honey (Medihoney™). // B. Biglari, A. Moghaddam, K. Santos, et al. / Int Wound J., 2013. - № 10(3). P. 252 – 259. doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.00970
61. Cooper R. Using honey to inhibit wound pathogens // R.Cooper /. Nursing Times, 2008. – №104(46). P. 48 – 49.
62. Cooper R.A. Absence of bacterial resistance to medical-grade manuka honey // R. A. Cooper, L. Jenkins, A.F. Henriques, R.S. Duggan, N.F. Burton. /European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2010. – №29. P.1237 – 1241. doi: 10.1007/s10096-010-0992-1.
63. Chirife J. The correlation between water activity and moisture in honey: fundamental aspects and application to Argentine honeys // J.Chirife, M. C. Zamora, A. Motto /Journal of Food Engineering, 2006. – Vol. 72 (3). – Н. 287–292/ doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.12.009
64. Kwakman P.H. How honey kills bacteria // P.H. Kwakman, A.A. teVelde, L. deBoer, D. Speijer, C.M. Vandenbroucke-Grauls, S.A. Zaat / FASEB Journal, 2010. – №24. – P. 2576 – 2582 doi: 10.1096/fj.09-150789.
65. Kwakman P.H. Antibacterial component sofhoneys // P.H. Kwakman, S.A. Zaat / IUBMB Life, 2012. – №64. – 48 – 55 doi: 10.1002/iub.578.
66. Lu J. Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by Staphylococcus aureus strains with different biofilm-forming abilities // J. Lu, L. Turnbull, C.M. Burke, M. Liu, D.A. Carter, R.C. Schlothauer, C.B. Whitchurch, E.J.Harry / Peer J., 2014. – №2. – P. 326. doi: 10.7717/peerj.326