

УДК 579.62: 579.63

КАСЯНЧУК В.В., д-р вет. наук, професор,

e-mail: v.kasyanchuk@med.sumdu.edu.ua

БЕРГІЛЕВИЧ О.М., д-р вет. наук, професор,

e-mail: o.bergylevych@med.sumdu.edu.ua

Сумський державний університет, м. Суми

ЛОЦКІН І.М., аспірант, e-mail: vetsancontrol2@ukr.net

Сумський національний аграрний університет, м. Суми

ДЕРЯБІН О.М. завідувач відділу, e-mail: don.lmb@gmail.com

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

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

S. aureus є одним із найважливіших мікроорганізмів, який необхідно контролювати у процесі виробництва сирого молока, тому що він може викликати небезпечні захворювання в людей. Особливу небезпеку для здоров'я людей представляють антибіотикорезистентні види *S. aureus*, такі як MRSA. Метою даного дослідження було визначити MRSA в сирому молоці корів шляхом виявлення гену *tesA* за допомогою ПЛР. Було досліджено 36 проб молока з молочних ферм Сумської області, серед яких виявлено 12 коагулазопозитивних ізолятів *S. aureus* (33,3%). Ці ізоляти були досліджені на чутливість до 10 антибіотиків: пеніцилін, амоксицилін, оксацилін, цефазолін, гентаміцин, тетрациклін, ванкоміцин, лінкомицин, еритроміцин, рифампіцин. Бактеріологічними дослідженнями встановлено, що 3 ізоляти із 12 були віднесено до MRSA (25%), які перевірили на наявність *tesA*-гену в ПЛР з праймерами *MecA147-F* та *MecA147-R*. Для цих 3 ізолятів підтверджена наявність *tesA*-гену. Присутність MRSA в сирому молоці корів спричиняє потенційний ризик в харчовому ланцюгу. Вдосконалення гігієнічних та санітарних практик на молочних фермах може зменшити ризик від MRSA в молоці та довіллі молочних ферм.

Ключові слова: антибіотикорезистентність, молоко корів, *S. aureus*, MRSA, ПЛР, *tesA*-ген.

Вступ. 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 комменсалами 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].

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 цефалоспорицини 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 резистентність до дії антибіотиків. До цього переліку входить і MRSA [2, 3, 6, 9]. Згідно з науковою літературою, MRSA, в першу чергу, ідентифікується за наявністю 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 *mecA* [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 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 *MecA147-F* 5'-GTGAAGATATACCAAGTGATT-3' і *MecA147-R* 5'-ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT-3' [18], які фланкують фрагмент гена *mecA*, та нуклеотид-трифосфати (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 нашарували зверху по 0,015 см³ розплавленого воску. Після застигання воску в пробірку 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 та їх обговорення. 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 – 2.

Таблиця 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 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.2)

Таблиця 2

Результати досліджень MRSA ізолятів на антибіотикочутливість

Досліджувані антибіотики	Зони затримки росту, мм,		
	Нормативні значення	Мінімальні значення	Максимальні значення
1	2	3	4
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 мкг≤15; Оксацилін, ОХ¹-1 мкг ≤10; Цефазолін, CZ³⁰ -30 мкг≤15; Гентаміцин, GEN¹⁰ -10 мкг≤12; Ванкоміцин, VA³⁰-30 мкг ≤12; Тетрациклін, ТЕ³⁰-30 мкг≤14; Лінкомицин L¹⁵- 15 мкг≤17; Еритроміцин E¹⁵-15 мкг≤17; Рифампіцин, РИФ¹⁵-15 мкг≤16.

Порівняльним аналізом нормативних значень зон затримки росту досліджуваних ізолятів із даними наших досліджень ми визначали рівні чутливості до антибіотиків. Як свідчать дані таблиці 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).

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 *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.

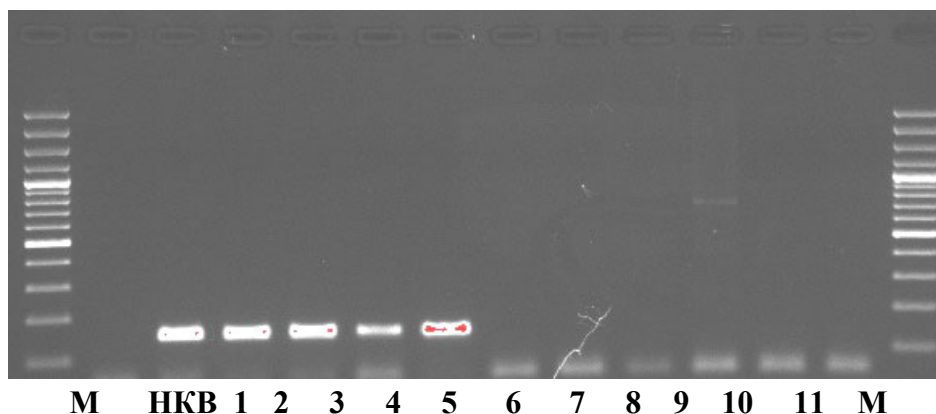


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз в 1,5% гелі агарози продуктів ампліфікації гену *mecA*. Варіанти: НКВ-негативний контроль виділення; М - маркер розміру фрагментів ДНК "100 bp Plus DNA Ladder" (Thermo Fisher Scientific); 1,2,3-ізоляти *St. aureus* (БРХ); 4,5-ізоляти *St. aureus* (*mecA*+) (людина); 6-8-ізоляти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

Висновки та перспективи подальших досліджень

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 *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. 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.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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: Горки.- БГСХА.-2017.- сб. науч. трудов. – Вып. 20. – Ч. 2 – С. 303 – 310.
2. 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.
3. 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.
4. 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
5. 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.
6. 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.
7. Antibiotic/Antimicrobial Resistance Threat Report Centers for Disease Control and Prevention, 2013 www.cdc.gov <http://www.cdc.gov/drugresistance/>
8. 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/>
9. 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.
11. Davies J., Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance/ Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010. – Vol.74 (3). – P. 417 – 33. <http://mbr.asm.org/content/74/3/417/>
12. 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>
13. 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.
14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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/>

18. 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.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТИ К МЕТИЦИЛИНУ В ИЗОЛЯТАХ S. AUREUS, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОКА КОРОВ / Касянчук В.В, Бергилевич А.Н., Лощкин И.Н., Дерябин О.Н.

S. aureus является одним из важнейших микроорганизмов, который необходимо контролировать в процессе производства сырого молока, так как он может вызвать опасные заболевания у людей. Особую опасность для здоровья людей представляют антибиотикорезистентные виды *S. aureus*, такие как MRSA. Целью данного исследования было определить MRSA в сыром молоке коров путем выявления гена *mecA* с помощью ПЦР. Было исследовано 36 проб молока из молочных ферм Сумской области, среди которых выявлено 12 коагулазоположительные изолятов *S. aureus* (33,3%). Эти изоляты были исследованы на чувствительность к 10 антибиотикам: пенициллин, амоксициллин, оксациллин, цефазолин, гентамицин, тетрациклин, ванкомицин, линкомицин, эритромицин, рифампицин. Бактериологическими исследованиями установлено, что 3 изоляты из 12 были отнесены к MRSA (25%), которые проверили на наличие *mecA*-гена в ПЦР с праймерами *MecA147-F* и *MecA147-R*. Для этих 3 изолятов подтверждено наличие *mecA*-гена. Присутствие MRSA в сыром молоке коров вызывает потенциальный риск в пищевой цепи. Совершенствование гигиенических и санитарных практик на молочных фермах может уменьшить риск от MRSA в молоке и окружающей среде молочных ферм.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, молоко коров, *S. aureus*, MRSA, ПЦР, *mecA*-ген.

DETERMINATION OF THE RESISTANCE GENE TO METIZYLIN IN ISOLATES S. AUREUS, COLLECTED FROM MILK OF COWS / Kasyanchuk V., Berhylevych O., Lotskin I., Deriabin O.

Introduction. *S. aureus* is one of the most important microorganisms that must be controlled in the production of raw milk because it can cause dangerous diseases in humans. Antibiotic resistant *S. aureus* - MRSA is a particular danger to human health. It is believed that the main source of MRSA is the agrarian sector, therefore it is important to continuously monitor these bacteria in products and the environment of livestock farms, including milk for preventive measures. Among the existing methods for determining MRSA, PCR is considered to be the most effective method for identifying specific antibiotic resistance genes.

The aim of the present study was to determine MRSA in raw milk of cows by detecting the *mecA* gene by PCR method..

Materials and methods. The studies were conducted during 2016-2017. 36 samples of raw milk from farms of the Sumy region were investigated. Classical bacteriological methods were used to identify bacteria *S. aureus*. Coagulase-positive isolates of *S. aureus* were tested for susceptibility to 10 antibiotics: penicillin, amoxicillin, oxacillin, cefazolin, gentamicin, tetracycline, vancomycin, lincomycin, erythromycin, rifampicin. A DNA-sorbent kit (Ukraine) was used to extract DNA. The reaction was carried out on a thermocycler "T1" (Biometra, Germany). A reaction mixture was prepared with the physical separation of PCR components. To prepare the "lower" reaction mixture, the primers *MecA147-F* 5'-GTGAAGATATACCAAGTGATT-3' and

MecA147-R5'-ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT-3 were mixed. Thermoprofile of the reaction: 95 ° C for 4 min (1 cycle), followed by 35 cycles of 95 ° C, 30 s, 50 ° C for 30 seconds, 72 ° C for 30 seconds, 72 ° C for 7 minutes (1 cycle). Analysis of the amplification products was carried out in 1.5% agarose gel, and the determination of the DNA by the Gel DocXR Plus system (BioRad Laboratories, USA).

Results of research and discussion. 12 coagulase-positive isolates *S. aureus* (33.3%) were identified by bacteriological method. Three isolates from 12 were assigned to MRSA (25%). The bacteriological method using antibiotic disks revealed that MRSA isolates identified were highly resistant to six antibiotics: penicillin, amoxicillin, oxacillincephazolin, tetracycline, erythromycin from 10 subjects, and these isolates were sensitive to gentamicin, vancomycin, lincomycin, rifampicin. Three isolates, that have been selected from microbiological studies as potential MRSA have been tested for the presence of the *mecA* gene in the PCR with the *MecA147-F* and *MecA147-R* primers. For comparison, isolated isolates from other types of animals and humans were investigated. The PCR method confirmed the presence of the *mecA* gene in the three *S. aureus* isolates isolated from milk samples, as well as in 19.4% of cases, the presence of this gene in other *S. aureus* isolates was confirmed from humans and isolated *S. aureus* isolates from pigs, cattle and fish. This confirms the possibility of interspecific cross-contamination of MRSA

Conclusion and prospects for further research. The information obtained during this study is useful for understanding the prevalence of *S. aureus* and its antibiotic sensitivity in dairy farms and may be useful for local and national monitoring and for developing specific programs for monitoring MRSA isolates in the milk production chain. In addition, the study of antibiotic resistance among isolates of *S. aureus* in each farm is very important, especially for the successful treatment of staphylococcal animal infections in order to prevent cross-contamination by foodstuffs. The prospect of further research is the study of the spread of MRSA in the food chain livestock production and the improvement of hygienic and sanitary practices in the agrarian sector.

Key words: antibiotic resistance, milk of cows, *S. aureus*, MRSA, PCR, *mecA* gene.

REFERENCES

1. Bergilevych A. N., Lockyn Y. N., Shubyn P. A. et al. (2017). Analiz antybyotykorezystentnosti Staphylococcus spp., vydelennyh iz ob'ektov molochnyh ferm [Analysis of antibiotic resistance of Staphylococcus spp., isolated from dairy farms]. *Aktual'nye problemy intensyvnogo razvytyja zhyvotnovodstva – Aktual problems of intensive development of cattle breeding*, Vol. 20, 2b, 303-310 [in Russian]
2. Garkavenko T.O., Bergilevych O.M. (2017). Vyvchennja antybiotykykorezystentnosti osnovnyh zbudnykiv bakterial'nyh zahvorjuvan' tvaryn ta ptyci do β -laktamiv v Ukraïni [Study of antibiotic resistance of the main pathogens of bacterial diseases of animal and poultry to β -lactams in Ukraine]. *Bjuletën' «Veterynarna biotekhnologija» – Bulletin «Veterinary biotechnology»*, Vol. 31, 33 – 45 [in Ukraine]
3. D'jachenko A. G., Maginga Baraka Musa (2012). Chutlyvist' stafilokokovyh bioplivok do riznyh kombinacij antybiotykykiv [Sensitivity of staphylococcal biofilms to various combinations of antibiotics]. *Proceedings from Antibiotic Resistance and the Ways to Overcome it '12: Vseukrai'ns'koi' naukovo-praktychnoi' konferenciya plenumu Asociaçii' infekcionistiv Sumshhyny (30-31 travnja 2012) – Antybiotykykorezistentnist' ta shljahy i'i' podolannja.* (pp. 9-11) m. Sumy. [in Ukraine]
4. Vyznachennja chutlyvosti mikroorganizmiv do antybakterial'nyh preparativ/ Metodychni vkazivky № 9.9.5 - 143 - 2007/Ministerstvo ohorony zdorov'ja Ukraïny, Derzhavna sanitarno-epidemiologichna sluzhba, Kyïv. – 2007. 10s [in Ukraine]
5. Kasjançuk V.V., Bergilevych O.M., Skljær O.I., Lockin I.M. (2016). Vyvchennja chutlyvosti do antybiotykykiv izoljativ Staphylococcus spp., vydilennyh z ob'ektiv dovkillja molochnyh ferm Sums'koi' oblasti [Studying the sensitivity of antibiotics to isolates of Staphylococcus spp., isolated from environmental facilities of dairy farms of the Sumy region]. *Zbirnyk naukovykh prac' HZDVA. – Collection of scientific works of HZDVA* 249-255. [in Ukraine]
6. Antibiotic/Antimicrobial Resistance Threat Report 2013, Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved from: www.cdc.gov <http://www.cdc.gov/drugresistance> [in English]

7. Berhilevych O. M., Kasianchuk V. V., Kukhtyn M. D., Lotskin I. M., Garkavenko T. O., Shubin P. A. (2017) Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(4), 559 – 563 [in English].
8. Beth A. Hanselman, Steven A. Kruth, Joyce Rousseau, J. Scott Weese (2009). Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *J. Scott Weese.-Can Vet J.* 2009 Sep; 50(9): 954 – 958. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2726022/> [in English]
9. Chamber, H.F., & DeLeo, F.R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871281/> [in English]
10. Dalia A. Hamza, Sohad M. Dorgham, Amany Arafa (2015). Coagulase Gene Typing with Emphasis on Methicillin-Resistance Staphylococci: Emergence to Public Health. *Advances in Infectious Diseases*. 1.05, 04, Article ID:62214,8 pages 10.4236/aid.2015.54025 [in English]
11. Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*. Retrieved from <http://mmbr.asm.org/content/74/3/417/> [in English]
12. FDA Regulation to Help Ensure Judicious Use of Antibiotics in Food-Producing Animals” U.S. Food and Drug Administration, www.fda.gov 2 Jun. 2015 Retrieved from <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm448620.htm> [in English]
13. Matsunaga T, Kamata S, Kakiichi N, Uchida K. (1993). Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J Vet Med Sci.*, 55, 297–300 [in English]
14. Larsen HD, Sloth KH, Elsberg C. et al. (2000). The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in nine Danish dairy herds. *Vet Microbiol.*, 71, 89–101. [in English]
15. Petinaki E, Miriagou V, Hatzi F, Kontos F, Maniati M, Maniatis AN. (2001). Bacterial resistance study group. Survey of methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus aureus* in the hospitals of central Greece. *Int J Antimicrob Agents.*, 18, 563–566. [in English]
16. Waage S, Bjorland J, Caugant DA. et al. (2002). Spread of *Staphylococcus aureus* resistant to penicillin and tetracycline within and between dairy herds. *Epidemiol Infect.*, 129. 193–202 [in English]
17. “WHO multi-country survey reveals widespread public misunderstanding about antibiotic resistance” The World Health Organization, www.who.int 16 Nov. 2015 Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/antibiotic-resistance/en/> [in English]
18. Zhang K, McClure J.A., Elsayed S., Louie T., Conly J.M. (2005). 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.*, 43(10), 5026-33 [in English].