

УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ И СПОСОБНОСТЬ К ОБРАЗОВАНИЮ БИОПЛЕНОК ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ МОЛОКА КОРОВ КОСТАНАЙСКОЙ ОБЛАСТИ РК

Р.М. Рыщанова, кандидат ветеринарных наук, асс. профессор
А.М. Мендыбаева, докторант специальности «Ветеринарная санитария»
Г.Б. Муканов, магистрант специальности «Ветеринарная медицина»
П.В. Шевченко, магистр технических наук
Ж.Ж. Бермухаметов, магистр технических наук

Костанайский региональный университет им. А. Байтурсынова
E-mail: raushan5888@mail.ru

Ключевые слова: золотистый стафилококк, маститы, молоко коров, резистентность к антибиотикам.

Реферат. Цель работы заключается в изучении распространенности штаммов *Staphylococcus aureus*, резистентных к противомикробным препаратам, выделенных от коров с субклинической формой мастита в хозяйствах Костанайской области, и способности их к биопленкообразованию. Полученные данные позволяют судить о степени и масштабах антибиотикорезистентности *Staphylococcus aureus*, вызывающих инвазивные инфекции на локальном и региональном уровнях, что, в свою очередь, необходимо для эпидемиологического надзора и успешного лечения животных. Нами впервые в Северном регионе Казахстана изучен спектр антибиотикорезистентности штаммов *S. aureus*, ассоциированных с субклиническими формами маститов у высокопродуктивных молочных коров и исследована способность микроорганизмов к образованию биопленок.

В роде стафилококк на сегодня известно 27 видов, большинство из которых абсолютно безвредны, и только три способны вызывать болезни: золотистый стафилококк – самый распространенный и вредоносный; эпидермальный стафилококк, также патогенный, но гораздо менее опасный, чем золотистый, и сапрофитный стафилококк – практически безвредный, тем не менее также способный вызывать заболевания. Золотистый стафилококк обладает удивительной живучестью: не теряет активности при высушивании, 12 ч живет под воздействием прямых солнечных лучей, в течение 30 мин выдерживает температуру 80 °С, не погибает в чистом этиловом спирте, не боится перекиси водорода.

Золотистый стафилококк *Staphylococcus aureus* является одним из наиболее распространенных бактериальных патогенов во всем мире [1] и вызывает достаточно широкий диапазон различных заболеваний у животных – от простых форм абсцессов и мастита до острого синдрома токсического шока [2, 3].

Маститы коров являются серьезной проблемой для молочного производства во всем мире. Золотистый стафилококк сегодня остается одной из главных причин мастита коров. Молоко является отличной средой для роста большого количества микроорганизмов, включая *S. aureus* [4–6]. В 60 % случаев обнаружения патогенной микрофлоры у молочных коров выявляется именно эта бактерия – ее находят в молоке, в молозиве, в дыхательной системе коровы [2–4]. Бактериальное заражение молока обычно происходит в процессе доения, и это зависит от санитарных условий окружающей среды, посуды, используемой для доения, и обслуживающего персонала. Это также может быть результатом попадания микроорганизмов в молочную железу через отверстия сосковых каналов [5, 6]. Маститы также представляют серьезную опасность для здоровья людей в связи с возможным попаданием в молоко патогенных микроорганизмов и их токсинов [7–9].

В неблагополучных хозяйствах заболевание носит стационарный характер. При этом хозяйства несут ощутимый экономический ущерб вследствие недополучения молока, ухудшения его санитарных и технологических качеств, затрат на лекарства и ветеринарных расходов, ранней выбраковки коров и снижения их воспроизводительной функции [10].

Маститы, вызванные *S. aureus*, характеризуются низкой частотой успешного выздоровления по сравнению с другими возбудителями, что объясняется приобретением устойчивости к противомикробным препаратам и их способностью к биопленкообразованию [11–13]. Бактерии в биопленках устойчивы к фагоцитозу, антимикробным агентам и дезинфицирующим средствам из-за низкой диффузии через матрицу, измененного клеточного метаболизма. Защитные особенности биопленки способствуют колонизации эпителия молочной железы, которая предшествует возникновению персистирующей инфекции [14–16].

На сегодняшний день для лечения стафилококковых инфекций, включая мастит, используют противомикробные препараты, где основным действующим веществом являются антибиотики таких фармакологических групп, как β -лактамы, тетрациклины, макролиды и сульфаниламиды. Штаммы *S. aureus* когда-то были почти одинаково восприимчивы к полусинтетическим пенициллиназа-резистентным β -лактамам (например, метициллину, оксациллину), наиболее часто используемому классу антибиотиков для кожных инфекций в медицине. Позднее эти штаммы были названы устойчивыми к метициллину *S. aureus*, или MRSA (термин, означающий перекрестную резистентность ко всем β -лактамам, включая все пенициллины и цефалоспорины) [17, 18].

Бактерии в природных популяциях почти всегда существуют в виде биоплёнок: клетки формируют вокруг себя комфортную среду в виде защитного матрикса, который смягчает окружающие условия, а у патогенов образует барьер для крупных молекул иммунитета [19, 20].

Цель исследований – изучение распространенности резистентных штаммов *S. aureus*, выделенных от клинически здоровых коров в молочных стадах Костанайской области, а также определение способности изолятов *S. aureus* к образованию биопленок.

Объектом исследования были пробы молока ($n=643$), отобранные у коров без клинических признаков патологии молочной железы. Пробы молока отбирали у коров черно-пестрой голштинизированной породы, содержащихся в молочных фермах южного, северного, восточного и западного районов Костанайской области, всего в 15 хозяйствах. В период лактации индивидуально от каждой коровы отбирали пробы молока.

Отбор проб молока от коров с субклинической формой мастита. Субклиническая форма мастита у коров определялась путем измерения электрического сопротивления молока специальным электронным детектором мастита 4x4Q Draminski (Польша) непосредственно в коровнике. Для этого под каждый сосок коровы подставляли измерительные сосуды устройства и быстро сдаивали первые струи молока. В течение 3 с на индикаторе прибора появлялись результаты измерений для каждой четверти вымени. Полученные числовые результаты оценивали по следующим критериям: результаты ниже 250 единиц выразительно указывают на субклиническое воспаление четверти вымени, или высокий риск перехода заболевания в острую стадию; результаты выше 300 единиц – хорошее состояние четверти вымени; результаты от 250 до 300 единиц – переходное состояние между субклиническим маститом и удовлетворительным состоянием. По причине физиологических особенностей трудно определить четкий предел, превышение которого показывает, что четверть вымени больна [21].

Молоко с показателями прибора ниже 300 единиц отбирали в специальные стерильные ёмкости (10 мл) и доставляли в лабораторию.

*Выделение *S. aureus* из проб молока.* Бактериологическое исследование проводили в соответствии с ГОСТ 30347-2016 с небольшими изменениями: проведение первичной микроскопии,

десятикратные серийные разведения и посевы на простые и дифференциально-диагностические питательные среды (маннит-солевой агар). В качестве эталонного штамма использовали *S. aureus* 209-Р. Метод обнаружения *S. aureus* был основан на высеве навески молока в жидкую селективную среду, инкубировании посевов, пересеве культуральной жидкости на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды, подтверждении по биохимическим признакам принадлежности выделенных типичных и/или атипичных колоний к *S. aureus*.

При наличии патогенного стафилококка в пробе через 18-24 ч наблюдается рост колоний желтого цвета с изменением среды с красного на желтый цвет.

Идентификация *S. aureus*. Видовую идентификацию штаммов *S. aureus* проводили по следующим критериям: оценка морфологии и результатов микроскопии колоний, выросших на маннит-солевом агаре, пересев подозрительных колоний на мясо-пептонный агар, проведение тестов на каталазу и коагулазу, определение способности ферментировать мальтозу в аэробных условиях, тест на ДНКазную активность.

Определение способности изолятов *S. aureus* к образованию биопленок. Выделенные изоляты *S. aureus* тестировали на способность к биопленкообразованию методом микропланшета, а также с красителем конго красный.

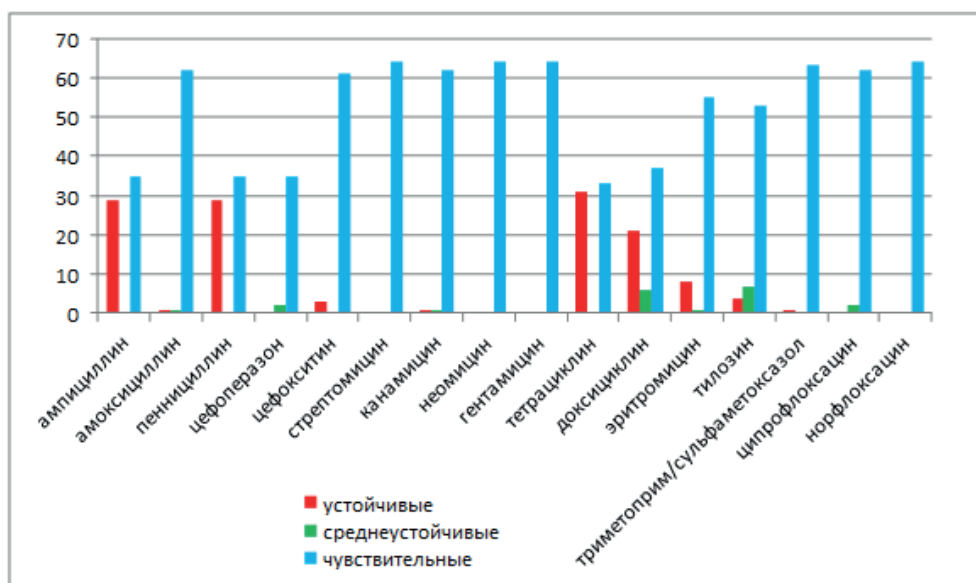
Тестирование изолятов *S. aureus* на резистентность к антибиотикам. Все изоляты были протестированы на антимикробную чувствительность при помощи диско-диффузионного метода на среде Мюллера-Хинтона. Для тестирования использовали диски со следующими антибактериальными препаратами: ампициллин (10 мкг), амоксициллин (25 мкг), бензилпенициллин (10 ЕД), цефоперазон (75 мкг), цефокситин (30 мкг), стрептомицин (10 мкг), канамицин (30 мкг), неомицин (30 мкг), гентамицин (120 мкг), тетрациклин (30 мкг), доксициклин (30 мкг), сульфаметоксазол с триметопримом (1,25/23,75 мкг), эритромицин (15 мкг), тилозин (15 мкг). Чувствительность оценивали по диаметрам зон задержки роста в соответствии с рекомендациями. Затем изоляты *S. aureus* были классифицированы как устойчивые, среднеустойчивые или чувствительные к определенному антибиотику согласно рекомендациям EUCAST (версия 11.0), CLSI и МУК 4.2.1890-04.

Определение генов резистентности. Методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) определяли наличие генов *mecA*, *BlaZ* и *mrsA*, относящихся к антибактериальным препаратам группы бета-лактамов, гена *ermC* группы макролидов, генов *aac(6)-aph2*, *aph(3)* группы аминогликозидов, *tetK*, *tetM* группы тетрациклинов и гена *dfrG* сульфаниламидов. Визуализацию результатов ПЦР проводили в 1,5 %-м агарозном геле в УФ-трансиллюминаторе QUANTUM.

Для исследований в период с декабря 2020 по май 2021 г. в хозяйствах Костанайской области отобрано 643 пробы коровьего молока, из них на стадии субклинического мастита исследовано 278 (43,2 %) образцов, из которых выделено и идентифицировано 64 (23,0 %) культуры *S. aureus*.

Распространенность *S. aureus* обуславливается в первую очередь биологическими особенностями данного микроорганизма. Во внешней среде (пол, подстилка, пастбища, инвентарь) стафилококк относительно устойчив и способен сохранять свою патогенность до 60 и даже 100 суток. При нагревании до 75 °С он погибает за 20-25 мин.

Основным моментом в системе противоэпизоотических мероприятий, направленных на профилактику маститов у коров, является контроль развития антибиотикорезистентности. Известно, что стафилококки среди грамположительных бактерий всегда характеризовались высокой приспособляемостью и способностью к формированию резистентности к новым антибактериальным препаратам. Нами были изучены и протестированы на чувствительность к антибиотикам изолированные культуры *S. aureus*, что позволило отобрать штаммы с идентичными характеристиками. Результаты тестирования резистентности изолятов *S. aureus*, выделенных из молока, к антимикробным препаратам представлены на рисунке.



Тестирование резистентности *S. aureus*, выделенных из молока, к антимикробным препаратам

Из 64 выделенных штаммов 60 (93,7 %) проявляли резистентность к одному и более антимикробным препаратам. У изучаемых микроорганизмов *S. aureus* наблюдается множественная лекарственная устойчивость, так 17 штаммов микроорганизмов были резистентны к 2 группам антимикробных препаратов, 3 штамма – к 3 группам, 2 штамма – к 4 группам. Наибольшее число штаммов *S. aureus* оказались резистентными к препаратам бета-лактамовой группы – ампициллину и пенициллину (45,3 %) и антибиотикам тетрациклинового ряда (48,4 %), наименьшее (3,1 %) – к канамицину (аминогликозиды) и ципрофлоксацину (фторхинолоны), а также к сульфаниламидам (1,6 %).

Наличие антибиотикорезистентности к ампициллину и пенициллину (45,3 %) объясняется тем, что большинство микроорганизмов очень быстро приобретает к ним устойчивость путем выработки бета-лактамаз. Так, в 40-х гг. при внедрении в практику пенициллина было отмечено появление штаммов золотистого стафилококка, устойчивых к пенициллину, а уже к 1948 г. частота выделения пенициллин-резистентных штаммов *S. aureus* среди госпитальных штаммов достигла 60 %. Казалось, в 60-х гг. проблема резистентности стафилококков к антибиотикам была решена, так как этот период характеризовался высокой эффективностью полусинтетических пенициллинов (метициллин, оксациллин, диклоксациллин), однако с появлением резистентности к последним (условно названной термином «метициллин-резистентность стафилококков») начался новый подъем стафилококковых инфекций во всем мире [5].

Преобладающее число резистентных штаммов к тетрациклину, вероятно, связано с широким применением данного препарата для лечения и профилактики многих инфекционных болезней. Следует отметить наличие у микроорганизмов 100 %-й чувствительности к следующим препаратам: стрептомицину, неомицину, гентамицину и норфлоксацину. Полученные данные дают возможность рекомендовать специалистам хозяйств в тяжелых случаях течения болезни включать в схему лечения животных указанные антибиотики, за исключением норфлоксацина, относящегося к группе фторхинолонов – критически важных антибиотиков для медицины человека.

Определение генов резистентности. Методом полимеразно-цепной реакции были выделены гены резистентности к бета-лактамам (BlaZ, mecA), макролидам (ermC), аминогликозидам (aph(3)), тетрациклинам (tetK, tetM) (табл. 1).

Результаты исследований показали, что 46,9 % (30/64) образцов ДНК *S. aureus* несли ген *BlaZ*, из них 83,3 % (25/30) были резистентны к пенициллину, а 16,7 % (5/30) – чувствительны. Ген *mecA* обнаружен в одном образце ДНК, устойчивом к бета-лактамам (ампициллин). Также обнаружен ген *ermC* – 23,4 % (15/64), кодирующий резистентность к макролидам.

Таблица 1

Гены антибиотикорезистентности

Группы антибактериальных препаратов	Ген	Количество	Ген	Количество
Бета-лактамы	<i>BlaZ</i>	30	<i>mecA</i>	1
Макролиды	<i>ermC</i>	15	<i>msrA</i>	0
Аминогликозиды	<i>aac(6)-aph2</i>	0	<i>aph(3)</i>	2
Тетрациклины	<i>tetK</i>	19	<i>tetM</i>	9
Сульфаниламиды	<i>dfrG</i>	0		

Следует отметить, что только 2 образца ДНК (2/15) имели фенотипическую резистентность к тестируемым препаратам группы макролидов (эритромицин, тилозин). Оба образца ДНК, несущие гены резистентности к аминогликозидам – *aph(3)*, были чувствительны к препаратам данной группы. Среди тестируемых образцов ДНК *S. aureus* 19 несли ген *tetK* и 9 – ген *tetM*, все были фенотипически устойчивы к препаратам группы тетрациклинов.

Тестирование на наличие генов резистентности к антимикробным препаратам показало, что 60,9 % (39/64) изолятов несут от одного до пяти генов устойчивости. Так, в 46,9 % исследованных образцов ДНК обнаружен ген *BlaZ*, кодирующий фермент β-лактомазу, инактивирующий антибиотик за счет гидролиза пептидной связи в кольце бета-лактама. Поскольку не все фенотипически устойчивые к пенициллину изоляты имели ген *BlaZ*, но обладали способностью к биопленкообразованию, можно предположить, что в этом случае сработал данный механизм резистентности [22].

В настоящем исследовании обнаружен один изолят, несущий ген *mecA*, определяющий устойчивость к метициллину и кодирующий низкоаффинный пенициллин-связывающий белок РВР. Так, в аналогичных исследованиях, проведенных нами в 2018-2019 гг., не было зарегистрировано ни одного случая MRSA [24]. Однако исследователи нескольких стран сообщают об уровнях MRSA, варьирующих от 0,7 до 90 % [23].

Генотипическая резистентность к макролидам проявлялась выделением в исследуемых изолятах гена *ermC* (23,4 %). Полученные данные в некоторой степени похожи на результаты, представленные М.Е. Srednik с соавторами [24]. Так как 13 из 15 образцов, несущих ген *ermC*, были чувствительны к препаратам группы макролидов (эритромицин, тилозин), то можно предположить, что у них отсутствовала экспрессия метилаз, кодируемых геном *ermC* [25].

В двух образцах ДНК стафилококков обнаружен ген *aph(3)*, ответственный за устойчивость к аминогликозидам за счет высвобождения фермента аминогликозид фосфотрансферазы. Кроме того, данные изоляты были мультирезистентными, помимо гена *aph(3)*, один изолят нес гены резистентности к макролидам (*ermC*), бета-лактамам (*BlaZ*), а второй изолят еще дополнительно гены к тетрациклинам (*tetK*, *tetM*) [26].

Данные, полученные по результатам исследования, о наличии генов резистентности к антибактериальным препаратам группы тетрациклинов совпадают с фенотипическими исследованиями. Ген *tetK* был обнаружен в 19 образцах ДНК, ген *tetM* – в 9. В настоящем исследовании ген *tetK* обнаружен в 29,7 % образцов, а *tetM* – в 14 %, тогда как, по данным [27], их частота составляет 22,73 и 2,27 % соответственно. Относительно высокая распространенность генов *tetK* и *tetM* указывает на наличие следующих механизмов резистентности в исследуемых стафилококках: насос для оттока тетрациклина и защитный белок рибосом [28].

Тестирование способности *S. aureus* к биопленкообразованию. Проблема лечения маститов коров, вызванных антибиотико-резистентными штаммами *S. aureus*, отягчается их способностью к биопленкообразованию, которое признано важным фактором вирулентности для бактерий рода *Staphylococcus* и серьезной клинической проблемой [34].

Определение способности к образованию биопленок методом окраски на микротитровальных планшетах является золотым стандартом фенотипического анализа биопленок. В нашем исследовании 76,6 % (49/64) изолятов *S. aureus* обладали способностью к образованию биопленок, полученные результаты согласуются с рядом исследований, проведенных в Иране [29], Польше [30] и США (штат Колумбия) [31] (табл. 2). Среди биопленкообразующих штаммов 69,4 % (34/49) были устойчивы как минимум к одному противомикробному препарату.

Таблица 2

Формирование биопленок у изолятов *S. aureus*

Способность к образованию биопленок	Количество изолятов, образующих биопленку	
	ед.	%
Отсутствует	15	23,44
Низкая	18	28,12
Умеренная	31	48,44
Высокая	0	0
Всего	64	100

Наибольшую резистентность биопленкообразующие штаммы проявляли к тетрациклину – 26/49, ампициллину – 22/49, пенициллину – 22/49, доксициклину – 21/49. Большинство изолятов (48,4 %) были классифицированы как умеренные продуценты. Хотя ни один из исследуемых изолятов не был отнесен к сильным продуцентам, следует отметить потенциальный риск для здоровья населения, к тому же, по некоторым данным, биопленки увеличивают вероятность передачи генов антибиотикорезистентности [32, 33].

Кроме того, 43,75 % исследованных образцов были одновременно резистентными к одному и более антибактериальным препаратам, обладали способностью к биопленкообразованию и несли ген резистентности, что повышает вероятность распространения форм *S. aureus* с множественной лекарственной устойчивостью. При этом 12,5 % изолятов были резистентны и формировали биопленки, а 4,7 % имели ген резистентности и образовывали биопленки, и только 10,9 % не формировали биопленки, но были устойчивыми и несли гены резистентности к антибактериальным препаратам.

Таким образом, анализ антибиотикорезистентности золотистого стафилококка, выделенного при исследовании проб молока от коров с субклинической формой мастита из хозяйств Костанайской области за период 2020-2021 гг., и определение способности бактерий к биопленкообразованию позволяют сделать следующие выводы.

1. Из 278 образцов коровьего молока, отобранных на стадии субклинического мастита, выделено и идентифицировано 64 штамма золотистого стафилококка.

2. Тестирование на антибиотикоустойчивость показало, что 60 (93,7 %) изолятов *S. aureus*, проявляли резистентность к одному и более антимикробным препаратам групп тетрациклинов и бета-лактамов, используемых для лечения мастита. При этом наблюдается множественная лекарственная устойчивость. Изоляты *S. aureus* несут несколько генов резистентности, большинство из которых кодируют устойчивость к бета-лактамам и тетрациклинам.

3. Наличие способности образовывать биопленки повышает вероятность распространения полирезистентных штаммов.

4. Поскольку проблема мастита на молочных фермах актуальна для нашей страны и, в частности, для нашего региона, необходимы дальнейшие всесторонние исследования, направленные на изучение и поиск путей решения.

Научные исследования выполнены в рамках проекта AP008956574 «Антибиотикорезистентность штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из коровьего молока» грантового финансирования Министерства образования и науки Республики Казахстан на 2020-2021 гг.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Mahon C.R., Larsen H.S. *Staphylococcus aureus* // Textbook of diagnostic microbiology / Mahon C.R., Manusesailis J.Jr., ed. – New York: WB Saunders Company, 1995. – P. 325–330.
2. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated in acute, acute and chronic mastitis of cattle / T. Matsunaga, S. Kamata, N. Kakiichi, K. Uchida // J. Vet. Med. Sci. – 1993. – Vol. 55. – P. 297–300. – DOI: 10.1292/jvms.55.297.
3. Dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in nine Danish dairy herds / H.D. Larsen, K.H. Sloth, C. Elsberg [et al.] // Vet Microbiol. – 2000. – Vol. 71. – P. 89–101. – DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00161-3.
4. Onasanya A., Mignouna H.D., Thottappilly G. Genetic fingerprinting and phylogenetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates from Nigeria // Afr. J. Biotech. – 2003. – Vol. 2(8). – P. 246–250.
5. Kalsoom F, Syed N.H.S., Farzana J. A model of antibiotic resistance against various *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk samples // J. Res. Sci. – 2004. – Vol. 15. – P. 145–151.
6. Видовой состав микрофлоры молочной железы при маститах / Д.Ш. Баймишева, Л.А. Коростелева, С.В. Кристойть, С.В. Котенкин // Зоотехния. – 2008. – № 11 – С. 26–28.
7. Occurrence of *Staphylococcus aureus* on farms with small scale production of raw milk cheeses in Poland / J.G. Rola, A. Czubkowska, W. Korpysa-Dzirba, J. Osek // Toxins. – 2016. – Vol. 8(3). – P. 62. – DOI: 10.3390/toxins8030062.
8. Hennekinne J.A., de Buyser M.L., Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation // FEMS Microbiol. Rev. – 2012. – Vol. 36. – P. 815–836. – DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x.
9. Rola J.G., Korpysa-Dzirba W., Osek J. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins at different stages of production of raw milk cheeses – preliminary results // Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. – 2013. – Vol. 57. – P. 341–345. – DOI: 10.2478/bvip2013-0059.
10. Антибиотикорезистентность штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из молока высокопродуктивных коров / О.А. Артемьева, Д.А. Никанова, Е.Н. Котковская, Е.А. Гладырь, А.В. Доцев // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51, № 6. – С. 867–874.
11. Aslantaş Ö., Demir C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases // J. of Dairy Science. – 2016. – Vol. 99, Is. 11. – P. 8607–8613. – <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11310>.
12. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk samples of dairy cows in small holder farms of North-Western Ethiopia / S.A. Mekonnen, T. Lam, J. Hoekstra [et al.] // BMC Veterinary Research. – 2018. – Aug. – T. 14. – P. 8. – <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9442>.
13. Тимаков А.В., Тимакова Т.К., Шмаров А.Т. Маститы стафилококковой этиологии и пищевая безопасность молока и молочных продуктов // Вестник АПК Верхневолжья. – 2015. – № 4(32). – С. 56–59.
14. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes / E. Thiran, P.A. Di Ciccio, H.U. Graber [et al.] // J. of Dairy Science. – 2018. – Vol. 101, Is. 2. – P. 1000–1012. – <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13696>.

- 15 Oniciuc E.-A., Cerca N., Nicolau A.I. Compositional Analysis of Biofilms Formed by *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Sources // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 390. – DOI:10.3389/fmicb.2016.00390.
16. *Biofilm* formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity / P.Di Ciccio, A. Vergara, A.R. Festino [et al.] // *Food Control*. – 2015. – Vol. 50. – P. 930–936. – <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.048>.
17. Дака Д., Силассе С.Г., Йухдего Д. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa region, southern Ethiopia // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2012. – DOI: 10.1186 / 1476-0711-11-26.
18. *Enterotoxin* gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy / D.M. Bianchi, S. Gallina, A. Bellio [et al.] // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2014. – Vol. 58. – P. 190–196. – DOI: 10.1111/lam.12182.
19. Lewis K. Persister Cells // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2010. – Vol. 64. – P. 357–372.
20. *Active* Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria / D. Nguyen, A. Joshi-Datar, F. Lepine [et al.] // *Science*. – 2011. – Vol. 334. – P. 982–986.
21. Электронный детектор субклинических состояний мастита у коров: руководство по эксплуатации. – Olsztyn, Poland. – 15 с.
22. *Prevalence* of *blaz* gene and other virulence genes in penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Gansu, China / Feng Yang, Qi Wang, Xurong Wang [et al.] // *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* – 2015. – Vol. 39. – P. 634–636. – DOI:10.3906/vet-1504-81.
23. *Identification* of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Bulk Tank Milk / E. Keyvan, O. Yurdakul, A. Demirtas [et al.] // *Food Sci. Technol.* – 2020. – Vol. 40(1). – <https://doi.org/10.1590/fst.35818>.
24. *Characterisation* of *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitis bovine milk in Argentina / M.E. Srednik, V. Usongo, S. Lépine [et al.] // *Journal of Dairy Research*. – 2018. – Vol. 85. – P. 57–63. – DOI:10.1017/S0022029917000851.
25. *Molecular* types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China / Jian Gao, Miro Ferreri, Fuqing Yu [et al.] // *The Veterinary Journal*. – 2012. – Vol. 192, Is. 3. – P. 550–552. – <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.08.030>.
26. *Antimicrobial* Usage and Detection of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* / I.A. Omwenga, G.O. Mitema, E.S., Obiero [et al.] // Including Methicillin-Resistant Strains in Raw Milk of Livestock from Northern Kenya. *Microbial Drug Resistance*. – 2020. – DOI:10.1089/mdr.2020.0252.
27. *Genetic* characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Northwest China / F. Yang, Q. Wang, X. Wang [et al.] // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2016. – Vol. 15, Is. 12. – P. 2842–2847. – [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61368-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61368-0).
28. Rahimi H., Dastmalchi Saei H., & Ahmadi M. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* : Frequency and Antibiotic Resistance in Healthy Ruminants // *Jundishapur journal of microbiology*. – 2015. – Vol. 8(10). – e22413. <https://doi.org/10.5812/jjm.22413>.
29. *Comparison* of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections / B. Khoramian, F. Jabalameli, A. Niasari-Naslaji [et al.] // *Microbial Pathogenesis*. – 2015. – DOI: 10.1016/j.micpath.2015.08.007.
30. *Biofilm* Production and Presence of *ica* and *bap* Genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the Eastern Poland / P. Szweda, M. Schielmann, S. Milewski [et al.] // *Polish Journal of Microbiology*. – 2012. – Vol. 61, N 1. – P. 65–69.
31. Fox L.K., Zadoks R.N., Gaskins C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection // *Veterinary Microbiology*. – 2005. – Vol. 107 (2005). – P. 295–299. – DOI: 10.1016 / j.vetmic.2005.02.005.

32. *Prevalence and Characterization of Staphylococcus aureus Cultured From Raw Milk Taken From Dairy Cows With Mastitis in Beijing, China* / Wang Wei, Lin Xiaohui, Jiang Tao [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1123. – DOI:10.3389/fmicb.2018.01123.
33. *Antibiotic resistance and biofilm production in catalase-positive Gram-positive cocci isolated from Brazilian pasteurized milk* / M.A.A. Machado, W.A. Ribeiro, V.S. Toledo [et al.] // *Journal of Food Quality and Hazards Control*. – 2020. – Vol. 7. – P. 67–74.
34. *Biofilm formation by Staphylococcus aureus on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity* / P. Di Ciccio, A. Vergara, A.R. Festino [et al.] // *Food Control*. – 2015. – Vol. 50. – P. 930–936. – <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.048>.

REFERENCES

1. Mahon C.R., Larsen H.S., *Staphylococcus aureus*, *Textbook of diagnostic microbiology*, New York: WB Saunders Company, 1995, P. 325–330.
2. Matsunaga T., Kamata S., Kakiichi N., Uchida K., Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated in acute, acute and chronic mastitis of cattle, *J. Vet. Med. Sci*, 1993, Vol. 55, P. 297–300, DOI: 10.1292/jvms.55.297.
3. Larsen H.D., Sloth K.H., Elsberg C., Enevoldsen C., H Pedersen L., Eriksen N.H., Aarestrup F.M., Jensen N.E., Dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in nine Danish dairy herds, *Vet Microbiol*, 2000, Vol. 71, P. 89–101, DOI: 10.1016 / S0378-1135 (99) 00161-3.
4. Onasanya A., Mignouna H.D., Thottappilly G., Genetic fingerprinting and phylogenetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates from Nigeria, *Afr. J. Biotech*, 2003, Vol. 2 (8), P. 246–250.
5. Kalsoom F., Syed N.H.S., Farzana J., A model of antibiotic resistance against various *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk samples, *J. Res. Sci.*, 2004, Vol. 15, P. 145–151.
6. Bajmisheva D.Sh., Korosteleva L.A., Kristojt' S.V., Kotenkin S.V., *Zootekhniya*, 2008, No. 11, pp. 26–28. (In Russ.)
7. Rola J.G., Czubkowska A., Korpysa-Dzirba W., Osek J., *Toxins*, 2016, Vol. 8(3), P. 62, DOI: 10.3390/toxins8030062.
8. Hennekinne J.A., de Buyser M.L., *FEMS Microbiol. Rev.*, 2012, Vol. 36, P. 815–836, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x.
9. Rola J.G., Korpysa-Dzirba W., Osek J., *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2013, Vol. 57, P. 341–345, DOI: 10.2478/bvip2013-0059.
10. Artem'eva O.A., Nikanova D.A., Kotkovskaya E.N., Gladyr' E.A., Docev A.V., *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*, 2016, Vol. 51, No. 6, pp. 867–874. (In Russ.)
11. Aslantaş Ö., Demir S. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases // *J. of Dairy Science*. – 2016. – Vol. 99, Is. 11. – P. 8607–8613. – <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11310>.
12. Mekonnen S.A., Lam T., Hoekstra J., V.P.M.G. Rutten, T.S. Tessema, E.M. Broens, A.E. Rieseboos, M.P. Spaninks, G. Koop, *Characterization of Staphylococcus aureus* isolated from milk samples of dairy cows in small holder farms of North-Western Ethiopia, *Bmc Veterinary Research*, 2018, Vol. 14, P. 8, <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9442>.
13. Timakov A.V., Timakova T.K., Shmarov A.T., *Vestnik APK Verhnevolzh'ya*, 2015, No. 4 (32), pp. 56–59. (In Russ.)
14. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes, E. Thiran, P.A. Di Ciccio, H.U. Graber, E. Zanardi, A. Ianieri, J. Hummerjohann, *J. of Dairy Science*, 2018, Vol. 101, Is. 2, P. 1000–1012, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13696>.

15. Oniciuc E.-A., Cerca N., Nicolau A.I. Compositional Analysis of Biofilms Formed by *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Sources, *Frontiers in Microbiology*, 2016, Vol. 7, P. 390, DOI:10.3389/fmicb.2016.00390. ISSN:1664-302X.
16. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity, P. Di Ciccio, A. Vergara, A.R. Festino, *Food Control*, 2015, Vol. 50, P. 930-936, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.048>.
17. Daka D., Silassie S.G., Jihdego D., Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa region, southern Ethiopia, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2012, DOI: 10.1186 / 1476-0711-11-26.
18. Bianchi D.M., Gallina S., Bellio A., Chiesa F., Civera T., Decastelli L., Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy, *Lett. Appl. Microbiol*, 2014, Vol. 58, P. 190–196, DOI: 10.1111/lam.12182.
19. Lewis K. Persister Cells, *Annu. Rev. Microbiol*, 2010, Vol. 64, P. 357–372.
20. Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnel R., Schafhauser J., Wang Y., Britigan B.E., Singh P.K., Active Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria, *Science*, 2011, Vol. 334, P. 982–986.
21. *Elektronnyj detektor subklinicheskikh sostoyanij mastita u korov: rukovodstvo po ekspluatacii*, (Electronic detector of subclinical states of mastitis in cows), Olsztyn, Poland, 15 p.
22. Feng Yang, Qi Wang, Xurong Wang, Ling Wang, Min Xiao, Xipu Li, Jinyin Luo, Shidong Zhang, Hongsheng Li, Prevalence of *bla_Z* gene and other virulence genes in penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Gansu, China, *Turk. J. Vet. Anim. Sci*, 2015, Vol. 39, P. 634–636, DOI:10.3906/vet-1504-81.
23. Keyvan E., Yurdakul O., Demirtas A., Yalcin H., Bilgen N., Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Bulk Tank Milk, *Food Sci. Technol*, 2020, Vol. 40 (1), <https://doi.org/10.1590/fst.35818>.
24. Srednik M.E., Usongo V., Lépine S., Janvier X., Archambault M., Gentilini E.R., Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitis bovine milk in Argentina, *Journal of Dairy Research*, 2018, Vol. 85, P. 57–63, DOI:10.1017/S0022029917000851.
25. Jian Gao, Miro Ferreri, Fuqing Yu, Xiuquan Lui, Liben Cyen, Jingliang Su, Bo Han, Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China, *The Veterinary Journal*, 2012, Vol. 192, Is. 3, P. 550–552, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.08.030>.
26. I.A. Omwenga, G.O. Mitema, E.S., Obiero, Antimicrobial Usage and Detection of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant Strains in Raw Milk of Livestock from Northern Kenya. *Microbial Drug Resistance*, 2020, DOI:10.1089/mdr.2020.0252.
27. Yang F., Wang Q., Wang X., Wang L., Li X., Luo J., Zhang S., Li H., *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, Vol. 15, Is. 12, P. 2842–2847, [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61368-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61368-0).
28. Rahimi H., Dastmalchi Saei H., & Ahmadi M., *Jundishapur journal of microbiology*, 2015, Vol. 8(10), e22413, <https://doi.org/10.5812/jjm.22413>.
29. Khoramian B., Jabalameli F., Niasari-Naslaji A., Taherikalani M., Emaneini M., *Microbial Pathogenesis*, 2015, DOI: 10.1016/j.micpath.2015.08.007.
30. Szweda P., Schielmann M., Milewski S., Frankowska A., Jakubczak A., Biofilm Production and Presence of *ica* and *bap* Genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the Eastern Poland, *Polish Journal of Microbiology*, 2012, Vol. 61, No. 1, P. 65–69.
31. Fox L.K., Zadoks R.N., Gaskins C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection, *Veterinary Microbiology*, 2005, Vol. 107 (2005), P. 295–299, DOI: 10.1016 / j.vetmic.2005.02.005.

32. Wang Wei, Lin Xiaohui, Jiang Tao, Peng Zixin, Xu Jin, Yi Lingxian, Li Fengqin, Fanning Seamus, Baloch Zulqarnain, Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Cultured From Raw Milk Taken From Dairy Cows With Mastitis in Beijing, China / *Frontiers in Microbiology*, 2018, Vol. 9, P. 1123, DOI:10.3389/fmicb.2018.01123.
33. Machado M.A.A., Ribeiro W.A., Toledo V.S., Ramos G.L.P.A., Vigoder H.C., Nascimento J.S., Antibiotic resistance and biofilm production in catalase-positive Gram-positive cocci isolated from Brazilian pasteurized milk, *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 2020, Vol. 7, P. 67–74.
34. Ciccio P.Di, Vergara A., Festino A.R., Paludi D., Zanardi E., Ghidini S., Ianieri A., *Food Control*, 2015, Vol. 50, P. 930–936, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.048>.