

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Вологодская государственная молочнохозяйственная академия
имени Н.В. Верещагина»**

Факультет ветеринарной медицины и биотехнологий

Кафедра эпизоотологии и микробиологии

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

к лабораторно-практическим занятиям
для студентов факультета ветеринарной медицины
и биотехнологии

Специальность 36.05.01 – Ветеринария

Направление подготовки 36.03.01 – Ветеринарно-санитарная экспертиза

**Вологда – Молочное
2024**

УДК 619:579.861.2 (071)

ББК 48.73 р 30

Л 125

Составитель –

канд. вет. наук, доцент кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА **Е.А. Рыжакина**

Рецензенты:

канд. вет. наук, зав. отделом по изучению болезней животных незаразной этиологии ФГБНУ «Вологодский филиал Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко» **Л.К. Семина,**

канд. вет. наук, доцент кафедры эпизоотологии и микробиологии ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА **Ю.А. Воеводина**

Л125 Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных методические указания / Сост. Е.А. Рыжакина. – Вологда – Молочное: Вологодская ГМХА, 2024. – 18 с.

В методических указаниях рассмотрены основные методы диагностики стафилококков.

Печатается по решению редакционно-издательского совета Вологодской государственной молочнохозяйственной академии имени Н.В. Верещагина.

УДК 619:579.861.2 (071)

ББК 48.73 р30

© Рыжакина Е.А., 2024

© Вологодская ГМХА, 2024

Введение

Первых представителей рода *Staphylococcus* описали Пастер и Огстон в 1880 г. Родовое название *Staphylococcus* дал Огстон (*staphyle* – гроздь, *coccus* – зернышко, ягода), а описание рода – Розенбах. Современная систематика:

Подцарство	Bacteria
Тип	Fermicutes
Класс	Bacilli
Семейство	Micrococcaceae
Род	Staphylococcus

Род *Staphylococcus* включает более 32 видов.

Основными возбудителями стафилококкозов сельскохозяйственных животных являются виды *S. aureus* (2 подвида), *S. intermedius*, *S. hyicus*.

S. aureus вызывает у многих видов животных местные воспалительные гнойные процессы на коже, фурункулы, абсцессы и т.д.; маститы крупного рогатого скота, овец, свиней, лошадей, коз, кроликов; эндометриты овец, коз, свиней, собак. К *S. aureus* чувствительны цыплята раннего возраста, у взрослых кур обуславливает поражение органов дыхания, суставов.

Подвид *S. aureus subsp. anaerobicus* вызывает у овец казеозный лимфаденит, сходный с псевдотуберкулезным.

S. intermedius может поражать органы дыхания, суставы, возбудитель пиодермии собак.

S. hyicus вызывает экссудативный дерматит свиней, в основном поражаются поросята до 1,5-месячного возраста. У взрослых свиней может быть причиной метритов, поражений кожи. У коров является возбудителем мастита.

S. gallinarum и *S. arlettae* обитают на коже кур.

S. caprae выделяют из молока коз.

S. equorum выделяют с кожных покровов лошадей, от кошек.

S. delphini – от дельфинов.

Цели занятия:

1. Изучить морфологические, культуральные свойства, факторы патогенности стафилококков.
2. Изучить принципы лабораторной диагностики стафилококковых заболеваний.

План исследований

1. Определение микроскопических свойств (морфология и физиолого-биохимическая характеристика стафилококков).
2. Микробиологические исследования и фаготипирование стафилококков.
3. Серологические исследования.
4. Биологический метод исследования.
5. Альтернативные (ускоренные) методы идентификации.

1 Определение микроскопических свойств (морфология и физиолого-биохимическая характеристика стафилококков)

Морфология

Стафилококки – грамположительные кокки, сферической формы, размером 0,5–1,5 мкм, располагаются единично, парами, в чистой культуре свойственно скопление в виде гроздьев винограда (характерно деление в разных плоскостях). Неподвижные, не образуют спор, могут образовывать микрокапсулу.

Клеточная стенка содержит пептидогликан и глицеринтейховую кислоту. Стафилококки формируют гладкие колонии, окрашенные каротиноидами в желтый или оранжевый цвета. При росте на желточно-солевом агаре образуются мутные круглые ровные колонии кремового, желтого или оранжевого цвета. Однако пигментирование не является видовым признаком.

При культивировании в жидких средах бактерии вызывают их равномерное помутнение, а затем образование рыхлого осадка, превращающегося в тягучую массу.

Физиолого-биохимическая характеристика стафилококков

Стафилококки – факультативные анаэробы, но быстро и обильно растут при наличии кислорода. Биохимически очень активны. Продуцируют каталазу, на среде с глюкозой в анаэробных

условиях большинство штаммов образуют ацетоин (положительная реакция Фогес–Проскауэра). Выделяют аммиак при росте на аргениновом бульоне, восстанавливают нитраты до нитритов или молекулярного азота, активно гидролизуют белки, в аэробных условиях расщепляют многие углеводы до уксусной кислоты и углекислого газа. Родовым признаком является ферментация глюкозы в анаэробных условиях, что отличает стафилококки от микрококков.

Бактерии растут на основных средах при 37°C (оптимум 35–40°C), но могут расти и в более широком интервале температур (6,5–46°C). Оптимум роста отмечен при рН 7,0–7,5, но возможен рост в диапазоне рН 4,2–9,3. Хорошо выдерживают повышенное осмотическое давление, поэтому элективным субстратом для них служат среды с высокой концентрацией хлорида натрия – желточно-солевой или молочно-солевой агар.

Стафилококки хорошо переносят высушивание, сохраняя при этом вирулентность; погибают при прямом воздействии солнечного света в течение 10–12 часов.

Довольно устойчивы к нагреванию: при 70–80°C погибают за 20–30 мин, при 150°C – за 10 мин; сухой жар убивает их за 2 часа. Бактерии устойчивы к действию низких температур, повторное замораживание и оттаивание их не убивает.

Менее устойчивы стафилококки к действию дезинфектантов (перекиси водорода и др.), но резистентны к воздействию чистого этанола. При выращивании в аэробных условиях бактерии нуждаются в аминокислотах и витаминах, в анаэробных – требуют дополнительно урацил и дополнительные источники углерода.

На кровяном агаре могут образовывать несколько видов *гемолизинов* – веществ, поражающих эритроциты, лейкоциты и другие клетки. Продуцируют также фибринолизин, фосфатазу, бактериоцины; отдельные штаммы продуцируют коагулазу, ДНК-азу, H₂S и энтеротоксины (до 10 видов, характеризующихся летальным, гемолитическим или некротическим действием). Ферментируют некоторые углеводы с выделением кислоты без газа. Устойчивы к лизоциму, чувствительны к различным антибиотикам.

Факторы вирулентности:

1) Поверхностные белки, капсульные и капсулоподобные полисахариды – адгезия.

- 2) Капсула – подавление фагоцитоза.
- 3) Белок А – подавление опсонической активности антител.
- 4) Ферменты: липаза – абсцедирование кожи; лецитиназа – лейкопения; коагулаза – подавление фагоцитоза; гиалуронидаза – инвазия; бетта-лактамазы – устойчивость к антибиотикам.
- 5) Токсины (экзотоксины): гемолизины – универсальные мембранотоксины; лейкоцидины – разрушение нейтрофилов, макрофагов; энтеротоксины А, В, С, Д – пищевая интоксикация; эксфолиатины А, В – разрушение межклеточных контактов; токсин СТШ (синдром токсического шока).

2 Микробиологические исследования и фаготипирование стафилококков

Микробиологические исследования

1) Определение родовой принадлежности

В 1-й день исследования – петлей или шпателем материал засевают в чашки с 5% кровяным, а также желточно- или молочно-солевым агаром, с 10% содержанием хлорида натрия (для посева экссудата, гноя из не вскрывшихся абсцессов, флегмон используют МПА или 5% кровяной агар), которые инкубируют 18–24 ч при 37°C и столько же на свету при комнатной температуре (для более четкого пигментирования колоний). Солевые среды ввиду высокого содержания хлорида натрия являются селективными для стафилококков, рост большинства сопутствующих микроорганизмов на них подавляется.

На 2-й день исследования – изучают выросшие колонии: стафилококки образуют выпуклые, ровные непрозрачные колонии средней величины белого, лимонно-желтого или золотистого цвета (гемолитические или негемолитические). Пигментообразование лучше заметно на молочно-солевом агаре. На желточно-солевом агаре большая часть патогенных стафилококков вызывает лецитиназную (лецитовителлазную) реакцию, проявляющуюся в образовании вокруг колонии зоны помутнения с радужным венчиком в отраженном свете.

S. aureus на плотных питательных средах формирует круглые, выпуклые, с гладкой, блестящей поверхностью непрозрачные колонии диаметром до 6–7 мм. Может образовывать α - и β -

гемолизин. Цвет колонии серый, серо-белый с желто-оранжевым или оранжевым оттенком. Штаммы, выделенные от собак, обычно не пигментированы. Пигментообразование наиболее выражено на средах, содержащих кровь, сыворотку крови, молоко, углеводы. На жидких питательных средах растут с равномерным помутнением, образованием плотного, легко суспендируемого осадка.

S. hycus и *S. intermedius* на агаровых средах растут в виде круглых выпуклых, блестящих, непрозрачных колоний, достигающих на селективных средах диаметра 4–7 мм, пигмента не образуют.

S. gallinarum на плотных средах формирует непрозрачные, сухие, плоские, с дольчатыми краями колонии диаметром до 10–15 мм, желтые или непигментированные. Некоторые штаммы на кровяном агаре дают слабый гемолиз.

S. caprae растет на агаровых средах в виде круглых, слабо выпуклых, непрозрачных, с блестящей поверхностью непигментированных колоний. На кровяном агаре замедленно, через 48 часов и более, образует узкую зону β -гемолиза с широкой зоной частичного обесцвечивания среды.

S. epidermidis на плотных средах образует круглые, с гладкой блестящей поверхностью, непрозрачные колонии диаметром 3–6 мм серого или серо-белого цвета. При длительном культивировании липкость колонии возрастает и в центре формируется углубление. Некоторые штаммы образуют небольшое количество гемолизина. При росте на питательном бульоне формируется слизистый осадок.

S. saprofiticus растет на агаровых средах в виде круглых, выпуклых, с гладкой, блестящей поверхностью колоний диаметром по 5–9 мм. Некоторые штаммы образуют желтый или желто-оранжевый пигмент.

При микроскопии в мазках обнаруживают грамположительные кокки, расположенные гроздьями. Для выделения чистой культуры подозрительные колонии пересевают на скошенный МПА.

На 3-й день исследования – проверяют чистоту выделенной культуры, ставят тесты и делают посеvy для ее идентификации на уровне рода.

Культуры из подозрительных колоний, после изучения морфологических и тинкториальных свойств клеток, отвивают на простой МПА, выращивают и исследуют у них ряд признаков, позволяющих отличить стафилококки от сходных бактерий: виды родов *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*. Исследуют способность к ферментации глюкозы в ОФ-тесте, наличие каталазы, оксидазы, коагулазы, чувствительность к бацитрацину (табл. 1).

Таблица 1 – Дифференциация стафилококков от других грамположительных кокков

Признак	Стафилококки	Микрококки	Энтерококки	Стрептококки
Ферментация глюкозы (ОФ-тест)	+	–	+	+
Каталаза	+	+	–	–
Оксидаза	–	+	–	–
Коагулаза	+	–	–	–
Чувствительность к бацитрацину (0,04 ЕД/диск)	–	+	–	–

Постановка ОФ-теста. Испытуемую культуру засевают уколом в столбик среды Хью – Лейфсона в двух пробирках, в одну из которых затем поверх среды наслаивают стерильное вазелиновое масло (0,5–1 мл). Посевы проводят иглой (или маленькой петлей), не доводя ее до дна пробирки на 5–6 мм, инкубируют при 37°C в течение 1–4 суток. Так как в среду в числе других компонентов входит агар в небольшой концентрации (что создает полужидкую консистенцию среды) и индикатор рН – бромтимоловый синий (придающий среде зеленовато-оливковый цвет), при учете реакции могут быть определены не только окисление или ферментация углевода (глюкозы), но также газообразование и подвижность.

Изменение цвета среды, в обеих пробирках на желтый, свидетельствует о расщеплении глюкозы ферментацией (F), изменение аналогичного характера только в открытой пробирке (не залитой вазелиновым маслом) – об окислительном процессе (O), а сохра-

нение неизменного цвета в обеих пробирках – об отсутствии какого-либо метаболизма глюкозы (–).

Каталазный тест. Чистую культуру стафилококка вносят в каплю 3–10%-го раствора перекиси водорода на стекле и растирают круговыми движениями. При наличии каталазы перекись водорода разлагается с образованием пузырьков кислорода.

Определение коагулазы. Осуществляется путем посева культуры стафилококка в узкую пробирку с 0,5 мл 5% кроличьей или человеческой цитратной плазмы.

Посевы помещают в термостат на 6–10 часов с регистрацией результатов через 1, 2, 3 и 6 часов.

Наряду с классическим методом определения плазмокоагулазы, применяется также реакция плазмокоагуляции на стекле или ускоренный «слид-тест».

Этот методический прием основан на способности коагулазоактивных стафилококков склеиваться плазмой крови и коагулировать ее.

Коагулазоотрицательные штаммы таким свойством не обладают. Для выполнения реакции берут каплю воды, суспендируют в ней испытуемую культуру, после чего добавляют одну каплю разведенной согласно инструкции плазмы крови кролика или человека.

Через 15–60 секунд образуется плазменный сгусток. Более поздняя (позже минуты) реакция считается сомнительной, а реакция, наступившая через 3 минуты, – отрицательной.

Виды стафилококка коагулазоположительные: *S. aureus*, *S. hyicus*; коагулазоотрицательные: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*.

Чувствительность к бацитрацину (0,04 ЕД/диск). Стерильные бумажные диски пропитывают 0,04 ЕД бацитрацина. Испытуемую культуру засевают газоном на кровяной агар в чашках Петри и на поверхности среды помещают диск с бацитрацином. Посевы инкубируют 24 часа.

Положительный результат – стерильная зона вокруг диска.

На 4-й день исследования – проводят окончательную идентификацию культур по культурально-морфологическим, биохимическим тестам и др.

2) *Определение видовых свойств стафилококков*

Изучение патогенных свойств стафилококка позволяет отнести выделенную культуру к одному из трех основных патогенных видов (табл. 2).

Определение гемотоксина выполняется путем прямого посева культуры на кровяной МПА, содержащий 5-10% дефибринированной кроличьей или бараньей крови.

Альфа-гемолиз проявляется в виде полного просветления среды вокруг штриха культуры и нейтрализуется альфа-антитоксической сывороткой.

Бета-гемолиз дает частичное просветление, зона которого имеет буровато-пурпурный оттенок. Это «тепло-холодовый» токсин и лучше выявляется после дополнительного суточного выдерживания чашек в холодильнике при температуре +4 °С.

Дельта-гемолиз определяется по узкой полоске гемолиза, не нейтрализуется альфа-антитоксической сывороткой.

Определение некротоксина производится путем внутрикожного введения кролику 0,2 мл взвеси 2 млрд., суточной агаровой культуры стафилококка в физиологическом растворе. Наблюдение за животным ведется в течение 24–48 часов. Как положительная реакция расценивается лишь инфильтрат с желтоватым центром, темным ободком и ярко-красной каймой по периферии с последующими явлениями некроза.

Определение фермента гиалуронидазы (фактор проникновения). Обнаружение этого фермента у стафилококка осуществляется в тесте декапсуляции. Берут штаммы капсулообразующих видов бактерий, имеющих в составе капсулы гиалуроновой кислоты: *Streptococcus equi*, *Pasteurella multocida* (серовар А). На кровяной МПА в чашке Петри крестообразно засевают штрихом *S. equi* или *P. multocida* (серовар А) и под углом 90° аналогично в виде линии культуру испытуемого стафилококка. Посевы инкубируют при 37° С в течение 24 часов. При наличии гиалуронидазы колонии тест-микроба вблизи штриха стафилококков образуются более мелкие и тусклые за счет разрушения капсулы ферментом, который диффундирует в толщу агара. Результат считают положительным.

Определение фибринокиназы основано на способности стафилококка лизировать фибринные сгустки свежей крови. Для ис-

питания берут 0,5 мл бульонной суточной культуры стафилококков, вносят в 0,2 мл свежей человеческой плазмы или крови с 0,8 мл физиологического раствора. Затем осторожно перемешивают, предварительно добавив 0,5 мл 0,25% раствора хлористого кальция. Контролем в данной реакции служит пробирка со всеми теми же компонентами, но без бактерий. Пробирки помещаются в термостат при 37°C. В течение первых 15 минут наступает свертывание. С этого момента следят за ходом растворения образовавшегося сгустка. Обычно патогенные культуры обеспечивают полный фибринолизис в течение 24 часов.

Выявление лецитиназы. Культуру бактерий засевают штрихом на желточный агар с целью получения изолированных колоний. После инкубирования учитывают результат. Положительная реакция – зона помутнения вокруг колоний.

Определение протеина «А». Это белковое вещество, которое часто обнаруживают на поверхности клетки *S. aureus* и *S. hyicus*, обладает способностью неспецифически связывать Fc-фрагменты молекул JgG.

Отмытые центрифугированием эритроциты барана суспендируют в физиологическом растворе, смешивают с гемолизином, разведенным физиологическим раствором. Компоненты выдерживают при 37°C. Эритроциты отмывают центрифугированием и ресуспендируют в исходном растворе физиологического раствора. Каплю суспензии сенсibilизированных эритроцитов смешивают на предметном стекле бактериальной петлей с бактериальной массой стафилококков. За счет протеина «А» стафилококков происходит агглютинация эритроцитов, содержащих на своей поверхности JgG.

Выявление ДНК-азы. Нуклеаза выявляется у *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*.

Методика определения: к расплавленному и несколько охлажденному МПА добавляют раствор натриевой соли ДНК из расчета 1–1,5 мг/мл и стерилизуют в водяной бане кипячением 30–40 минут. После охлаждения среды до 50–60°C к ней асептично добавляют хлорид кальция из расчета 0,8 мг/мл, разливают в чашки Петри по 10–15 мл.

На поверхность застывшей среды после ее подсушивания в термостате высеивают прикосновением петли в заранее размечен-

ные точки 8–10 испытуемых культур стафилококка и инкубируют 18–20 ч при температуре 37°C. Затем в чашку вносят 4–5 мл 1н. раствора соляной кислоты, которую через 2-3 минуты сливают.

Результат реакции учитывают, просматривая чашки на проходящем рассеянном свете. По наличию просвечивающих зон вокруг колоний на непрозрачном, мутном серо-белом фоне всего слоя агара делают вывод – культура стафилококка продуцирует ДНК-азу.

Дифференциация патогенных стафилококков по отношению к манниту осуществляется на жидкой среде, содержащей 0,5% многоатомного спирта-маннита. Патогенные стафилококки маннит разрушают через 36 часов (среда изменяет цвет на желтый), непатогенные – значительно позже. Этот признак весьма неустойчив и самостоятельным показателем патогенности не является.

Дифференциация культур патогенных стафилококков на среде Чепмена. Среда имеет серовато-сиреневый цвет. Патогенные стафилококки дают на ней фиолетовые или оранжевые колонии, непатогенные – белые или сиреневые.

Таблица 2 – Свойства основных патогенных видов стафилококков

Признак	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i>
Коагулаза (плазма кролика)	+	± (11-89 % штаммов позитивные)	± (11-89 % штаммов позитивные)
Гемолизин (эритроциты КРС)	+	–	–
Гиалуронидаза	+	–	+
Лецитиназа	+	–	± (варьирующий признак)
Протеин «А»	+	± (варьирующий признак)	+
ДНК-аза	+	+	+
Ферментация маннита аэробно	+	+	–
анаэробно	+	–	–
Мальтоза	+	± (90% штаммов слабо позитивные)	–
Образование пигмента	+	–	–

Исследование дополнительных ферментативных, культуральных и прочих свойств дает возможность идентифицировать другие виды стафилококка, достаточно часто выделяемые от животных (табл. 3).

Таблица 3 – Биохимические признаки и другие свойства стафилококков, выделяемых от животных

Вид стафилококка	Признак										
	Коагулаза	ДНК-аза	Гемолизин	Образование пигмента	Щелочная фосфатаза	Уреаза	Маннит	Мальтоза	Гидролиз эскулина	Новобиоцин 5 мкг/диск	Полимиксин В 300 ед/диск
<i>S.aureus subsp. aureus</i>	+	+	+	+	+	d	+	+	-	Ч	Р
<i>S.aureus subsp. anaerobicus</i>	+	+	+	-	+	нд	нд	+	-	Ч	нд
<i>S.intermedius</i>	+	+	+	-	+	+	(d)	(+)	-	Ч	Ч
<i>S.hyicus</i>	d	+	-	-	+	d	-	-	-	Ч	Р
<i>S.epidermidis</i>		d	(d)	-	d	+	-	+	-	Ч	Р
<i>S.saprophyticus</i>	-	-	-	d	-	+	d	+	-	Р	Ч
<i>S.caprae</i>	-	-	(d)	-	(+)	+	d	(d)	-	Ч	Ч
<i>S.gallinarum</i>	-	-	(d)	d	(+)	+	+	+	+	Р	Ч
<i>S.arlettae</i>	-	-	-	+	(+)	-	+	+	-	Р	нд
<i>S.lentus</i>	-	-	-	d	(±)	-	+	d	+	Р	Ч
<i>S.equorum</i>	-	-	(d)	-	(+)	+	+	d	d	Р	нд
<i>S.similans</i>	-	-	(d)	-	(d)	+	+	(±)	-	Ч	Ч
<i>S.delphini</i>	нд	-		-	+	+	(+)	+	нд	Ч	нд
<i>S.chromogenes</i>	-	-	-	+	+	+	d	d	-	Ч	Р

Обозначения:

«+» – 90% и более штаммов положительные;

«-» – 90% и более штаммов отрицательные;

d – 89% позитивные;

() – замедленная реакция;

нд – нет данных;

Р – устойчивы;

Ч – чувствительны.

Фаготипирование стафилококков

Проводят для обнаружения источника возбудителя и установления эпизоотических (эпидемических) связей.

Фаготиповая принадлежность является маркером, позволяющим устанавливать идентичность штаммов, даже если другие характеристики подверглись изменениям. Для фаготипирования *S. aureus* существует международный набор фагов, включающий 21 фаготип, разделенный на 5 фагогрупп (I–V). Для типирования штаммов, выделенных от крупного рогатого скота, предложен свой набор фагов, состоящий из фаготипов 42 Д, 78, 102, 107, 117, 118, 119.

Техника фаготипирования: исследуемую культуру выращивают на скошенном МПА при 37–38°C в течение 18–24 часов, пересевая в пробирку с 2,5 мл бульона Хоттингера, инкубируют при 37°C 3–4 часа, засевают газоном в чашки Петри на 1,25%-ной МПА (рН 7,2–7,4) с 0,4% глюкозы и 0,02% кальция хлорида.

Засеянные чашки подсушивают 30–40 минут в термостате, расчерчивают дно чашки на 24 квадрата и стандартной бактериологической петлей (d=2 мм) в каждый квадратик вносят тот или иной фаг в рабочем титре. Бактериологическую петлю после каждой манипуляции прожигают. Посевы инкубируют 5–6 часов при 37°C или 18–20 часов при 30°C. Штаммы, не лизированные набором фагов, проверяют повторно, используя более концентрированный фаг (×100).

Степень лизиса оценивают по следующей схеме:

«++++» – полный лизис;

«+++» – наличие в зоне лизиса колоний стафилококка;

«++» – в зоне капли фага обнаруживают более 50 колоний фага;

«+» – от 20 до 50 колоний фага;

«-» – полное отсутствие лизиса.

Во многих случаях культуры стафилококков лизируются не одним, а несколькими фагами, образуя своеобразную фагомозаику из стерильных пятен. Стафилококки, обнаруживающие одну и ту же мозаику или отличающиеся на 1 фаг, считаются идентичными.

3 Серологические исследования

В диагностике стафилококковых инфекций имеет вспомогательное значение, используясь, в основном, для диагностики хро-

нических процессов (остеомиелит, септикопиемия и др.). Для определения антител к токсину стафилококка применяют РНГА с эритроцитарным диагностикумом, нагруженным α -токсином стафилококка или РН (реакция нейтрализации гемолитической активности стафилококкового токсина антитоксинами сыворотки крови больного в присутствии эритроцитов кролика).

Для выявления энтеротоксинов *S. aureus* в кормах и других субстратах применяют РДП (микровариант на предметных стеклах), радиоиммунологический анализ, РА, РЛА, ИФА, ПЦР, иммуноблоттинг.

4 Биологический метод исследования

Проводят для выявления патогенных свойств штаммов по летальному эффекту (биопроба на цыплятах), положительной дермонекротической реакции (некротоксин), а также на котятах для обнаружения способности продуцировать энтеротоксин. Известно шесть антигенно различных энтеротоксинов (А, В, С, В, Е, F).

Дермонекротическая проба. У кролика альбиноса массой 2–2,5 кг за сутки до опыта на боку выстригают два участка размером 2×2 см. 24-часовую бульонную испытуемую культуру вводят внутрикожно в дозе 0,2 мл на обоих участках. Положительный результат: через 24 часа на месте инъекции появляется гиперемия кожи, через 48 часов – некроз. Наблюдение продолжают 4 суток.

Биопроба на цыплятах. Проводят при изучении штаммов, выделенных от птиц. Суточную бульонную культуру в объеме 0,1 мл вводят во внешний угол глазницы двум 1-2-дневным цыплятам.

Наблюдение ведут в течение 5 суток. Положительный результат: гибель цыплят на 3–5 сутки при выделении культуры стафилококков из паренхиматозных органов и костного мозга цыплят.

Обнаружение энтеротоксина в биопробе на котятах. Испытуемую культуру стафилококка засеивают на среду для получения стафилококкового энтеротоксина. Посевы инкубируют в эксикаторе с 20% CO₂ при 37°C трое суток. На четвертые сутки содержимое колбы фильтруют через мембранные фильтры № 3 или № 4. Приблизительно 10–15 мл фильтрата смешивают в равной пропорции с теплым молоком и скармливают 4–8-недельным котятам. Положительный результат: через несколько минут котята

проявляют беспокойство, через 1–3 часа появляются симптомы гастроэнтерита: понос, рвота. Возможен летальный исход.

Серологически энтеротоксин обнаруживают в РПД или при помощи иммуноферментного метода.

5 Альтернативные (ускоренные) методы идентификации

В настоящее время ряд фирм выпускает наборы для ускоренной комплексной идентификации стафилококков по биохимическим свойствам. Эти наборы обычно рассчитаны на выявление у изолированных штаммов способности ферментировать глюкозу, фруктозу, мальтозу, трегалозу, маннит, ксилит, малибиозу, раффинозу, ксилозу и т.д.

Они представляют собой полоски, состоящие из микропробирок с высушенными субстратами для проведения биохимических тестов. Учет результатов проводят после инкубации полосок с внесенной в микропробирки тестируемой культурой в течение 18–24 ч.

Модифицированные питательные среды на подложке:

- 3М Petrifilm Staph Express Count Plate (STX) – Петрифилм для подсчета *Staph.aureus* (18–24 часа)
- 3М Petrifilm (Staph Express Disk) – Диски для подтверждения *Stap.aureus* (в течение 2-3 часов)

Нормативная документация

- ГОСТ Р 52815–2007 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*.
- ГОСТ 30347–97 Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*.
- ГОСТ Р 54674–2011 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьих. Метод выявления и определения количества *Staphylococcus aureus*.
- МУК 4.2.2884–11. Методы микробиологического контроля объектов окружающей среды и пищевых продуктов с использованием петрифильмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

а) основная литература

1. Лабораторная диагностика бактериальных болезней животных : учебное пособие для спо / сост. П. И. Барышников. - Санкт-Петербург : Лань, 2022. - 712 с. - (Среднее профессиональное образование). - URL: <https://e.lanbook.com/book/202124>. - Режим доступа: для авториз. пользователей. - ISBN 978-5-8114-9978-6 : Б. ц. - Текст : электронный.

2. Лабораторная диагностика вирусных болезней животных : учебное пособие / сост.: П. И. Барышников, В. В. Разумовская. - 2-е изд., испр. - Санкт-Петербург : Лань, 2022. - 672 с. - (Учебники для вузов) (Специальная литература). - URL: <https://e.lanbook.com/book/211994>. - Режим доступа: для авториз. пользователей. - ISBN 978-5-8114-1882-4 : Б. ц. - Текст : электронный.

3. Лабораторная диагностика инфекционных болезней : учебное пособие для вузов / Р. Г. Госманов, Р. Х. Равилов, А. К. Галиуллин [и др.]. - 4-е изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2022. - 196 с. - URL: <https://e.lanbook.com/book/215735>. - Режим доступа: для авториз. пользователей. - ISBN 978-5-507-44151-8 : Б. ц. - Текст : электронный.

б) дополнительная литература

4. Методы диагностики болезней сельскохозяйственных животных : учебное пособие для вузов / А. П. Курдеко, А. И. Ятусевич, Г. Г. Щербаков [и др.] ; под ред. А. П. Курдеко, С. П. Ковалёва. - 4-е изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2023. - 208 с. - URL: <https://e.lanbook.com/book/335189> (дата обращения: 06.06.2023) . - Режим доступа: для авториз. пользователей. - ISBN 978-5-507-47968-9 : Б. ц. - Текст : электронный.

5. Иванов, А. А. Клиническая лабораторная диагностика : учебное пособие для вузов / А. А. Иванов. - 3-е изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2023. - 432 с. - URL: <https://e.lanbook.com/book/305228>. - Режим доступа: для авториз. пользователей. - ISBN 978-5-507-46278-0 : Б. ц. - Текст : электронный.

6. Егорова, О. В. Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ. Основы микроскопии : учебное пособие для спо / О. В. Егорова. — 2-е изд., испр. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — 768 с. — ISBN 978-5-8114-9554-2. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/200456> (дата обращения: 06.12.2024). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

7. Лабораторная диагностика инвазионных болезней животных : учебное пособие / Н. Т. Карсаков, А. М. Атаев, М. М. Зубаирова, А. Б. Кочкарев . - Махачкала : ДагГАУ имени М.М.Джамбулатова, 2021. - 104 с. - URL: <https://e.lanbook.com/book/175382>. - Режим доступа: для авториз. пользователей. - Б. ц. - Текст : электронный.

Содержание

Введение	3
1 Определение микроскопических свойств (морфология и физиолого- биохимическая характеристика стафилококков)	4
2 Микробиологические исследования и фаготипирование стафилококков ..	6
3 Серологические исследования	14
4 Биологический метод исследования.....	15
5 Альтернативные (ускоренные) методы идентификации	16
Список литературных источников.....	17

Ответственный за выпуск Е.А. Рыжакина

Корректор Г.Н. Елисева

Заказ № 452–Р. Тираж 100 экз. Подписано в печать 23.12.2024 г.
Вологодская ГМХА 160555, г. Вологда, с. Молочное, ул. Емельянова, 1