

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования**

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии

**Государственное управление ветеринарии
Краснодарского края**

**Государственное учреждение Краснодарского края
«Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория»**

**А.А. ШЕВЧЕНКО, О. Ю. ЧЕРНЫХ,
Л.В. ШЕВЧЕНКО, Г.А. ДЖАИЛИДИ,
Д.Ю. ЗЕРКАЛЕВ. А.Р. ЛИТВИНОВА,
О.В. ДВАДНЕНКО**

**ДИАГНОСТИКА СТАФИЛОКОККОЗОВ И
СТРЕПТОКОККОЗОВ**

Учебное пособие

г. Краснодар, 2013

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования**

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии

**Государственное управление ветеринарии
Краснодарского края**

**Государственное учреждение Краснодарского края
«Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория»**

**А. А. ШЕВЧЕНКО, О. Ю. ЧЕРНЫХ, Л.В. ШЕВЧЕНКО,
Г.А. ДЖАИЛИДИ, Д.Ю. ЗЕРКАЛЕВ, А.Р. ЛИТВИНОВА,
О.В. ДВАДНЕНКО**

**ДИАГНОСТИКА СТАФИЛОКОККОЗОВ И
СТРЕПТОКОККОЗОВ**

Учебное пособие

**Для студентов высших учебных заведений факультета
ветеринарной медицины по направлению подготовки
«Ветеринария»**

КРАСНОДАР, 2013

УДК 619:616.98-07:[579.861.2+579.862.1(075)

ББК 48.73

Д 44

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,
Г.А. Джаилиди, Д.Ю. Зеркалев, А.Р. Литвинова, О.В. Двадненко
Диагностика стафилококкозов и стрептококкозов. Краснодар:
КубГАУ, 2013. 46 с.

В учебном пособии изложены основные свойства возбудителей стафилококкозов и стрептококкозов; описаны бактериоскопические, бактериологические, биохимические, биологические и серологические методы диагностики и дифференциальной диагностики заболеваний.

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Лысенко А.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, декан факультета ветеринарной медицины КубГАУ.

Куриннов В.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии.

Рекомендовано методической комиссией факультета ветеринарной медицины КубГАУ протокол №3 от 19 ноября 2012 года.

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13

Диагностика стафилококкозов

Цель занятия: изучить правила отбора патологического материала и отправки в ветеринарную лабораторию, основные свойства возбудителей стафилококкозов, методы лабораторной диагностики.

Диагностика стафилококкозов проводится комплексно, учитывают эпизоотологические, данные, клинические признаки, патологоанатомические изменения и лабораторные исследования.

Возбудителями стафилококкозов животных и человека являются кокковидные, грамположительные, неподвижные, неспорообразующие бактерии, относящиеся к роду *Staphylococcus*, семейства *Micrococcaceae*. Стафилококки - обитатели кожи, слизистых оболочек. Как транзитные виды могут присутствовать в кишечном тракте. Род *Staphylococcus* содержит 28 видов. У человека стафилококковые инфекции включают более 100 нозологических форм. Основными возбудителями стафилококкозов с/х животных являются виды *S. aureus* (два подвида), *S. intermedius*, *S. hyicus* и др.

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* наиболее чувствительны цыплята раннего возраста, у взрослых кур обуславливает поражение органов дыхания, суставов.

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

S. intermedius наиболее обычен как возбудитель пиодермии собак, кошек, может поражать респираторный тракт, суставы и другие ткани.

S. hyicus вызывает экссудативный дерматит свиней, в основном поражаются поросята до 1,5-месячного возраста. У взрослых свиней может быть причиной метритов, поражений кожи. Иногда этот вид стафилококков изолируют при маститах коров.

S. gallinarum, *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.

Лабораторная диагностика стафилококкозов основана на выделении культур возбудителей световой микроскопией, изучении культурально-морфологических, биохимических, биологических и серологических свойств.

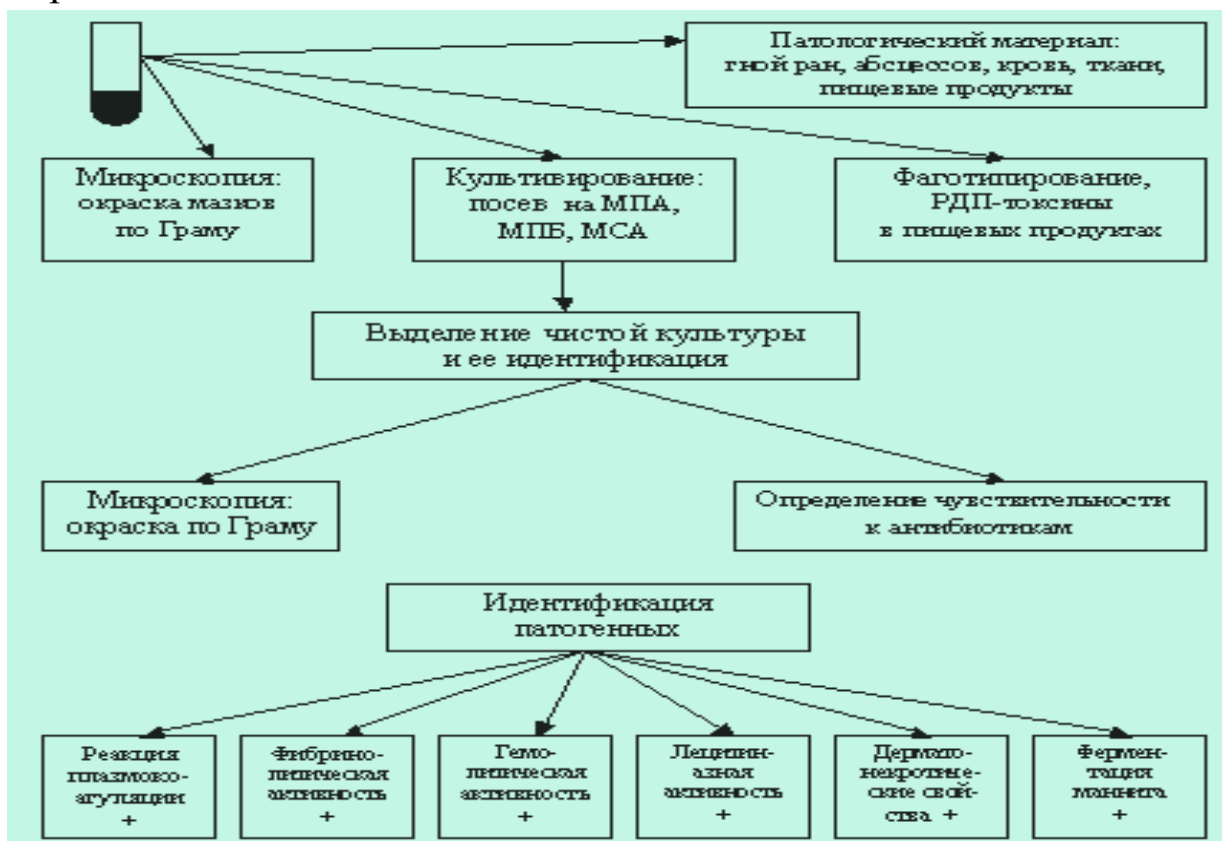
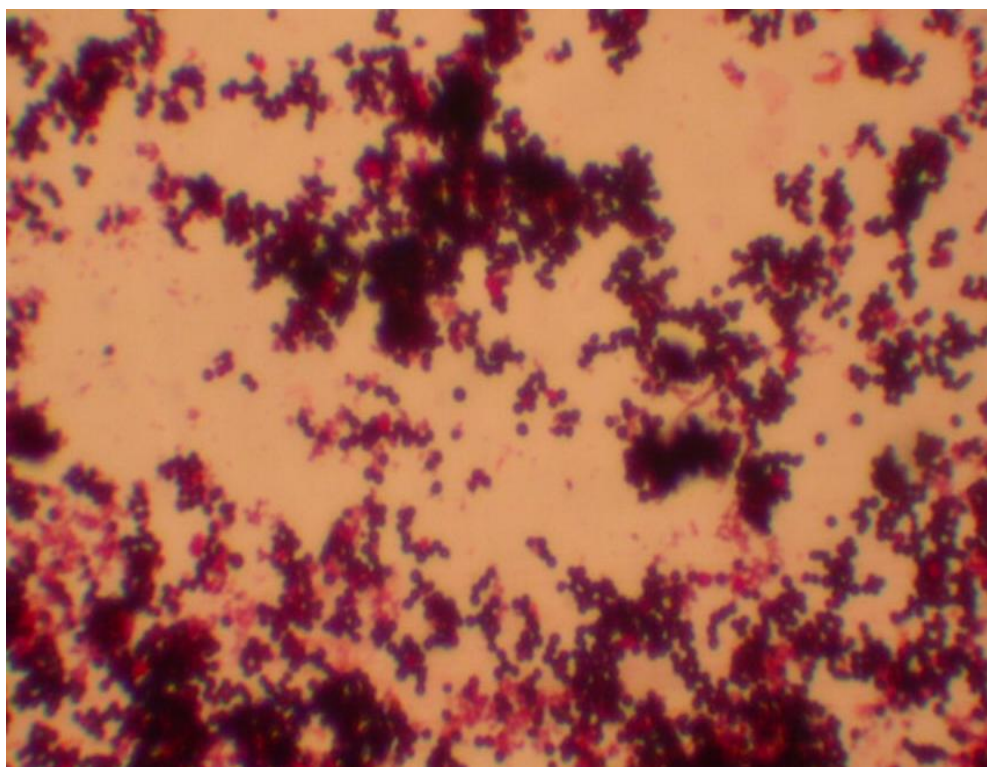


Схема лабораторной диагностики патматериала на стафилококкоз

Бактериологическое исследование. Для исследования используют патматериал. Трупы мелких животных и птиц направляют в лабораторию целиком, от трупов крупных животных берут части паренхиматозных органов, кровь из сердца, головной мозг; прижизненно — содержимое абсцессов, истечения из шейки матки, синовиальную жидкость из пораженных суставов, молоко от маститных животных, соскобы с пораженных участков кожи. При подозрении на кормовые отравления стафилококковой этиологии направляют пробы корма. Материал берут от животных, не подвергавшихся в последние 10 дней лечению антибактериальными препаратами.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из поступившего материала готовят мазки, окрашивают по Граму. Клетки стафилококков сферические, размером 0,5-1,0 мкм, грамположительные, располагаются единично, парами, в виде скоплений неправильной формы, некоторое количество клеток в мазках из тканей может быть фагоцитировано. Клетки вирулентных штаммов *S. aureus* имеют небольшую капсулу. Клетки *S. saprophyticus* располагаются в препарате в виде групп неправильной формы, а также тетрадами и пакетами.

Стафилококки



Выделение и идентификация культур стафилококков

Культивирование. Подавляющее число стафилококков — факультативные анаэробы. Подвид *S. aureus anaerobicus* в аэробных условиях не растет. С другой стороны, не растут на средах с тиогликолатом *S. arlettae*, *S. equorum*, не растет или слабо растет *S. lentus*. Температурный оптимум — 35-37° С, pH 7,2-7,4. Испытуемый материал обычно высевают на кровяной (овечий) агар, загрязненный — на молочно-солевой агар, среду Baird-Parker, плотные среды с добавлением на литр среды 15 мг налидиксовой

кислоты и 10 мг колистина сульфата, желточно-солевой агар Чистовича и др. Посевы, за исключением случаев выделения анаэробного подвида *S. aureus*, инкубируют в аэробных условиях при 37° С в течение 24-48 часов.

Характер роста стафилококков на питательных средах

Приводим культуральные характеристики основных патогенных видов стафилококков и *S. saprophyticus*. Макроскопически видимые колонии образуются в течение 24 часов инкубирования.

S. aureus на плотных питательных средах формирует круглые, выпуклые, с гладкой, блестящей поверхностью непрозрачные колонии диаметром до 6-7 мм. Может образовывать α - или β -гемолизин. Колонии капсулообразующих штаммов более мелкие. Цвет колоний 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. В жидких питательных средах растет с равномерным помутнением, образованием плотного, легко суспендируемого осадка.

S. hyicus 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 колоний возрастает и в центре формируется углубление.

Некоторые штаммы образуют небольшое количество гемолизина. При росте в питательном бульоне формируется слизистый осадок.

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

При характеристике гемолитической активности стафилококков дифференцируют четыре типа гемолиза: альфа-, бета-, дельта-, гамма.



Рост стафилококков на кровяном МПА

Идентификация стафилококков на уровне рода. Культуры из подозрительных колоний, после изучения морфологических и тинкториальных свойств клеток, отбирают 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.

Ориентируясь на критерии, изложенные в табл.1, к стафилококкам относят штаммы, ферментирующие глюкозу в ОФ-тесте (расщепление в аэробных и анаэробных условиях), образующие каталазу, не обладающие оксидазой, чувствительные к бацитрацину.

Четко выраженная коагулазная активность позволяет культуру стафилококка отнести к группе патогенных без выяснения видовой принадлежности штамма.

Таблица 1 - Дифференциация стафилококков от других грамположительных кокков

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

Определение патогенных свойств стафилококков, идентификация на уровне вида. Достаточно подробное изучение патогенных свойств стафилококка позволяет отнести выделенную культуру к одному из трех основных патогенных видов (табл. 2). Исследование дополнительных ферментативных, культуральных и прочих свойств дает возможность идентифицировать другие виды стафилококков, достаточно часто выделяемые от животных (табл. 3). О присутствии патогенных свойств у выделенных культур судят, кроме того, по результатам биопроб, позволяющих, в том числе, доказать наличие энтеротоксина. Определение факторов патогенности проводят следующими методами.

Коагулаза. Фермент, вызывающий свертывание плазмы, на фибриноген непосредственно не действует. Для этой цели наиболее подходит цитрированная плазма кролика (1 объем 4%-ного раствора натрия цитрата + 9 объемов крови). При исследовании штаммов, выделенных от определенных видов животных, может быть использована их кровь (свиньи, КРС, собаки).

Цитратную кровь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут, плазму отсасывают в стерильные пробирки, закрывают пробками, хранят до 3 недель при 4-5° С. При постановке опыта плазму разводят стерильным физиологическим раствором 1:5 и разливают по 0,5 мл в стерильные пробирки. Испытуемую культуру выращивают на МПА или МПБ 18-24 часа и вносят две капли бульонной или одну петлю агаровой культуры в пробирки с подготовленной плазмой. Параллельно проводят контроль плазмы без культуры бактерий. Пробирки ставят в термостат (37-38° С). Учет проводят через каждый час в течение 5-6 часов, при комнатной температуре 18 часов. Положительный результат — образование сгустка, который при наклоне пробирки удерживается. Стафилококки с выраженной патогенностью свертывают плазму в сроки до 2 часов. Наличие коагулазы наиболее четко коррелирует с патогенностью стафилококка.

Таблица 2 - Свойства основных патогенных видов стафилококков

Признаки	<i>S. aureus</i> *	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i>
Коагулаза (плазма кролика)	+	d	D
Гемолизин (эритроциты КРС)	+	-	-
Гиалуронидаза	+	-	+
Лецитиназа	+	Н.Д.	Варьирующий признак (чаще +)
Протеин «А»	+	Варьирующий признак	+
ДНК-аза	+	+	+
Ферментация маннита аэробно анаэробно	+	+	-
Мальтоза	+	(±)	-
Образование пигмента	+	-	-

* — Анаэробный подвиж *S. aureus* (*S. subsp. anaerobicis*) образует коагулазу, ДНК-азу, гемолизин, ферментирует мальтозу, не синтезирует пигмент (±) — 90% или более штаммов слабо позитивные d — 11-89% штаммов позитивные.

Фактор сгущивания (Chumping factor-CF). CF -фактор в отличие от коагулазы действует на фибриноген, что приводит к агрегированию стафилококков. Для выявления CF-фактора на предметном стекле в капле неразведенной цитратной плазмы суспендируют

бактериальную массу стафилококков из агаровой культуры при помощи бактериологической петли. В положительных случаях агрегирование наступает в течение 1-2 минут. Контролем служит взвесь стафилококков в физиологическом растворе. Результаты СФ-теста хорошо коррелируют с результатами пробирочной пробы на коагулазу.

Фибринолизин (стрептокиназа). Исследуемую культуру микроорганизма засевают в виде «бляшки» на агар с 12 % цитрированной плазмы. Посевы инкубируют при 37 °С 23-24 ч. Положительный результат — появление зоны просветления вокруг колонии.

Лецитиназа. Фермент бактерий, расщепляющий лецитин, выявляют путем посева культуры стафилококков на желточный агар. Готовят желточный агар: пептон — 20 г, гидрофосфат натрия — 2,5 г, натрий — 1 г, 0,5%-й раствор сульфата магния — 0,1 мл, глюкоза — 1 г, агар — 12,5 г, вода дистиллированная — 500 мл. Устанавливают рН 7,2-7,4, стерилизуют при 121°С 15 мин, охлаждают до 55 °С, добавляют один стерильный желток на 500 мл среды, компоненты перемешивают и смесь разливают в чашки Петри. Исследуемую культуру засевают дробно на желточный агар, культивируют при 37-38 °С 24-48 ч. Положительный результат — появление зоны помутнения вокруг колоний.

Протеин «А». Белковое вещество, которое часто обнаруживают на поверхности клетки *S. aureus* и *S. hyicus*, обладает способностью неспецифически связывать Fc-фрагменты молекул JgG. Обнаружение протеина «А» у стафилококков проводят следующим образом. Отмытые центрифугированием эритроциты барана суспендируют в физиологическом растворе, смешивают с гемолизином, разведенным физиологическим раствором. Компоненты выдерживают при 37°С. Эритроциты отмывают центрифугированием и ресуспендируют в исходном объеме физиологического раствора. Каплю суспензии сенсibilизированных эритроцитов смешивают с бактериальной массой стафилококков при помощи бактериологической петли на предметном стекле. За счет протеина «А» стафилококков происходит агглютинация эритроцитов, содержащих на своей поверхности JgG (гемолизин).

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</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+	d	+	+	-	Ч	Р
<i>S. aureus</i> subsp. <i>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

+ – 90% штаммов или более позитивные; ± – 90% штаммов или более слабо позитивные; d — 89% позитивные; — 90% или более штаммов отрицательные; () — замедленная реакция; *- штаммы от собак обычно образуют белый пигмент; Р — устойчивы; Ч — чувствительны (резистентность к новобиоцину — зона 16 мм и меньше; резистентность к полимиксину В — зона менее 10 мм).

Гемолизины. Гемолитическую активность исследуют посевом на кровяной агар. Гемолизины стафилококков отличаются биохимическими, антигенными свойствами и литической активностью по отношению к эритроцитам различных видов животных. Известны четыре типа гемолизинов стафилококков (табл. 4).

Конкретный штамм стафилококков может синтезировать один тип гемолизина или несколько в различных комбинациях. При тестировании гемолитической активности у штаммов, особенно от КРС, необходимо учитывать наличие β-гемолизина и целесообразность дополнительного выдерживания посевов после инкубирования также при 4-15° С.

S. aureus, *S. intermedius* могут синтезировать одновременно α - и β -гемолизин, что приводит к образованию двойной зоны гемолиза: вблизи колонии — типа α , далее — β .

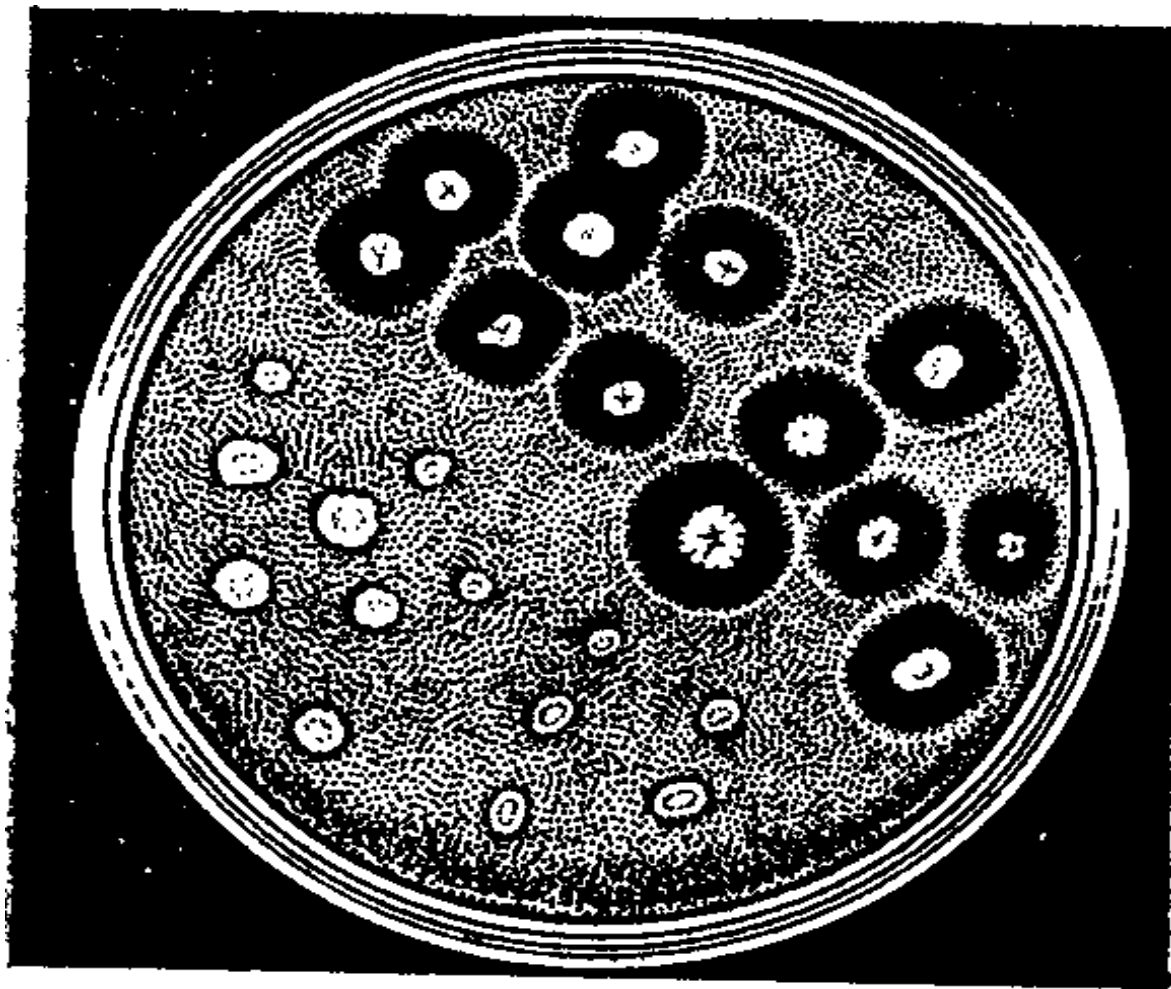
Таблица 4 - Спектр активности гемолизинов стафилококков

Тип гемолизина	Видовое происхождение эритроцитов	
	лизируются	не лизируются
1	2	3
Альфа-гемолизин (α). Характерен для штаммов, выделенных от людей. Зона лизиса узкая, лизис полный	Овца, кролик, КРС	Лошадь, куры, человек
Бета-гемолизин (β). Обнаруживают чаще у штаммов от КРС. Зона лизиса широкая, лизис после инкубирования при 37° С неполный, полный в результате дополнительного выдерживания посевов в течение 18 часов при 4–15° С	Овца, КРС	Кролик, лошадь, куры
Дельта-гемолизин (δ). Зона гемолиза узкая, четко ограниченная, гемолиз полный	Обладает широким спектром действия	Обладает широким спектром действия
Гамма-гемолизин (γ)	Овца, кролик, морская свинка, человек	

Гиалуронидаза (фактор проникновения). Обнаружение этого фермента у стафилококков практически наиболее легко осуществимо в тесте декапсуляции. Берут штаммы капсулообразующих видов бактерий, имеющих в составе капсулы гиалуроновую кислоту (субстрат для гиалуронидазы): *Str. equi*, *Pasterella multocida* (серовар А). На кровяной МПА в чашке Петри крестообразно засевают штрихом *Str. equi* или *P. multocida* (тип 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 положительный).

ДНК-аза. Нуклеаза обычно выявляется у *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*. Исследуемую культуру бактерий засевают на питательный агар с ДНК и культивируют при 37 °С 24 ч. Затем на

поверхность среды с бактериальной культурой наливают 1 н. раствор соляной кислоты. Положительный результат — при гидролизе ДНК вокруг выросшей культуры видна светлая зона.



ДНК-азная активность стафилококков

Биопроба. 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 антигенноразличных энтеротоксинов (А, В, С, D, Е, F).

Дермонекротическая проба. У кролика-альбиноса массой 2-2,5 кг за сутки до опыта на боку выстригают два участка размером 2x2 см. 24-часовую бульонную испытуемую культуру вводят внутривенно 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 котятках. Испытуемую культуру стафилококка засевают на среду для получения стафилококкового энтеротоксина. Культуру стафилококка выращивают на специальной питательной среде (пептон, хлорид кальция, хлорид магния, дигидрофосфат калия, 0,8 % агар-агара, рН 7,2), в атмосфере, содержащей 20 % оксида углерода в течение трех суток. Посевы инкубируют в эксикаторе с 20% CO₂, что достигается смешением на дне сосуда (емк. 2000 мл) 2 г двууглекислой соды с 17 мл 10%-ной серной кислоты, после чего крышку эксикатора сразу закрывают. Посевы инкубируют при 37° С 3 суток, ежедневно дополняя вышеописанным способом CO₂ в эксикаторе. На 4 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 котяткам. Положительный результат: через несколько минут котятка проявляют беспокойство, через 1-3 часа появляются симптомы гастроэнтерита: понос, рвота. Возможен летальный исход.

В специализированных лабораториях, при наличии соответствующих реактивов, энтеротоксин выявляют серологическими методами. Испытуемый штамм выращивают на подходящей среде, например сердечно-мозговом бульоне, и супернатант исследуют.

Серологически энтеротоксин обнаруживают в РДП или при помощи иммуноферментного метода. Возможно обнаружение токсинообразования следующим способом. К расплавленному и остуженному до 45°С МПА добавляют антитоксическую стафилококковую сыворотку (*S. aureus*) до содержания в 1 мл среды 14-15 АЕ. Агар разливают по чашкам Петри и засевают мелко изучаемую культуру для получения изолированных колоний. Посевы инкуби-

руют при 37° С 24-48 часов. Вокруг колоний токсигенных стафилококков формируются кольца преципитации.

Фаготипирование стафилококков. Проводят для обнаружения источника возбудителя и установления эпизоотологических (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 КРС, предложен свой набор фагов, состоящий из фаготипов 42 Д, 78, 102, 107, 117, 118, 119. Техника фаготипирования сводится к следующему. Исследуемую культуру выращивают на скошенном МПА при 37-38° С в течение 18-24 часов, пересевают в пробирку с 2,5 мл бульона Хоттингера, инкубируют при 37° С 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 необходимое количество квадратов и стандартной бактериологической петлей (d=2 мм) в каждый квадрат вносят тот или иной фаг в рабочем титре. Бактериологическую петлю после каждой манипуляции прожигают. Посевы инкубируют 5-6 часов при 37° С или 18-20 часов при 30° С. Штаммы, не лизированные набором фагов, проверяют повторно, используя более концентрированный фаг (x 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.

Штаммы стафилококков чаще лизируются несколькими фагами. В зависимости от спектра фагочувствительности стафилококк относят к какой-либо одной фагогруппе, например I, II и т. д., или к смешанной группе (I и III и т.д.).

Идентификация стафилококков с использованием СТАФИтеста 16

Набор СТАФИтест 16 предназначен для идентификации широкого ряда стафилококков и родственных грамположительных кокков (*Micrococcus*, *Stomatococcus* и др.).

Система представляет собой планшет, содержащий 6 двухрядных вертикальных стрипов с субстратами для определения 16 тестов: уреазы, аргинин, орнитин, бета-галактозидаза, бета-глюкуронидаза, нитраты, фосфатаза, пирролидонилариламидаза, эскулин, сахароза, трегалоза, маннитол, ксилоза, мальтоза, манноза, глюкоза/новобиоцин. Дополнительно к планшетным рекомендуются бумажные полоски для определения реакции Фогеса-Проскауэра (ВПтест) и определения цитохромоксидазы (ОКСИтест). Набор содержит 10 пластинок и позволяет провести идентификацию 60 культур.

Методика проведения исследования

Пластинки СТАФИтест 16 (один двухрядный стрип на каждую культуру), рамка с крышкой, физиологический раствор, парафиновое масло, диагностические полоски ВПтест и ОКСИтест, реактивы для тестов: фосфатаза, нитраты, ПИРАтест, Фогеса-Проскауэра (ацетоин), оксидаза, стандарт мутности второй степени по шкале McFarland.

Выделение культуры и приготовление бактериальной суспензии. Выделяют чистую культуру с кровяного агара. Окрашивают ее по Граму и проверяют каталазную активность. Для идентификации с помощью данной системы используют культуры грамположительных каталазоположительных кокков. Из чистой 24-часовой культуры готовят в физиологическом растворе бактериальную суспензию мутностью, соответствующей указанному выше стандарту.

Инокуляция и инкубация. Приготовленную суспензию инокулируют по 0,1 мл во все лунки стрипа, кроме лунки А второго ряда (глюкоза/новобиоцин), в которую вносят 0,1 мл разведенной суспензии. Для этого 0,1 мл исходной суспензии вносят в 2,6 мл физиологического раствора и тщательно гомогенизируют. После инокуляции в лунки Н, G и F (тесты уреазы, аргинин, орнитин) добавляют по две капли парафинового масла.

В пробирку с исходной суспензией (примерно 1 мл) помещают диагностическую полоску с ВПтестом. Инокулированную пластин-

ку инкубируют в течение 24 часов, а пробирку с ВПтестом в течение 1,5 часов при температуре 37 °С.

Учет результатов и идентификация

После 1,5 часов инкубации в пробирку с ВПтестом добавляют по три капли реактивов ВПТ1 и ВПТ2, встряхивают и помещают в термостат на 30-40 минут, после чего учитывают результат реакции. После 24 часов инкубации пластинки добавляют по одной капле реактива в следующие лунки первого ряда стрипа: лунка С - реактив на нитраты, лунка В - реактив на фосфатазу, лунка А - реактив РУР. Учитывают результаты всех тестов. При оценке СТАФИ-тест 16 ориентируются по таблице 17 «Интерпретация реакций», цветной шкале и/или цветовым реакциям контрольных штаммов. Для более четких положительных реакций тестов бета-галактозидаза и бета-глюкуронидаза в лунки Е и D первого ряда стрипа добавляют по 1 капле реактива на фосфатазу. Как дополнительный тест для группы *S. sciuri/lentus* и *S. caseolyticus* ставят ОКСИтест.

Примечание:

При нечеткой работе теста GLN (глюкоза/новобиоцин) для выяснения чувствительности испытуемых штаммов к новобиоцину на контрольные чашки с высевом бактериальных суспензий накладывают диагностические диски с этим антибиотиком.

Таблица 5 - Интерпретация реакций

Колонка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
Ряд 1-й				
Н	Уреаза	URE	Красно-фиолетовый, оранжево-красный	Желтый, бледно-оранжевый
G	Аргинин	ARG	Красно-фиолетовый, красный	Желтый, бледно-оранжевый
F	Орнитин	ORN	Красно-фиолетовый, красный	Желтый, бледно-оранжевый
E	Бета-галактозидаза	ONP	Желтый, бледно-желтый	Бесцветный
D	Бета-глюкуронидаза	GLR	Желтый, бледно-желтый	Бесцветный
C	Нитраты	NIT	Темно-красный, красный	Бесцветный, слабо-розовый
B	Фосфатаза	PHS	Красно-фиолетовый	Бесцветный, слабо-розовый

A	Пирролидо-ниламидаза	PYR	Красный, бледно-красный	Желтый, желто-оранжевый
Колонка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
Ряд 2-й				
H	Эскулин	ESL	Черный, темно-коричневый, темно-серый	Бесцветный, бледно-коричневый, бледно-серый
G	Сахароза	SUC	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
F	Трегалоза	TRE	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
E	Маннитол	MAN	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
D	Ксилоза	XYL	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
C	Мальтоза	MLT	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
B	Манноза	MNZ	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
A	Глюкоза/ ново-биоцин	GLN	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
Полоски				
	Тест на оксидазу	окси-тест	Синий	Бесцветный
	Ацетоин	ВПтест	Красный, розовый	Бесцветный

Примечание:

В лунки С с отрицательной реакцией на нитраты добавляют осторожно небольшое количество порошка цинка (приблизительно 5 мг) для подтверждения отрицательной реакции; при отрицательной реакции красный цвет появляется в течение 10 минут.

Чтение тестов бета-галактозидазы и бета-глюкуронидазы (ряд 1-й, лунки E и D) проводят на белом фоне.

Идентификацию проводят с помощью идентификационной таблицы или книги кодов для СТАФИтест 16. При окончательной идентификации учитывают всю дополнительную информацию (микроскопию, характер колоний, наличие пигмента, гемолиз и т. д.).

Питательные среды

Желточно-солевой агар Чистович. К МПА (рН 7,2-7,4) добавляют 10% натрия хлорида, к стерильному расплавленному агару с температурой 45- 50° С добавляют 20% желточной взвеси (1 желток куриного яйца на 150 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида), компоненты перемешивают, среду разливают в чашки Петри.

Молочно-солевой агар Петрович. К МПА (рН 7,2-7,4), содержащему 5-7,5% натрия хлорида, добавляют 10% стерильного обезжиренного молока, компоненты перемешивают и среду разливают в чашки Петри.

Среда для накопления стафилококкового энтеротоксина. К 1000 мл дистиллированной воды добавляют 20 г пептона, 1 г однозамещенного фосфата калия, 5 г натрия хлорида, 0,1 г кальция хлорида, 0,2 г магния хлорида, 0,8 г агара, устанавливают рН 7,0-7,2, кипятят до расплавления агара, разливают по флаконам, стерилизуют при 116° С в течение 20 минут.

Агар Baird - Parker (желточно-теллурит-глицин-пируватная среда). К 90 мл основной среды с температурой 45° С добавляют 6,3 мл глицинового раствора, 1 мл раствора теллурита натрия, 5 мл эмульсии желтка, компоненты перемешивают, разливают в чашки Петри. Среда пригодна к использованию в течение 28 дней (хранение при 4° С). Перед посевом на поверхность среды наносят 0,5 мл 20%-ного водного раствора пирувата натрия, стерилизованного фильтрацией, распределяют по поверхности, подсушивают. *Желточная эмульсия.* Свежее куриное яйцо выдерживают в 0,001 N растворе H_2SO_4 . Соблюдая правила асептики, отделяют желток и эмульгируют его в 200 мл физиологического раствора. *Глициновый раствор.* Глицин — 20 г, дистиллированная вода — 100 мл. Стерилизуют при 120° С в течение 15 минут. *Раствор теллурита натрия.* Теллурит натрия — 1 г, дистиллированной воды — 100 мл. Стерилизуют фильтрацией

Среда Чепмен. Пептон — 1%, Д-маннит — 1%, натрия хлорида — 7,5% дрожжевой экстракт — 0,25%, двузамещенный фосфорнокислый калий — 0,5%, агар-агар — 1,5%, устанавливают рН 7,0.

Среду стерилизуют при 110° С в течение 1,5 часов, добавляют 10% стерилизованного обезжиренного молока.

Фенилэтаноловый агар. Панкреатический гидролизат казеина — 15 г папаиновый гидролизат соевой муки — 5 г, NaCl — 5 г, фенилэтанол — 2,5 г, агар — 15 г, дистиллированная вода — 1000 мл, рН 7,3, стерилизуют автоклавированием 15 минут при 118° С.

Диагностика стрептококкозов и энтерококковой инфекции

Диагностика стрептококкозов проводится комплексно, учитывают эпизоотологические, данные, клинические признаки, патологоанатомические изменения и лабораторные исследования.

Ранее в род *Streptococcus* включали пиогенные стрептококки, энтерококки и молочнокислые стрептококки, которые в настоящее время отнесены соответственно в самостоятельные роды *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Lactococcus*. В данном разделе рассматриваются вопросы лабораторной диагностики болезней, вызываемых видами родов *Streptococcus* и *Enterococcus*.

Виды рода *Streptococcus* имеют клетки сферические или овальные, диаметром 0,5-2 мкм, при росте в жидкой питательной среде клетки парные или в виде цепочек. Клетки грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, иногда имеют капсулу. Факультативные анаэробы, каталазоотрицательные, растут в диапазоне температур 25-45° С.

Таблица 6 - Экология и патогенные свойства стрептококков

Вид стрептококка	Естественная среда обитания	Вызываемая патология
<i>S. pneumoniae</i> ¹	Верхние дыхательные пути	Септицемия, воспаление суставов, при подостром течении пневмония, воспаление кишечника у телят, ягнят, реже у поросят
<i>S. pyogenes</i>	Верхние дыхательные пути	Иногда маститы у коров, лимфангит жеребят
<i>S. equi</i> <i>sudsp. equi</i>	Миндалины лошадей	Лошади - маститы, мыт
<i>S. equi</i> <i>sudsp. equisimilis</i>	Вагина и кожа лошадей	Маститы, эндометриты лошадей
<i>S. equi</i> <i>zooepidemicus</i>	Слизистые и кожа свиноматок, овец, кур, вагина и кожа лошадей	Крупный рогатый скот - маститы и метриты; свиньи — септицемия и артриты у 1-3-недельных поросят; ягнята- пневмонии; птица — септицемия; лошади - аборт, маститы, пневмонии
<i>S. agalactiae</i>	Молочные каналы	Крупный рогатый скот, овцы, козы - маститы; собаки - септицемия щенков; кошки - маститы
<i>S. dysagalactiae</i>	Гениталии и носовая полость крупного рогатого скота, овец	Крупный рогатый скот - маститы, эндометриты; ягнята - полиартриты
<i>S. dysagalactiae</i> <i>equisimilis</i>	Вагина и кожа лошадей	Лошади - эндометриты, маститы
<i>S. porcinus</i>	Слизистые свиней	Свиньи - лимфадениты поросят
<i>S. suis</i> <i>mun</i>	Носовая полость, миндалины свиней	Свиньи — артриты, менингиты, септицемия молодняка
<i>S. uderis</i> ²	Миндалины, вагина, кожа крупного рогатого скота	Крупный рогатый скот — маститы
<i>S. canis</i>	Слизистые, генитальный тракт плотоядных	Плотоядные - септицемия новорожденных, поражения гениталиев, кожи
<i>S. bovis</i> , <i>S. equines</i> ²	Кишечный тракт многих видов животных	Возбудители оппортунистических инфекционных болезней

Примечание к таблице 6.¹⁾ *S. pneumoniae* относят к группе «Стрептококки ротовой полости». ²⁾ *S. uderis*, ² *S. bovis*, *S. equines*² отнесены к группе «Другие стрептококки». Все остальные стрептококки классифицируют как «Гноеродные стрептококки».

Виды рода *Enterococcus* сходны со стрептококками по вышеперечисленным признакам, но температурный диапазон составляет 10-45° С, могут расти при рН 9,6, концентрации NaС 16,5% и желчи 40%, обычно относятся к серологической группе «В».

Патогенные свойства и экология патогенных стрептококков представлены в табл. 6.

Энтерококки (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*) обитают в кишечном тракте многих видов животных, могут быть причиной оппортунистических инфекций и септицемии у кур, маститов коров, инфекций мочевого тракта у собак, эндокардитов у ягнят и крупного рогатого скота.

Лабораторная диагностика стрептококкозов основана на результатах бактериоскопического, бактериологического, биологического и серологического исследований.

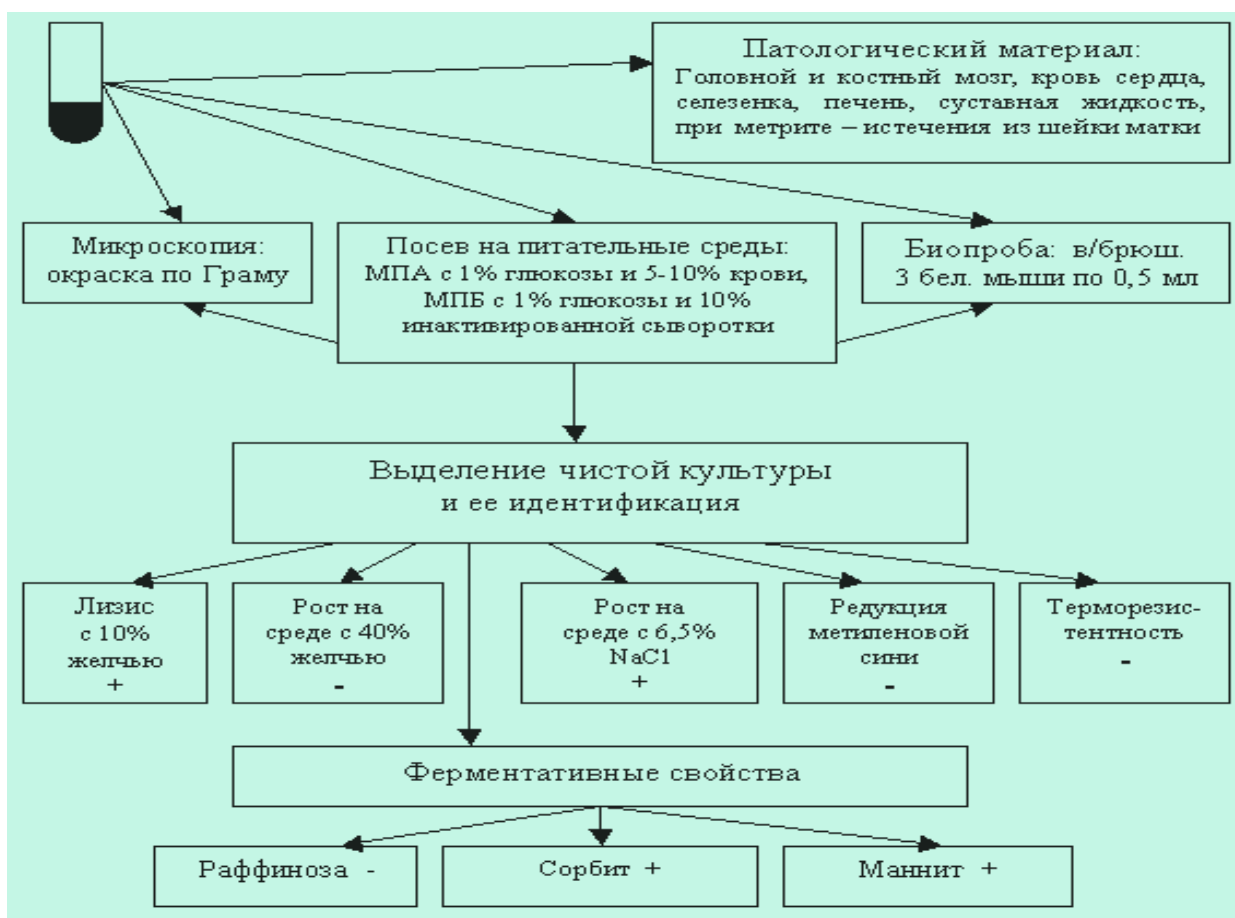


Схема лабораторной диагностики стрептококкозов

Бактериологическое исследование. Для исследования на стрептококкоз животных в лабораторию направляют кровь сердца, печень, селезенку, головной мозг и трубчатую кость. При пневмониях дополнительно берут кусочки легкого на границе здоровой и пораженной тканей, средостенные лимфатические узлы, при артритах - синовиальную жидкость. Трупы мелких животных доставляют

целиком. В случае маститов направляют секрет пораженной доли вымени, эндометритов — содержимое влагалища, взятое при помощи стерильных тампонов.

Учитывая малую устойчивость возбудителя материал должен быть доставлен не позднее 6 часов после гибели или уоя животного при условии транспортировки его в термосе со льдом (4-6°C). При более высокой температуре срок доставки материала не должен превышать 2-3 часа.

Микроскопическое исследование исходного материала. Готовят мазки, окрашивают по Граму, при подозрении на наличие капсулообразующих стрептококков препараты окрашивают на капсулы по Романовскому-Гимза, Ольту и др. Мазки из молока можно окрашивать по Граму, используя методы, нивелирующие присутствие жира и белка.

Клетки *S. pneumoniae* в окрашенных препаратах овальные или сферические, размером 0,5-1,25 мкм, обычно парные, причем соприкасающиеся стороны клеток уплощены, а наружные вытянуты и заострены (ланцетовидный диплококк). Также клетки могут располагаться одиночно, короткими цепочками, окружены капсулой.

Клетки *S. equi* сферической или овальной формы, размером 0,6-1,0 мкм, располагаются одиночно, парами, короткими цепочками, в мазках из гноя в виде длинных цепочек, имеют капсулу.

Клетки *S. agalactiae* (*S. dysagalactiae*) сферические, размером 0,6-1,2 мкм, чаще располагаются в виде коротких или средней длины цепочек.

Клетки *S. pyogenes* сферические, размером 0,5-1,0 мкм, в виде коротких или длинных цепочек (в бульоне длинные цепочки). Энтерококки имеют овальную форму, размер 0,6-2,0x0,6-2,5 мкм, располагаются парами или короткими цепочками.

Результаты микроскопического исследования, с учетом полиморфизма бактерий на фоне лекарственной терапии, имеют ориентировочное диагностическое значение.



S. equi в мазках из патматериала

Выделение и идентификация культур стрептококков

Культивирование. Стрептококки - факультативные анаэробы. Исследуемый материал высевают на кровяной, глюкозо-кровоной агар (кровь барана или крупного рогатого скота), глюкозо-сывороточный МПБ (рН 7,4-7,8). Контаминированный материал засевают на селективные среды: агар с антибиотиками, азидом натрия; образцы молока целесообразно высевать на среду Эдварда для выявления гемолиза и гидролиза эскулина.

Для обнаружения энтерококков используют специальные селективные среды: молочно-полимиксиновая среда Калины, желчно-кровоной агар Беленького и др. Посевы инкубируют при 37-38° С в течение 24-48 часов.

Характер роста стрептококков на питательных средах. На глюкозо-кровоном агаре стрептококки в основном растут в виде мелких, прозрачных или слегка мутноватых колоний с ровными краями, как правило окруженных зоной гемолиза. Различают α - и β -гемолитические стрептококки.

Гемолиз типа α -: неполный гемолиз, часто с зеленоватым оттенком за счет перехода гемоглобина в метгемоглобин, далее обычно находится узкая зона β -гемолиза.

β -гемолиз - полный гемолиз эритроцитов. Отсутствие разрушения эритроцитов и гемоглобина обозначают как γ -гемолиз. Гемолитическая активность различных видов стрептококков представлена в табл. 7.

Признак	Вид стрептококка	
Тип гемолиза	β	<i>S.pyogenes</i> , <i>S.agalactiae</i> , <i>S.equi</i> subsp. <i>equi</i> , <i>S.equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , <i>S.porcinus</i> , <i>S.canis</i>
	α	<i>S.dysagalactiae</i> , <i>S.dysagalactiae</i> subsp. <i>equisimillis</i> , <i>S.equinus</i> , <i>S.bovis</i> , <i>S.suis</i> , <i>S.pneumoniae</i>
Серогрупповая принадлежность по Лансфилд	A	<i>S.pyogenes</i>
	B	<i>S.agalactiae</i>
	C	<i>S.dysagalactiae</i> , <i>S.equi</i> (все подвиды)
	D	<i>S.suis</i> (м.б. R или S), <i>S.bovis</i> , <i>S.equinus</i> , энтерококки
	G	<i>S.canis</i>
	E	<i>S.porcinus</i> , иногда <i>S.uberis</i>
	R	<i>S.suis</i> (м.б. D или S)
	S	<i>S.suis</i> (м.б. R или S)
	P	<i>S.porcinus</i>
	U	<i>S.porcinus</i>
	V	<i>S.porcinus</i>
нет	<i>S.pneumoniae</i>	

Таблица 7 – Дифференциация стрептококков по типу гемолиза и серогрупповой принадлежности

S. pneumoniae на глюкозо-кровяном агаре образует круглые диаметром 0,5-1,5 мкм, полупрозрачные, плоские, с приподнятым центром и краями колонии. Если культивирование проводится в аэробных условиях, обязателен α -гемолиз с зеленоватым оттенком, при анаэробной инкубации — β -гемолиз. По внешнему виду колонии похожи на колонии других зеленеющих стрептококков. Могут встречаться мукоидные колонии — более крупные, с блестящей поверхностью, слизистой консистенции. В сывороточно-глюкозном бульоне растет с равномерным помутнением среды, с образованием пылевидного осадка.

S. equi на кровяном агаре образует мелкие, слизистые, росинчатые колонии с зоной β -гемолиза, которые при дальнейшей инкубации становятся серо-белыми, непрозрачными. В жидкой питательной среде растет с ее помутнением.



Патогенные стрептококки на глюкозо-кровяном МПА

S. agalactiae на кровяном МПА образует мелкие, сероватые, просвечивающиеся колонии с зоной β - или двойной α -гемолиза, часть штаммов не выделяет гемолизин. Для выявления скрытой гемолитической активности применяют САМР-тест. В сывороточно-глюкозном МПБ при росте возбудителя среда остается прозрачной, а формирующие крупинки оседают на дно пробирки. *S. dysagalactiae* на кровяном агаре образует широкую зону α -гемолиза.

На глюкозо-кровяном МПА колонии с зоной гемолиза



S. pyogenes на кровяном агаре формирует β -гемолитические колонии трех типов: крупные, блестящие, вязкие, в виде капли воды — характерны для свежевыделенных капсулообразующих штаммов; серые, матовые, зернистые, с неровным краем — характерны для вирулентных штаммов, имеющих М-протеин; мелкие (0,1-0,3 мм), выпуклые, прозрачные — обычны для авирулентных лабораторных штаммов. На сывороточно-глюкозном бульоне растет с просветлением среды и выпадением зернистого осадка.

S. uberis на кровяном агаре формирует колонии с зоной β -гемолиза или не дает гемолиз, на оптимальной жидкой питательной среде растет с ее равномерным помутнением.

S. equi subsp. zooepidemicus на кровяном агаре образует мелкие колонии с зоной β -гемолиза, неотличимые от колоний *S. pyogenes*. При посеве материала на среду Эдварда можно установить тип гемолиза стрептококка и способность гидролизовать эскулин. *S. agalactiae* и *S. dysagalactiae* не гидролизуют эскулин, поэтому формируют бесцветные колонии. Колонии гидролизующих эскулин

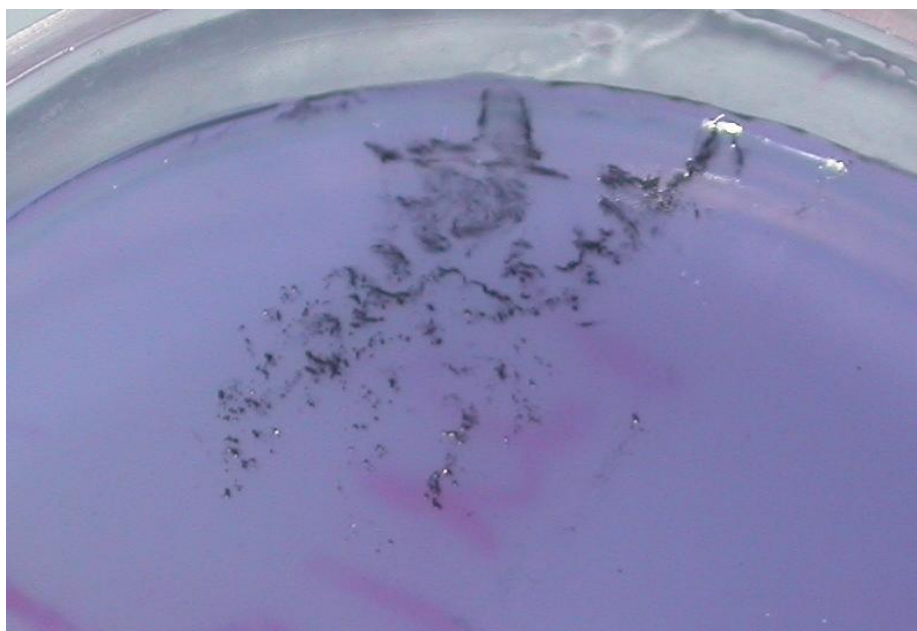
стрептококков (*S. porcinus*, *S. bovis*, *E. faecalis*, *E. avium* и др.) имеют темный цвет.

Использование специальных дифференциально-диагностических сред для выделения энтерококков позволяет подавить рост сопутствующей микрофлоры и ориентироваться при отборе необходимых колоний. На молочном МПА с полимиксином колонии энтерококков округлой формы, с ровными краями, блестящей поверхностью, диаметром 1,5-2 мм, с красноватым оттенком и зоной протеолиза на светло-голубом фоне.

На желчно-цитратном агаре энтерококки образуют колонии розово-красного цвета.

На теллуритовой среде *E. faecalis* растет с образованием колоний черного цвета, *E. faecium* на данной среде не растет.

Стрептококки на дифференциальной среде



Для определения скрытой гемолитической способности стрептококков ставят САМР-тест, который обычно используют для идентификации стрептококков серологической группы В (*S. agalactiae*). На кровяной агар бактериологической петлей по диаметру чашки Петри в виде полоски засевают культуру гемолитического штамма *S. aureus*, дающего широкую зону неполного гемолиза. Отступив на 1-1,5 мм, перпендикулярно к штриху стафилококка высевая культуры испытуемых стрептококков в виде горизон-

тальных полосок (3-4 штамма). САМР-положительные штаммы выделяют диффундирующие метаболиты, которые полностью лизируют клетки эритроцитов в зоне штриха стрептококка, прилегающей к культуре стафилококка, что оценивают как положительный результат. САМР-тест специфичен не только для *S. agalactiae* этот феномен и может быть обнаружен у стрептококков серогрупп и, Е, Р, К, V, G, F.

На МПА мелкие колонии



Идентификация стрептококков и энтерококков на уровне родов. При обнаружении в посевах колоний, сходных с колониями стрептококков, исследуют морфологию и тинкториальные свойства клеток в мазках, окрашенных по Граму. С целью дифференциации от морфологически сходных микрококков и стафилококков проверяют каталазную и оксидазную активность бактерий из подозрительных колоний. Для дальнейшей работы отбирают колонии каталазо- и оксидазоотрицательных культур, отвивают их на оптимальные питательные среды (глюкозо-сывороточный МПБ, кровяной МПА) и подвергают изучению.

С целью дифференциации видов рода *Streptococcus* и *Enterococcus* испытуемые культуры засевают в глюкозо-сывороточный бульон с 40% желчи крупного рогатого скота, 6,5% натрия хлорида, с рН 9,6, а также на бульон обычного состава. Параллельно произво-

дят посев на среду Эдварда для выявления гидролиза эскулина. Посевы культивируют при 37-38° С в течение 24 часов, посевы на обычном бульоне выращивают при 45° С. Считается, что для энтерококков и стрептококков серологической группы D характерны рост при 45° С, устойчивость к 40% желчи и гидролиз эскулина, но есть некоторые исключения.

На среде с рН 9,6 растут все энтерококки, из стрептококков только многие штаммы *S. bovis* (D).

При 45° С растут все виды энтерококков, не размножаются гноеродные стрептококки, но могут расти стрептококки группы D.

Среда с 40% желчи. Кроме энтерококков на ней могут расти *S. bovis*, *S. porcinus*, *S. suis*, а также *S. agalactiae* и *S. equinus* (до 90% штаммов) и многие стрептококки ротовой полости.

Среда с 6,5% натрия хлорида. Растут энтерококки. Могут расти до 90% штаммов *S. agalactiae*, *S. porcinus*, из стрептококков ротовой полости — *S. cricetum*, *S. sorbinus*, среди группы «Другие стрептококки» — *S. alactolyticus*.

Принимая во внимание указанные исключения, характер роста на питательных средах и происхождение исследуемого материала, можно с достаточной уверенностью по совокупности признаков отнести выделенные культуры к стрептококкам или энтерококкам.

Идентификация стрептококков и энтерококков на уровне видов и серологических групп. После дифференциации стрептококков от стафилококков и микрококков и деления на группы стрептококки, энтерококки (плюс стрептококки серологической группы D) приступают к их видовой и серогрупповой идентификации.

Видовую идентификацию стрептококков и энтерококков проводят путем изучения ферментативных характеристик (гидролиз эскулина, гиппрата, расщепление инулина, маннита, раффинозы, салицина, сорбита, лактозы, трегалозы, реакция Фогес—Проскауера), особенностей гемолитической активности (α -, β -гемолиз, САМР-тест), способности к росту на средах с 6,5% натрия хлорида. При этом может быть использован набор тестов, позволяющий дифференцировать основные патогенные виды стреп-

тококков и энтерококков, выделяемых от животных (табл. 8). Либо с учетом видового происхождения материала используют меньшее количество признаков, что дает возможность идентифицировать основные виды стрептококков, выделяемые от данного вида животных.

Таблица 8 - Свойства стрептококков и энтерококков, выделяемых от животных

Вид стрептококка	Серологическая группа	Признаки									
		Образование кислоты							Гидролиз		Рост в средах с 6,5% NaCl
		инулин	лактоза	маннит	раффиноза	салицин	сорбит	трегалоза	эскулин	гишурата	
<i>S. pyogenes</i>	A	-	+	V	-	+	-	+	-	-	-
<i>S. agalactiae</i>	B	-	+	-	-	(+)	-	+	-	+	-
<i>S. dysagalactiae</i>	C	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. dysagalactiae</i> subsp. <i>equisiniillus</i>	C	-	V	-	-	(+)	-	+	-	-	-
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	C	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i>	-	+	+	-	+	V	-	+	(+)	-	-
<i>S. suis</i> mun 1	D(R)	(+)	+	-	(+)	+	-	+	+	-	-
<i>S. suis</i> mun 2	D(S)	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	(+)
<i>S. bovis</i>	D	+	+	+	+	+	-	V	+	-	-
<i>S. quinus</i>	D	+	-	V	+	(+)	-	V	+	-	-
<i>S. porcinus</i>	E (P, U, V)	-	(+)	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>S. canis</i>	G	-	(+)	-	-	+	-	(+)	V	-	-
<i>E. faecalis</i>	D	-	+	+	-	+	+	+	+	V	+
<i>E. avium</i>	Q	-	+	+	-	+	+	+	+	V	(+)

В таблицах 8, 9, 10 представлены критерии дифференциации основных видов патогенных стрептококков, выделяемых от лошадей, крупного рогатого скота, свиней.

Таблица 9 - Дифференциация основных видов стрептококков, выделяемых от крупного рогатого скота

Вид стрептококка	Признаки						Серологическая группа по Лансфилд
	Тип гемолиза	САМР-тест	Гидролиз		Образование кислоты из		
			эскулина	гиппурата	сорбита	маннита	
<i>S. agalactiae</i>	β	+	-	+	-	-	B
<i>S. dysgalactiae</i>	α	-	-	-	-	-	C
<i>S. pneumoniae</i>	α	-	(+)	-	-	-	-
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	β	-	-	-	+	-	C

Таблица 10 - Дифференциация основных видов стрептококков, выделяемых от свиней

Вид стрептококка	Признаки					Серологическая группа по Лансфилд
	Тип гемолиза	Образование кислоты из				
		иннулина	маннита	сорбита	салицина	
<i>S. porcinus</i>	β (+)	-	+	+	+	E, P, U, V
<i>S. suis</i>	β (a)	+	-	-	+	D, R, S
<i>S. pneumoniae</i>	α	d	(-)	-	-	Нет
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	β	-	-	+	+	C

Таблица 11 - Дифференциация стрептококков, выделяемых от лошадей

Вид стрептококка	Признаки				Серологическая группа по Ланфилд
	Тип гемолиза	Образование кислоты из			
		лактозы	сорбита	трегалозы	
<i>S. equi subsp. equi</i>	β	-	-	-	C
<i>S. equi subsp. equisimillis</i>	β		-	+	C
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	β	-	+	-	C

Таблица 12 - Дифференциация энтерококков

Признак	<i>E. avium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. seecorum</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>
Рост при 45° С	+	+	+		+	+	+	+	+
Рост в присутствии 6,5% NaCl	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Тип гемолизина	α	н.д	α	н.	α, β	(β)	(α)	α, β	-
Образование H ₂ S	+	-	н.д	+	-	н.д	н.д	-	н.д
Гидролиз гиппурата	d	-	-	d	d	(+)	+	+	-
Образование кислоты из	Рамнозы	+	(+)	-	н.	-	d	-	-
	Сахарозы	+	+	+	+	-	+	d	+
	Рафинозы	-	+	+	+	-	-	-	+
	Сорбита	+	-	-	-	-	(+)	-	-
	Маннита	+	+	-	-	(-)	+	(+)	+

При идентификации *S. pneumoniae*, помимо критериев, изложенных в таблице 8, определяют чувствительность к лизису клеток стрептококка желчью (желчными кислотами) и чувствительность к оптохину.

Для проверки на желчеустойчивость 2-3 мл исследуемой культуры, выращенной на сывороточном бульоне, засевают в 5 мл 10%-ного желчного бульона. Среда становится мутной и ее помещают на час в термостат.

Клетки *S. pneumoniae* растворяются, среда становится прозрачной, зелеными стрептококки, сходные по типу колоний и гемолиза, не растворяются в желчи. При получении нечетких результатов пробирки оставляют при комнатной температуре на 18-20 часов и затем производят окончательный учет. Можно просто положить крупинку сухой желчи на исследуемую колонию. Колонии *S. pneumoniae* растворяются и исчезают. При наличии натрия таурохолат смешивают равные объемы 10%-ного раствора соли и бульонной культуры, клетки пневмококков растворяются, и смесь становится прозрачной через 10-15 минут.

Чувствительность *S. pneumoniae* к оптохину (этилгидрокупреин HC1) используют для дифференциации от других зеленящих стрептококков. Для этого применяют коммерческие бумажные диски с оптохипом. Испытуемую культуру засевают на кровяной агар, помещают на поверхность среды диски с оптохипом и культивируют 24 часа при 37° С. Как положительный результат расценивают задержку роста от 14 мм и более (при диске 6 мм), что характерно для *S. pneumoniae*. При отсутствии таких дисков может быть использован следующий метод: исследуемую культуру засевают на глюкозо-кровоной агар с оптохином (1:50 000), инкубируют при 37-38° С в течение 20-24 часов. *S. pneumoniae* на этой среде не растет.

Для видовой дифференциации энтерококков используют тесты, представленные в таблице 12, а также тест-систему EN-coccus test.

Серологическая идентификация стрептококков и энтерококков. В клеточной стенке многих стрептококков присутствует термостабильный полисахаридный антиген «С». В соответствии с его антигенными вариантами по системе Лансфилд стрептококки в РП подразделяют на серологические группы, которые обозначают заглавными буквами латинского алфавита.

Известно более 20 серологических групп стрептококков. Серологическая принадлежность патогенных для животных стрептококков представлена в таблице 6. Некоторые виды стрептококков (*S. pneumoniae* и др.) не содержат С-полисахарид и не могут быть классифицированы по системе Лансфилд. Иммунные серогрупповые стрептококковые сыворотки производит и высылает по заявкам ВГНКИ ветпрепаратов. За рубежом для этих целей имеются коммерческие препараты, позволяющие устанавливать серогрупповую принадлежность в пределах серогрупп А, В, С, D, F и G в тесте латекс-агглютинации или серогрупп А, В, С, F и G в реакции коаггутинации на стекле, ИФА, а также выявлять антигены непосредственно в материале.

Определение серогрупповой принадлежности испытуемой культуры стрептококка в реакции преципитации проводят следующим образом. Стрептококки выращивают в бульоне Хоттингера с 1% глюкозы при 37° С в течение 20 часов. В стеклянные центрифужные пробирки переносят 9 мл выращенной культуры, центрифугируют при 4000 об/мин. 25 минут. Над осадочную жидкость удаляют, к осадку добавляют 0,3-0,4 мм 0,2 N HCl, суспендируют и выдерживают смесь в кипящей водяной бане 10 минут.

Затем пробирки охлаждают водой, добавляют в каждую пробирку каплю 0,04%-ного спиртового раствора фенолфталеина и затем по каплям добавляют 0,2 N раствор NaOH до приобретения раствором бледно-розовой окраски (кислота нейтрализована). Далее смесь вновь центрифугируют (4000 об/мин., 25 минут), над осадочную жидкость используют как растворимый антиген в РП.

Техника постановки реакции преципитации. Берут от пастеровских пипеток капилляры диаметром 0,5-1,0 мм, опускают капилляр концом в флакон с сывороткой и набирают в него сыворотку на длину капилляра 1-1,5 см. Удаляют избыток сыворотки с кончика капилляра, погружают его в пробирку с антигеном и набирают равное количество антигена. Капилляр переворачивают таким образом, чтобы смесь оказалась в середине капилляра, и закрепляют его вертикально в куске пластилина. Через 5 минут учитывают результат.

Положительная реакция: образование хлопьев или резкое помутнение в середине столбика.

Биопроба. Используют для определения патогенных свойств культур стрептококков, а также для их выделения из контаминированного материала.

Определение патогенности стрептококков проводят на трех белых мышах массой 14-16 г. Для заражения используют только свежесъединенные 18-20-часовые культуры стрептококков, выращенные на глюкозо-сывороточном бульоне. Культуру в объеме 0,5 мл вводят внутрибрюшинно. Наблюдение ведут в течение 5 суток, при заражении патогенной культурой мыши погибают в течение 1-2 суток. Из органов павших животных готовят мазки, окрашивают по Граму, на капсулы, микроскопируют. Параллельно производят посевы на глюкозо-красный агар и глюкозо-сывороточный бульон.

В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике стрептококков» при диагностике мыта (*S. equisubsp. equi*) рекомендуется исследуемым материалом (гной, истечение из носовой полости, суспензия из лимфатических узлов и органов) заражать подкожно в область спины двух белых мышей массой 12-15 граммов в дозе 0,1 мл (гной) или 0,5 мл (суспензия тканей). Для выяснения патогенных свойств выделенную бульонную культуру вводят аналогичным способом в объеме 0,1 мл. Наблюдение за животными ведут в течение 10 дней, гибель в положительных случаях наблюдают на 2-7 сутки. Органы и ткани от погибших животных подвергают микроскопическому исследованию и делают высевы на питательные среды. Как положительный результат оценивают гибель хотя бы одной мышки. Для ускоренного выделения

S. pneumoniae из контаминированного материала можно заражать двух белых мышей исходным материалом — 0,5 мл взвеси в бульоне. Далее через 6-8 часов из брюшной полости берут стерильным шприцом 1-2 капли жидкости и делают дробный высеv на глюкозо-красный агар в чашках либо животное убивают в эти же сроки. Посев делают из крови сердца. Из селезенки готовят и микроскопируют мазки-отпечатки.

Идентификация стрептококков и энтерококков на базе планшетных фотометров фирмы «ТЕРМО-Labsystems», «iEMS-Reader» и «Multican-Ascent»

Для идентификации каталазоотрицательных грамположительных кокков фирма «ПЛИВА-Лахема» выпускает две тест-системы: СТРЕПТОтест 16 - для идентификации стрептококков и ЭНКОККУСтест - для идентификации энтерококков. Для дифференциации этих микроорганизмов используют ПИРАтест - положительный практически у всех клинически значимых энтерококков (из стрептококков этот тест положителен только у *S. pyogenes*).

Идентификация стрептококков с использованием СТРЕПТОтеста 16

СТРЕПТОтест 16 предназначен для определения биохимической активности и идентификации стрептококков по 16 планшетным биохимическим тестам, расположенным в двухрядном вертикальном стрипе: гиппурат, фосфатаза, лейцинаминопептидаза, бета-глюкуронидаза, альфа-галактозидаза, эскулин, аргинин, уреазы, маннитол, сорбитол, трегалоза, лактоза, раффиноза, инулин, мелибиоза и рибоза. Идентификацию дополняют тестами на диагностических полосках: ПИРАтест для выявления пирролидонилариламидазы и ВПтест для выявления образования ацетона. Набор содержит 10 пластинок и позволяет провести идентификацию 60 культур.

Методика проведения исследования

Пластинки СТРЕПТОтест 16 (один двухрядный стрип на одну культуру), рамка пластинки с крышкой, суспензионная среда для СТРЕПТОтест 16, физиологический раствор, парафиновое масло, реактивы для тестов гиппурат, фосфатаза, диагностические полоски ПИРАтест и ВПтест (ацетоны), реактивы к тестам ПИР и ацетонин, стандарт мутности третьей степени по шкале McFarland.

Выделение чистой культуры и приготовление бактериальной суспензии. Выделяют чистую культуру на кровяном агаре (с кровью барана). Инкубацию чашек производят в атмосфере с содержанием 5% CO₂. Учитывают морфологию культуры, проверяют каталазную активность на предметном стекле с 3% перекисью водорода, гемолитическую активность на кровяном агаре, ставят ПИРАтест. Из чистой 24-часовой культуры стрептококков готовят в физиологическом растворе бактериальную суспензию мутностью, соответствующей указанной выше. Для приготовления суспензии

удобно использовать ватные тампоны для снятия колоний с питательной среды.

Инокуляция и инкубация

Подготовленную суспензию после тщательного встряхивания инокулируют по 0,1 мл во все 8 лунок первого ряда стрипа (лунки Н-А, тесты с НІР по URE). В ампулу с 1 мл суспензионной среды добавляют 1 мл исходной суспензии, встряхивают и инокулируют разведенную суспензию в 8 лунок второго ряда стрипа (лунки Н-А, тесты с MAN по RIB). После инокуляции в лунки В и А первого ряда (тесты ARG и URE) добавляют по две капли парафинового масла. В пробирку с исходной суспензией (объем 1 мл) помещают полоску с ВПтестом. Пластинку СТРЕПТОтест 16 и пробирку с ВПтестом инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 и 2 часов соответственно.

Учет результатов и идентификация

После 2 часов инкубации в пробирку с ВПтестом добавляют по три капли реактивов ВПТ1 и ВПТ2, пробирку встряхивают и дополнительно инкубируют при 37 °С в течение 30-40 минут, после чего учитывают результат ВПреакции.

После 24 часов инкубации добавляют реактивы в следующие лунки пластинки: ряд 1-й, лунка Н (тест гиппурат) - две капли реактива на гиппурат; лунка G (тест фосфатаза) - одну каплю реактива на фосфатазу. Инкубируют пластинку 5-10 минут при комнатной температуре для лучшего проявления цветовых реакций и учитывают результаты всех тестов. Тест НІР учитывают не позднее 10 минут после добавления реактива, так как по истечении этого времени могут проявиться ложноположительные реакции. Чтение тестов LAP, GLR и GAL проводят на белом фоне.

При оценке СТРЕПТОтеста 16 ориентируются по таблице «Интерпретация реакций», цветной шкале сравнения и/или цветным реакциям контрольных штаммов.

Таблица 13 - Интерпретация реакций

Колон-ка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
Ряд 1-й				
Н	Гиппурат	НIP	Синяя	Бесцветная, голубоватая
G	Фосфатаза	PHS	Красно-фиолетовая	Бесцветная, розоватая
F	Лейцинамино-пептидаза	LAP	Желтая	Бесцветный
E	Бета-глюкуронидаза	GLR	Желтая	Бесцветная
D	Альфа-галактозидаза	aGA	Желтая	Бесцветная
C	Эскулин	ESL	Черная, темно-коричневая	Бесцветная, светло-коричневая
B	Аргинин	ARG	Красно-фиолетовая, красная	Желтая, светло-оранжевая
Колон-ка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
A	Уреаза	URE	Красная, красно-оранжевая	Желтая, светло-оранжевая
Ряд 2-й				
Н	Маннитол	MAN	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
C	Сорбитол	SOR	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
P	Трегалоza	TRE	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
E	Лактоза	LAC	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
V	Раффиноза	RAF	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
C	Инулин	INU	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
B	Мелибиоза	MLB	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
A	Рибоза	RIB	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная

Идентификацию проводят с помощью идентификационной таблицы или книги кодов для СТРЕПТОтеста 16.

При окончательной идентификации следует учитывать всю дополнительную информацию (микроскопию, характер колоний, наличие пигмента, гемолиз, источник выделения и т. д.).

Идентификация энтерококков с использованием ЭН-КОККУСтеста

Идентификацию энтерококков производят с использованием микротест-системы ЭН-КОККУСтест, позволяющей идентифицировать клинически значимые виды рода энтерококков при помощи восьми биохимических тестов: аргинин, сорбоза, арабиноза, маннитол, сорбитол, мелибиоза, раффиноза и мелецитоза, размещенных в однорядном восьмилучном стрипе. Для выявления типичного для рода энтерококков теста - активности пирролидонилариламидазы - предназначен ПИРАтест, поставляемый в форме диагностической полоски.

Методика проведения исследования

Пластинка ЭН-КОККУСтест, рамка пластинки с крышкой, физиологический раствор, парафиновое масло, диагностические полоски и реактив для теста ПИР, стандарт мутности второй степени по шкале McFarland.

Выделение культуры и приготовление бактериальной суспензии. Для идентификации используют чистую культуру, выращенную на кровяном агаре с кровью барана. Для первичной изоляции энтерококков из смешанных культур используют селективные среды. Учитывают морфологию, ставят ПИРАтест для подтверждения принадлежности испытуемого изолята к роду энтерококков. Из чистой 24-часовой культуры энтерококков готовят в физиологическом растворе бактериальную суспензию плотностью, соответствующей указанному выше стандарту мутности.

Инокуляция и инкубация

После тщательного встряхивания подготовленную суспензию инокулируют по 0,1 мл во все лунки стрипа, помещенного в рамку пластинки. После инокуляции в лунку Н (тест аргинин) добавляют две капли парафинового масла. Рамку с инокулированными стрипами инкубируют в течение 24 часов при температуре 37 °С.

Учет результатов и идентификация

По окончании инкубации учитывают результаты всех тестов, используя при этом таблицу «Интерпретация реакций», цветную шкалу сравнения и/или цветные реакции контрольных штаммов.

Таблица 14 - Интерпретация реакций

Ко-лонка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
H	Аргинин	ARG	Красно-фиолетовая, красная	Желтая, светло-оранжевая
G	Сорбоза	SOE	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
F	Арабиноза	ARA	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
Ко-лонка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
E	Маннитол	MAN	Желтая, светло-оранжевый	Красная, оранжево-красная
D	Сорбитол	SOR	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
C	Мелибиоза	MLB	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
B	Раффиноза	RAF	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
A	Меллицитоза	MLZ	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная

Идентификацию проводят с помощью идентификационной таблицы или индекса, находящихся в инструкции к тест-системе. При окончательной идентификации учитывают всю дополнительную информацию (источник выделения, характер колоний, наличие пигмента, подвижность и т. д.).

Питательные среды

Глюкозо-сывороточный бульон. К свежему стерильному МПБ (рН 7,4-7,6) добавляют 10% стерильной инактивированной при 56° С в течение 30 минут сывотки крови лошади.

Глюкозо-кровяной агар. К расплавленному МПА с температурой 42-45°С добавляют до 1 %-ный стерильный раствор глюкозы и 5-10% дефибрированной крови барана или кролика. Среду разливают в чашки Петри.

Желчный бульон. К МПБ добавляют необходимое количество нативной желчи крупного рогатого скота (10-40%), устанавливают необходимый рН (7,4-7,6), разливают по пробиркам и стерилизуют при 113-115° С в течение 20-30 минут.

Среда Эдварда. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 10 г сухого мясного экстракта, 1 г эскулина, 5 г натрия хлорида, 0,0013 г кристалвиолета, 0,33 г талия сульфата, 15 г агар-агара; устанавливают рН 7,4; стерилизуют при 115°С 20 минут. К охлажденному до 45°С агару добавляют 5% стерильной крови барана, перемешивают и разливают среду в чашки Петри.

Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда. К 1000 мл расплавленного МПА (45-50°С) добавляют 0,1 ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолий хлорид), 12,5 мл 0,01%-ного водного раствора кристалвиолета, 0,1 г налидиксовой кислоты, 20% обезжиренного молока, 1% глюкозы, 5% стерильной дефибринированной крови. Компоненты перемешивают и разливают по чашкам Петри. ТТХ и налидиксовую кислоту предварительно растворяют в небольшом количестве МПБ.

Желтю-цитратная среда для энтерококков. К 100 мл МПА добавляют 20 мл дрожжевого автолизата, 100 мл желчи, 40 г цитрата натрия. Смесь кипятят на водяной бане, добавляют 0,1 г трифенилтетразолия хлористого и 200 ЕД/мл нолимиксина М. Колонии энтерококков на этой среде розово-красного цвета.

Желчно-кровяной агар Беленького для энтерококков. К 600 мл 3%-ного расплавленного МПА добавляют 400 мл нативной профильтрованной желчи. Стерилизуют при 115° С 30 минут. К охлажденному до 45° С агару добавляют 5% дефибринировавшей крови и разливают по чашкам Петри. На среде растут энтерококки, но не растут гноеродные и оральные стрептококки.

Молочная среда с полимиксином по Калине (для энтерококков). К 85 мл расплавленного МПА (45°С) добавляют 1,25 мл 0,01%-ного водного раствора кристалвиолета, 0,5 мл 10%-ного водного раствора 2, 3, 5-ТТХ, 15 мл стерильного обезжиренного молока, 20-40 ЕД/мл нолимиксина М. Среда, разлитая в чашки Петри, пригодна для использования в течение 7-10 дней при условии хранения в холодильнике (4° С). Колонии энтерококков имеют красноватую окраску с зоной протеолиза.

Щелочно-полимиксиновая среда Калины (для энтерококков). Готовят отдельно три раствора. *Раствор 1:* 23 мл МПБ, 1 г глюко-

зы, 0,5 г натрия хлорида, 2 г дрожжевого экстракта. *Раствор 2*: 25 мл дистиллированной воды, 0,53 г Na_2CO_3 . *Раствор 3*: 25 мл дистиллированной воды, 0,25 г двухосновного фосфата калия.

Смеси стерилизуют отдельно при 112°C 12 минут, затем смешивают, устанавливают рН 10-10,2, добавляют воды до 100 мл, 1,6% спиртового раствора бромтимолового синего, 200 ЕД/мл полимиксина М.

Кровяной агар с азидом натрия. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптозы, 3 г сухого мясного экстракта, 5 г натрия хлорида, 0,2 г азид натрия, 12 г агара; устанавливают рН 7,2, автоклавируют при 121°C 15 минут. К расплавленному агару (45°) добавляют 5% стерильной крови овцы, перемешивают и разливают в чашки Петри. Азид натрия подавляет рост многих грамотрицательных бактерий.

Селективная среда с антибиотиками для стрептококков. В расплавленную и охлажденную агаровую среду добавляют 7% дефибринированной крови барана и антибиотики (на 1000 мл среды): налидиксовой кислоты - 7,5 мг, полимиксина В - 17 000 ЕД, неомицина сульфата - 2,12 мг. Каждый антибиотик предварительно растворяют в 20 мл стерильной дистиллированной воды. Готовую среду используют в течение 48 часов при хранении в холодильнике. На среде ингибируется рост стафилококков, синегнойной палочки, энтеробактерий, предотвращается роение протей.

Если после засева материала на поверхность среды положить полоски фильтровальной бумажки (диски), пропитанные бацитрацином (10 ЕД), то можно дифференцировать стрептококки серогруппы А (чувствительные к бацитрацину) от β -гемолитических стрептококков других групп, устойчивых к бацитрацину.

Агар с ацетатом таллия для энтерококков. Ацетат таллия - 1 г, пептон - 10 г, дрожжевой экстракт - 10 г, глюкоза - 10 г, агар - 13 г, дистиллированная вода - 1000 мл, рН 6. Стерилизуют 15 минут при 118°C , охлаждают и добавляют 10 мл 1%-ного стерилизованного фильтрованием солянокислого трифенилтетразолия.

Контрольные вопросы:

1. Как и какой патматериал отбирают для лабораторных исследований на стафилококкоз и стрептококкоз?
2. Возбудители стафилококкоза и стрептококкоза животных?
3. Как проводится диагностика стафилококкоза и стрептококкоза у животных?
4. Методы лабораторной диагностики стафилококкоза и стрептококкоза у животных?
5. Питательные среды для выращивания возбудителей стафилококкоза и стрептококкоза животных?

Список использованной литературы

1. Акатов А.К., Зуева В.К. Стафилококки. М.: «Медицина», 1983.
2. Антонов Б.И, Борисова В.В, Волкова П.М. и др. Лабораторные исследования в ветеринарии. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1986.
3. Бакулов И.А., Вишняков И.Ф., Власов Н.А. и др. Особо опасные болезни животных. Покров.: ВНИИВВиМ, 1998.
4. Ветеринарная микробиология иммунология: Учебник /Под ред. проф. Н. А. Радчука. - М. Агропромиздат 1991.
5. Костенко Т.С., Скаршевская Е.И., Гительсон С.С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. М. Агропромиздат 1989.
6. Колычев Н. И. Ветеринарная микробиология и иммунология. Омск 1996г.
7. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Костенко Т.С., Родионова В.Б, Скородумов Д.И. М.: Колос, 2001.
8. Сидоров М.А, Скородумов Д.И, Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. – М.: Колос, 1995.
9. Скородумов Д.И, В.В. Субботин, Сидоров М.А, Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. – М.: ИзографЪ, 2005.
10. Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Черных О.Ю., Шевкопляс В.Н. Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных. – Краснодар. - 2009, 575 с.

11. Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Литвинова А.Р., Брилев Р.О., Злищева М.А. Совершенствование специфической профилактики крупного рогатого скота//Труды Кубанского государственного аграрного университета. Серия: Ветеринарные науки, 2009. – №1 (ч.1). - С. 127-129.

12. Двадненко О.В., Шевченко А.А. Эпизоотологические особенности инфекционных болезней крупного рогатого скота в Краснодарском крае//Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2012. – №2 (35). - С. 365-367.

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,
Г.А. Джаилиди, Д.Ю. Зеркалев, А.Р. Литвинова, О.В. Двадненко
Учебное пособие «Диагностика стафилококкозов и стрептококкозов».

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13