

УДК: 619:579.861.2

РЕЗУЛЬТАТЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Гулнур Нурбековна Темикеева (0009-0001-4965-166X),
Эльмурат Алсеитович Джетигенов (0000-0001-7690-8849)

Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина

Аннотация: В статье приведены результаты бактериологических исследований стафилококковой инфекции животных. По итогам проведенных культурально-морфологических и биохимических исследований изолята было установлено, что возбудителем инфекции является *Staphylococcus aureus*. Данная культура обладала патогенными свойствами, что являлась его синтезом плазмокоагулазы, каталазоположительностью и гемолитической активностью бета-гемолизом. Определена высокая дермонекротическая способность культуры и патогенность на белых мышах, что вызвало заболевание и гибель подопытных животных. Получена гипериммунная сыворотка с титром 1:256, при иммунизации кролика инактивированным стафилококковым антигеном.

Ключевые слова: Стафилококк, микроскопия, культурально-морфологические и биохимические исследования, патогенность, дерматонекроз, гипериммунная сыворотка.

СТАФИЛОКОКК ИНФЕКЦИЯСЫН БАКТЕРИОЛОГИЯЛЫК ИЗИЛДӨӨЛӨРДҮН ЖЫЙЫНТЫГЫ

Гулнур Нурбековна Темикеева (0000-0002-5167-4414),
Элмурат Алсеитович Джетигенов (0000-0001-7690-8849)

К.И. Скрябин атындагы Кыргыз улуттук агрардык университети.

Аннотация: Макалада жаныбарлардын стафилококк инфекциясынын бактериологиялык изилдөөлөрүнүн натыйжалары берилген. Изоляттын культуралдык морфологиясы жана биохимиялык изилдөөлөрүнүн жыйынтыгы боюнча инфекциянын козгогучу *Staphylococcus aureus* экени аныкталган. Бул культура патогендик касиетке ээ болгон, анын плазмакоагулаза синтези, каталаза позитивдүүлүгү жана бета-гемолиз менен гемолиздик активдүүлүгү. Дермонекротикалык касиети жана ак чычкандардын патогендүүлүгү аныкталган. Коёнду инактивдештирилген стафилококк антигени менен иммунизациялоо жазалгандан кийин 1:256 титрдеги гипериммундук сыворотка алынган.

Өзөктүү сөздөр: Стафилококк, микроскопия, культуралдык-морфологиялык жана биохимиялык изилдөөлөр, патогендүүлүгү, дерматонекроз, гипериммундук сывороткалар.

RESULTS OF BACTERIOLOGICAL STUDIES OF STAPHYLOCOCCAL INFECTION

Gulnur Nurbekovna Temikeeva (0000-0002-5167-4414),
Elmurat Alseitovich Jetigenov (0000-0001-7690-8849)

Kyrgyz National Agrarian University named after. K.I. Scriabin

Annotation: *The article presents the results of bacteriological studies of staphylococcal infection in animals. Based on the results of cultural, morphological and biochemical studies of the isolate, it was established that the causative agent of the infection is Staphylococcus aureus. This culture had pathogenic properties, which included its synthesis of plasmacoagulase, catalase positivity and hemolytic activity by beta-hemolysis. The high dermonecrotic property of the culture and pathogenicity on white mice were determined, which caused the death of the disease in experimental animals. Hyperimmune serum with a titer of 1:256 was obtained by immunizing a rabbit with inactivated staphylococcal antigen.*

Keywords: *Staphylococcus, microscopy, cultural-morphological and biochemical studies, pathogenicity, dermatonecrosis, hyperimmune serum.*

1. Введение

Стафилококковые инфекции достаточно широко распространены у различных животных. Основными проявлениями стафилококковой инфекции являются: гнойные воспаления кожи и подкожной клетчатки, стафилококковый сепсис, синдром токсического шока, пневмонии, ангины, энтероколиты, отравление стафилококковым энтеротоксином и поражение центральной нервной системы. Резервуаром инфекции коагулазопозитивных стафилококков являются грызуны, птицы, крупный и мелкий рогатый скот, собаки, кошки. При этом заболевание проявляется у всех возрастных групп, но в большей степени у молодняка. Высок риск взаимного заражения золотистым стафилококком животных и человека.

В Кыргызстане стафилококковая инфекция имеет распространение среди животных и человека. При этом особую проблему составляет *Staphylococcus aureus*, который обладает большой патогенностью и высокой резистентностью ко многим лекарственным препаратам. Изучение данного патогенна и разработка диагностических тестов и возможность

разработки профилактических средств из местных штаммов имеет большое научное и практическое значение.

В связи с этим целью данной работы являлось изучение вида стафилококка вызывающего заболевание домашних животных, определить его патогенность и получить гипериммунную сыворотку.

Для выполнения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить культурально-морфологические свойства изолята
2. Изучить биохимические свойства изолята
3. Изучить антибиотико-чувствительность
4. Определить патогенность культуры
5. Изыскать способ получения гипериммунной сыворотки

2. Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служил биологический материал от больной собаки. Культуральные свойства бактерий изучали на различных питательных средах. Для выделения и поддержания культуры использовали мясо-пептонный

бульон (МПБ) (1 л мясной воды, 1 л дистиллированной воды, 1 % пептона, 1,5 % NaCl), мясо-пептонный агар (МПА) (МПБ, 2-3 % агара), желточно-солевой агар (ЖСА). ЖСА – это элективная среда для стафилококков. Исследования проводились в лаборатории диагностики инфекционных болезней животных Факультета ветеринарной медицины Кыргызского национального аграрного университета им. К. И. Скрябина.

Морфологические свойства культур изучали визуально, форму колоний изучали при помощи лупы и стереоскопа, а также под микроскопом изучали морфологию бактерий. Мазки окрашивали по Граму. Микроскопию проводили при помощи тринокулярного микроскопа VisiScopeTL3841 американской компании VWR и фотокамеры VisiCam 16 Plus. Просматривали мазки при увеличении в 1000 раз под иммерсией. Биохимические свойства изучали на среде Гисса, а также каталазная и оксидазная активность. Чувствительность изолятов к антибиотикам определяли дискодиффузионным методом. Биопробу для выявления патогенных свойств штаммов ставили на овце и лабораторных белых мышах. Гипериммунную сыворотку получили иммунизацией кролика инактивированной культурой *Staphylococcus aureus* по схеме: 3 раза с интервалом 7 дней подкожно в дозе 1, 2 и 4 мл. инокулята в концентрации 1 млн. микробных клеток.

3. Результаты исследований

Изучение культурально-морфологических характеристик изолята, выделенного от больного животного показало, что культуры имеют характерный для стафилококка рост. На мясопептонном бульоне заметен рост бактерий в виде помутнения среды, а затем на третьи сутки выпадение осадка в виде рыхлой, хлопковидной структуры. На мясопептонном агаре колонии округлые, выпуклые, диаметром 2-5 мм, с ровным краем и гладкой поверхностью, окрашенные

в белый цвет. На желточно-солевом агаре патогенные стафилококки формируют колонии, окруженные радужным венчиком за счет разложения лецитина яичного желтка. Микроскопия культуры показала наличие стафилококков размером 0,5-1,0 мкм, грамположительные, располагаются единично, парами и в виде скоплений бактерий.

Как известно в последнее время стафилококки встречаются с резистентностью к антибиотикам. Для определения чувствительности *Staphylococcus aureus* использовали диско диффузионный метод. В результате проведенного анализа установлено, что культура *Staphylococcus aureus* резистентна к амоксицилину и левофлоксацину. Вместе с тем обладает высокой чувствительностью к сульфаметоксазолу, цефтриаксону, гентамицину и ципрофлоксацину.

В результате проведенных исследований по изучению ферментативных свойств выделенного изолята стафилококка была определена активность на глюкозу, сахарозу, лактозу, манит, что доказывает ферментацию данных сахаров и не ферментирует мальтозу. Известно, что стафилококки обладают высокой биохимической активностью, отличие *Staphylococcus aureus* разлагает до кислоты глюкозу, сахарозу, лактозу, маннит и не ферментирует мальтозу, что подтверждено в проведенных сахаролитических исследованиях с выделенной культурой. Следовательно, выделенный изолят относится к виду *Staphylococcus aureus*.

Патогенные виды стафилококков (в частности, *Staphylococcus aureus*) продуцируют плазмокоагулазу (коагулазоположительные), который является одним из важнейших показателей патогенности, так как способны продуцировать энтеротоксин. Проведенные исследования по определению коагулазы показали положительную реакцию. Выделенный изолят стафилококка с кроличьей плазмой образовал плотный сгусток, что доказывает продуцирование

плазмокоагулазу, таким образом можно сказать, что изолят относится к *Staphilococcus aureus*.

Известно, что патогенные стафилококки продуцируют каталазу, проведенные исследования культуры стафилококка с перекисью водорода показали положительную реакцию, что свидетельствует о каталазоположительности культуры.

Гемолитическую активность стафилококка изучали на кровяном агаре. Известно, что кровяном агаре золотистый стафилококк формирует колонии, окруженные зоной гемолиза.

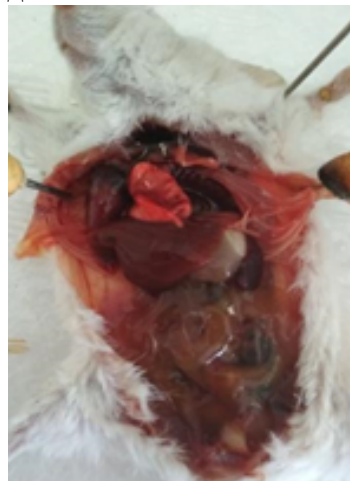


В проведенных исследованиях заметно, что в зоне роста микроорганизма имеется широкая зона обесцвечивания среды, то есть эритроциты в агаре под воздействием токсинов бактерий полностью лизируются.

Этот тип гемолиза относится к бета-гемолизу, который характерен для *Staphilococcus aureus*.

С целью изучения дермонекротических свойств выделенной культуры *Staphilococcus aureus* была поставлена биопроба на коже животного. Для этих целей использовали овцематку белой масти, на которой в области лопатки постригли и побрили шерсть в диаметре 5 см. На подготовленное место провели инокуляции культуры ватным тампоном суточной культурой золотистого стафилококка. На вторые после заражения наблюдается местная гиперемия, на месте аппликации культуры кожа покрылась шероховатой корочкой, светло желтого цвета. На третий сутки на месте заражения заметна гиперемия, кожа сморщенная, выпуклая с бороздками, покрыта тонкой серой корочкой. Корочка на месте поражения потрескалась, местами отходит.

Кроме этого для изучения патогенных свойств выделенной культуры *Staphilococcus aureus*, было проведено заражение белых мышей суточной культурой. Для этого суточную культуру выращенную на МПА смыли физиологическим раствором и довели концентрацию микробных клеток в растворе до 1 миллиона. В качестве модели для проведения острого опыта использовали пять беспородных белых мышей. Мышам вводили инокулят в области поясницы в дозе 1×10^9 микробных клеток в объеме 0,5 мл подкожно.



Первые признаки заболевания

проявились на третьи сутки после заражения. У мышей отмечалась вялость, малоподвижность, отсутствие аппетита, (корм мало использован). На пятые сутки опыта одна мышка пала

Вскрытие мышей показала патологические изменения в печени в виде точечных белых очагов и местами вишневого цвета; селезенка увеличена, кровонаполнена; легкие дряблые, местами кровоизлияние; кишечник дряблый, с малым количеством кишечного содержимого.

Для получения гипериммунной сыворотки использовали выделенную культуру *Staphylococcus aureus*. Культуральную взвесь получали путем смыва с чашки Петри суточную культуру стафилококка физиологическим раствором. Концентрацию стафилококков доводили до концентрации 1 млн. микробных клеток в 1 мл. Из полученной взвеси культур бактерий готовили антиген путем инактивирования в водяной бане при 80°C в течение 30 минут.

Опыт поставили на кролике весом 5 кг. Кролика заражали подкожно в области лопатки через каждые семь дней. В первый день ввели 1 мл антигена в концентрации 1 млн. м.к. (микробных клеток), на восьмой день ввели 2 мл антигена и на 15 день ввели 4 мл антигена. Через неделю после последней иммунизации взяли кровь для получения сыворотки. Кровь поставили в термостат на 30 минут при 37°C, затем осторожно отделили сформировавшийся сгусток крови от стенок и для формирования плотного сгустка крови поставили в холодильник при 4°C на 24 часа. После этого центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования отбирали сыворотку крови.

Полученную сыворотку крови проверили на реакции агглютинации. Для этого взяли 10 пробирок и в каждую налили 0,5 мл физиологического раствора. Затем в первую пробирку налили 0,5 мл полученной гипериммунной сыворотки крови предварительно разведенной 1:2 перемешали и из нее перенесли 0,5 мл во вторую пробирку и так до десятой пробирки.

Разведение получилось минимальное 1:4 и последняя пробирка разведение 1:2048. В каждую пробирку добавили по одной капле (0,05 мл) инактивированного стафилококка (антигена). Штатив с пробирками оставили при комнатной температуре на сутки.

В результате положительная реакция агглютинация наблюдалась до титра 1:256. Следовательно, полученная гипериммунная сыворотка вполне может быть использована для лабораторных работ в подтверждении *Staphylococcus aureus* при бактериологических исследованиях.

4. Дискуссия

Стафилококковая инфекция является бичом в настоящее время, повсеместно наблюдается рост данного заболевания. Это связано с увеличением количества штаммов возбудителя, резистентных к антимикробным препаратам, нарастанием числа носителей патогенных стафилококков, нарушением технологических режимов получения сырья, его переработки и другими причинами.

Staphylococcus aureus наиболее патогенный из стафилококковой группы болезней; как правило, он вызывает инфекции кожи, может вызывать пневмонию, ангину, отит, эндокардит и остеомиелит, а также часто обсеменяет раневую поверхность вызывая гнойный процесс. Этот возбудитель обычно приводит к формированию абсцесса.

В связи с этим нашей задачей было изучить выделенную культуру *Staphylococcus aureus* у собаки, его культурально-морфологические свойства, биохимическую и антибактериальную характеристику, а также патогенность культуры с перспективой возможности разработки вакцины и диагностикумов.

Такие исследователи как: О.К.Тарасова, Е.А. Асташкина, О.М. Игнатова указывают, что типичные биохимические идентификационные тесты включают каталазо-положительные (все патогенные виды стафилококков), коагулазо-положительные (чтобы

отличить *Staphylococcus aureus* от других видов стафилококков), и положительной ферментации маннита (для отличия от *Staphylococcus epidermis*), которые подтверждены в проведенных нами исследованиях по определению видовой принадлежности стафилококка.

Имеются сведения, что *S. Aureus*, как бактерия может быть комменсальной, колонизирующей, латентной или вызывать заболевания. Взаимодействие между *S. aureus* и хозяином носит многоплановый и развивающийся характер, примером чего является распространение *S. aureus* между людьми и другими животными-резервуарами, а также отсутствие успехов в разработке вакцин.

5. Выводы

1. Культурально-морфологические характеристики выделенной культуры стафилококка соответствует *Staphylococcus aureus*.

2. При изучении чувствительности к антибиотикам выявлена устойчивость к амоксицилину и левофлоксацину. Вместе с тем обладает высокой чувствительностью к сульфаметоксазолу, цефтриаксону, гентамицину и ципрофлоксацину.

3. В результате проведения биохимических исследований определено, что изолят обладает высокой биохимической активностью и ферментируют в аэробных условиях такие углеводы как глюкозу, сахарозу, лактозу, маннит и не ферментирует мальтозу, что подтверждает принадлежность выделенного стафилококка виду *Staphylococcus aureus*.

4. При определении коагуляции плазмы кролика и каталазной активности, выявлена положительная реакция, что подтверждает о патогенности *Staphylococcus aureus*.

5. Гемолитическую активность стафилококка показала бета-гемолиза.

6. При проведении биопробы по определению патогенности выделенной культуры *S.aureus*, выявлены его

дерманекротические свойства на коже животного.

7. Проведенные исследования по патогенности выделенной культуры *S.aureus* показывают, что данная культура обладает высокой патогенностью и способна вызвать стафилококковую инфекцию у животных.

8. Проведенные исследования по получению гипериммунной сыворотки, дали положительный результат использованной схемы иммунизации, при которой получена гипериммунная сыворотка в титре 1:256. Данный результат дает возможность использования его в бактериологической диагностике.

6. Использованная литература

1. Стафилококковые инфекции <https://www.msmanuals.com/ru/professional>

2. Arumugam Gnanamani, Periasamy Hariharan and Maneesh Paul-Satyaseela/ *Staphylococcus aureus: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach.* // Submitted: 31 May 2016 DOI: 10.5772/67338 <https://www.intechopen.com/books/5471>

3. Steven Y.C. Tong, Joshua S. Davis, Thomas L. Holland./ *Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management.* // Clin Microbiol Rev. 2015 Jul; 28(3): 603–661.

4. *Staphylococcus aureus Infections* / <https://medlineplus.gov/staphylococcalinfections.html>

5. *Staphylococcus aureus Infection*/ Tracey A. Taylor; Chandrashekhar G. Unakal./ 2017 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>

6. Получение гипериммунных стафилококковых кроличьих сывороток. О.К.Тарасова, Е.А. Асташкина, О.М. Игнатова, Н.А. Михайлова, Л.С. Черкасова, Н.П. Ванеева, Н.Б. Егорова, Е.А. Курбатова, И.М. Грубер./ Материалы X съезда ВНПОЭМП, Москва, 12–13 апреля 2012