**Кайрат Жуманов, Кадыр Бияшев, Биржан Бияшев**

**(Алматы, Казахстан)**

**ФАГОТИПИРОВАНИЕ ПАТОГЕННЫХ СТАФИЛОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОКА КОРОВ**

**Введение.**Успешная борьба с маститами стафилококковой этиологии зависит от их своевременной идентификации, выявления источников и путей распространения инфекции.

С этой целью в настоящее время все больше используется метод фаготипирования [1,2,3].

Впервые фаготипирование стафилококков было предложено Фиксом (R.Fisk) в 1942 году. Он выделил фаги из лизогенных штаммов стафилококков и использовал их для идентификации.

В ряде работах[2,3,4,5,6] показано, что стафилококки фаготипа 42Д, 42Е обычно выделяются из молока больных маститом коров.

Новым достижением в области бактериологической диагностики пищевых отравлений стафилококковой этиологии является фаготипирование.

В своих исследованиях [1,2,3,4, 5]стафилококков изолированных из продуктов, вызвавших пищевые отравления, обнаружили стафилококки фаготипов 7, 42Е, 6/47/53/54, 6/54/42Д.Они же отмечали, чтобольшинство исследованных стафлококков, лизировались фагами III и IV групп..

В специальной ветеринарной литературе очень мало работ по вопросу определения фаголизабильности стафилококков.

В связи с этим мы задались целью дать фаготипаж патогенных стафилококков, выделенных от коров, больных маститами.

**Материал и методики исследования.** Исследованнию подвергнуто 674 штаммов стафилококков, выделенных из молока коров. Все исследованныекультуры стафилококков обладали типичными морфологическими и тинкторальными свойствами. Культуры хорошо росли на МПА в виде мелких, круглых, гладких колоний, с характерным пигментообразованием: золотистым, белым, лимонно-желтым.

Все штаммы были дифференцированы на патогенные и непатогенные. Для определения патогенности многие исследователи [2,3] использовали различные критерии, как реакция плазмокоагуляции, реакция гемолиза, дермонекротическая проба, ферментация маннита и способность к пигментообразованию.

**Результаты исследования.** Все 674 исследованные культуры стафилококков обладали типичными морфологическими и тинкторальными свойствами.

Из исследованных 674 штаммов стафилококков, выделенных из молока коров, коагулировали плазму 297 штаммов или 44%, из общего количества плазмокоагулирующих штаммов стафилококков от здоровых коров выделено 14,7%, а от больных маститами 85,3%.

По нашим данным из 674 штаммов стафилококков продуцировали гемотоксин 361 (53,7%).

Образование стафилококками золотистого пигмента часто ассоциируется с патогенностью и этот критерий широко фигурирует в различных схемах классификации.

Из 674 штаммов стафилококков, 282 штаммов отнесены к Staphylococcusaureus, 233 – Staphylococcusalbus, 159 – Staphylococcuscitreus.

Из 297 штаммов 19 не разлагали маннит.

Фаготипирование патогенных стафилококков,выделенных от больных маститами коров, проводилось о помощью типовых стафилокковых фагов. Основной набор состоял из 22 типовых фагов.

Эти фаги разделены на 4 группы:

I группа – фаги 29, 53, 52А, 79, 80;

II группа – фаги 3А, 3В, 3С, 55, 71;

III группа – фаги 6, 7, 42Е, 47, 53, 54, 75, 77, 83А;

IY группа – фаг 42Д.

Вне групп – фаги 81, 187.

Фаготипирование стафилококков осуществлилось всеми 22 типами фагов одновременно. Перед началом работы набор сухих фагов стерильно растворяли в щелочном бульоне ( МПБ рН = 7,6 ) с 0,4% глюкозы и 0,02% CaCl2. Поскольку фаги высушивались в объеме 0,1 мл, то при добавлении 1 мл бульона получали разведение фага 1: 10 (маточное разведение).

После чего готовились два рабочих разведения 100 ТР(тест-разведения, 1:100) и 1 ТР ( 1:1000 ) .

Суточную агаровую культуру испытуемого штамма засевали в МПБ и выращивали 4 часа при 37°С ( до появления заметного помутненеия). Затем из нее пастеровской пипеткой засевал газоном в свежеприготовленные и подсушенные чашки с 1,2% агаром. Избыток культуры удалали пипеткой, а чашки подсушивали 30-40 мин. при 37°С .

Дно засеянной чашки расчерчивали на 22 квадрата (почислу фагов) и в каждый квадрат засеянной среди тонко оттянутой пастеровской пипеткой напосили каплю соответствующего фага. После подсыхания капель фагов инкубировали 6 часов при 37°С идо следующего утро при комнатной температуре.

Степень лизиса культуры фагами регистрировали по следующей схеме:

++++ - сливной (полный) лизию;

+++ -полусливной лизис (незначительный рост культуры в зоне лизиса).

++ - наличие в месте нанесения капли фага свыше 50 колоний фага (пятен лизиса);

+ - от 20 до 50 колоний фага;

+ - менее 20 колоний фага;

* - полное отсутствие лизиса.

Наивысшее разведение, вызвавшее лизис эталонного штамма +++ называется – тест разведением ( ГТР ) фага.

Фаготипирование штаммов начинали рабочим разведением фагов, соответствующим ITP (в нашем опыте разведение 103 или 1:1000). Штаммы, с которыми получен отрицательный результат (отсутствие учитываемого лизиса, хотя бы одним фагом) тировали повторно первым разведением фагов, соответствующей 100 ТР ( 1:100 ).

Нами исследовано 297 коаглазоположительных штаммов стафилококков, которые были выделены из молока как от здоровых коров, так и от коров с субклиническими и клиническими формами маститов. Из изученных культур стафилококков типировались 197 штаммов ( 66,3 % ) и не типировались 100 культур (33,7%). Из 197 типируемых штаммов 128 ( 65,0 ) лизировались фагами в дозе ITP ( тест-разведения ) и 69 (35 % ) – в дозе ТР. Во многих случаях штаммы лизировались не одним, а несколькими фагами, что дает для каждого штамма характерную – фагомозаику.

Интересно отметить, что из 120 штаммов стафилококков, отнесенных к чистым фагогруппам, 83 культур принадлежали к III группе и 37 штаммов к IY группе. Из культур смешанных фагогрупп( 77 штаммов ) большинство принадлежало к группе III + IV ( 40 штаммов).

При учете типизации штаммов в разрезе отдельных фагов, установлено, что 77 культуры типировались фагом 42Д (IVгруппа ), 70 штаммов – фагом 42Е (III группа). Среди смешанных фагогрупп большинство штаммов относились к фаготипам 6+7+47 ( 36 штаммов ).

Согласно нашими материалам, из 197 типируемых штаммов 142 культур явлались Staphylococcusaureus. Характерно, что из этих 142 штаммов 67 (47,1%) типировались фагом 42Д.

Нами было изучено распределение штаммов с различной коагулазной активностью по отдельным фагогруппам( таблица1).

Из таблицы видно, что из 197 типированных штаммов 94 или 47,7% коагулируют плазму в течение 1-2 часов и 86 (43,6% ) штаммов в течение 2-6 часов, что составляет 91,3%.

Наибольшее количество стафилококковых культур ( 160 ) различной плазмокоагулирующей способности лизировались фагами III и IV групп.

Из таблицы видно, что из 197 типированных штаммов 94 или 47,7% коагулируют плазму в течение 1-2 часов и 86 (43,6% ) штаммов в течение 2-6 часов, что составляет 91,3%.

Таблица 1 -Фаготипирование плазмокоагулирующих стафилококков

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Время свертывания плазмы | Типировалось фагами | | Фагогруппы | | | | Количество не типированных штаммов |
| всего | % | III | IV | III+IV | I+II+III+187 |
| До 1 часа | 56 | 28,4 | 22 | 19 | 11 | 4 | 24 |
| От 1 до 2 час. | 38 | 19,3 | 17 | 12 | 6 | 3 | 9 |
| От 2 до 6 час. | 86 | 43,7 | 30 | 5 | 21 | 30 | 36 |
| От 6 до 18 час. | 17 | 8,6 | 14 | 1 | 2 | - | 31 |
| Всего : | 197 | 100 | 83 | 37 | 40 | 37 | 100 |

Наибольшее количество стафилококковых культур ( 160 ) различной плазмокоагулирующей способности лизировались фагамиIII и IV групп.

Приведенные данные показывают определенную взаимосвязь чувствительности стафилококков к фагам и плазмокоагулирующей активностью.

Интересные результаты получены при анализе материалов фаготипирования, стафилококков с различными типами гемотоксинов.

Из 83 штаммов стафилококков, чувствительных к фагам III группы, содержали альфа-гемотоксин – 23 штаммов, бета-гемотоксин – 1, дельта-гемотоксин – 2, альфа-гемотоксин в сочетании с бета-дельта гемотоксин – 56; из 37 штаммов, лизированных, фагами IV группы, 32 содержали альфа-гемотоксин в чистом виде или в сочетании с бета-дельта гемотоксинами. Из 40 штаммов, лизированных фагами третьей – четвертой групп, 10 содержали только альфа-гемотоксин, а 30 штаммов альфа-гемотоксин в сочетании с бета и дельта-гемотоксинами.

Почти все штаммы (32 из 37), лизированные фагами I + II и III групп, содержали альфа-гемотоксин в сочетании с другими гемотоксинами.

Из 197штаммов стафилококков, лизированных фагами разных групп, 183 (92,9 %) содержали альфа-гемотоксин или в сочетании с другими гемотоксинами.

При анализе результатов фаготипирования стафилококковых штаммов в зависимости от источника, из которого они были выделены, нами получены следующие данные: из 197 типированных штаммов 64 культуры (32,5 %) были выделены от коров с клиническими маститом, 110 (55,8 %) – при латентной форме мастита и 23 (11,7 %) – от здоровых коров.

Фаготипирование набором международных стафилококковых фагов 297 стафилококковых штаммов, выделенных при носительстве из разных источников, показало, что наибольшее число стафилококков лизируется фагами IV и III групп.

Из типированных штаммов встречаются фаготипы (6/7/47/42Е), образующие энтеротоксин и вызывающие при употреблении молока и молочных продуктов пищевые отравления у людей.

Таким образом, из 674 штаммов стафилококков, 297 (44,1 %) были патогенными и в большинстве случаев (253 штамма) выделялись из долей вымены с клиническим и субклиническим маститом.

Как правило, в исследованном нами хозяйстве преобладал один и тот же фаготип стафилококков. Из этого вытекает, что передача инфекции от одного животного к другому, вероятно, осуществляется через доильную аппаратуру, предметы обихода и обслуживающим персоналом.

**Выводы.**Отсюда можно сделать вывод, что патогенные стафилококки играют значительную роль в этиологии маститов у крупного рогатого скота.

**Литература:**

1. Загаевский И.С. Экспертиза молока при стафилококко­вом мастите коров. //Ветеринария, 1978 г., № 10.
2. Савойская С.Л. Выделение золотистого стафилококка из молока коров. // Тезисы научно - практической конференции.г., Самарканд, 1987 г.
3. Fox L.K., Nc Donald J.S. Functional activity of neutrophile form bovine mammary glands infected with Staphylococcus aureus // J. Dairy Sc. 1988. 12.
4. VfttilaТ.,Odoyle D., Frost A.J. The growth of compact and diffuse variants of Staphylococcus aureus in bovine mastitis and normal whey //Microbiol. Immunol. 1988. 32, 7:
5. Смирнов В.В., Вершигора А.Е., Вихоть Н.Е. и др. Ста­филококк (биологически активные субстанции, иммунный ответ на антигены). //Киев, Нау ко в а думка, 1988 г.
6. Boddie R.L. Nickerson S.C. Efficacy of 0,18% iodine teat dip against Staphylococcus sureus and Streptococcus agalactiae// J. Dairy Sc. 1989. 72. 4.

**Научный руководитель:**

доктор ветеринарных наук, профессор, почетный академик РФ, кавалер ордена «Парасат» **Бияшев Кадыр Бияшевич**.