

стрептококки и стафилококки. Это дает повод считать такой мастит смешанной этиологии. Вероятно, подобный диагноз необходимо ставить очень осторожно, только при наличии в 1 см³ секрета более 500 плазмokoагулирующих стафилококков.

Процесс экологизации ветеринарной гигиены молока как науки, требует формирования нового стиля мышления научного работника, ориентированного на широкое пользование законов экологии. Разрабатываемые им средства лечения и профилактики мастита коров должны всемерно способствовать нормальному функционированию вымени как высокоорганизованной экосистемы, органически связанной с другими органами макроорганизма законами гомеостаза.

Выводы

Вымя коров как экосистема имеет свой нормомикробиоценоз, основную часть которого составляют стафилококки, обладающие некоторыми свойствами, традиционно считающимися показателями патоген-

ности. Вероятно, эти показатели необходимы для защиты экосистемы от посторонней микрофлоры.

S. aureus var. *bovis*, проникая в вымя, не формирует свою популяцию, присутствие его в экосистеме периодическое.

Количество микроорганизмов в 1 см³ цистернального молока здоровых коров колеблется от 500 до 6000, иногда достигает 10000. Количество микроорганизмов в 1 см³ соскового молока здоровых коров варьирует от 6000 до 20 000. В нем в 8-10 раз больше бактерий, нежели в цистернальном молоке.

Грамотрицательная микрофлора, в том числе бактерии группы кишечных палочек и псевдомонад, встречается в сосковом молоке в незначительном количестве сразу после механического доения, но до следующего доения экосистема освобождается от них.

Противомаститные мероприятия должны быть направлены не на уничтожение нормальной микрофлоры вымени как экосистемы, а на всестороннее способствование ее жизнедеятельности.

SUMMARY

Udder of healthy cows as ecosystem contains resident microflora. *S. aureus* constantly penetrate into udder from environment, but it don't make up own population. Gram-negative microflora in small quantity penetrate into udder aborning machine milking, but a few hours later udder free oneself from Gram-negative microflora. Antimastitis arrangements must to not break functioning of the cow's udder microbiocoenosis.

Литература

1. Араб-Оглы Э.А. Демографические и экологические прогнозы. – М., 1972. – 256 с.
2. Мировоззрение и естественнонаучное познание / Н.Т. Абрамова, М.А. Голубец, Н.П. Депенчук и др. / - Киев: Наукова думка, 1983. – 326 с.
3. Флоров И.Т. Философия глобальных проблем // Вопросы философии. – 1987. - №6. – С.29-50.
4. Пиляров А.М. Методологические проблемы экологии. Смена ведущих концепций / Природа. – 1981. - №9. – С.96-103.
5. Околітенко Н.І., Гродзинський Д.М. Основи системної біології. – К.: Либідь, 2005. – 358 с.
6. Ярних В.С. Ветеринарная санитария и проблемы экологии // Ветеринария. – 1990. - №7. – С.3-6.
7. Балковой И.И., Дорофеев А.А. Солнечная активность и заболевание коров маститом // Тр. ВНИИВС. - Т.63. – М., 1979. – С.67-72.
8. Чижевский А.Л. Земное эхо солнечных бурь. – М.: Наука, 1976.
9. Герасимов И.П. Методологические проблемы экологизации современной науки // Вопросы философии. – 1978. - №11. – С.67.
10. Вернадский В.И. Размышления натуралиста. Научная мысль как планетарное явление.- М.: Мысль, 1977.
11. Опарин А.И. Жизнь, ее природа, происхождение и развитие.- М.: Наука, 1968.-168 с.

УДК: 619:618.19-002

А.М. Нагорных

(ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии)

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВОГО ЭНТЕРОТОКСИНА ТИПА С В КУЛЬТУРАХ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОКА ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ МАСТИТОМ КОРОВ

Ключевые слова: энтеротоксигенный, штамм, золотистый стафилококк.

Введение

Сложившаяся в производстве молока ситуация способствует снижению са-

нитарного качества молочной продукции и обуславливает рост алиментарно-зависимых заболеваний и общее ухудше-

ние показателей здоровья населения. Вопросы гигиены производства молока и контроля его качества становятся приоритетными. К высококачественным может быть отнесен лишь тот молочный продукт, который соответствует предъявляемым к нему требованиям не только по пищевой ценности и органолептическим показателям, но, прежде всего, по безопасности потребления [1].

Особенностью интоксикаций стафилококковой природы является то, что они развиваются в результате воздействия на организм энтеротоксинов, а не живых микробных клеток. Термическая обработка продуктов убивает стафилококки, но не разрушает токсины, и отравление наступает даже после длительной термической обработки. Это обстоятельство затрудняет выявление причин вспышек микробиологическими методами, заставляя прибегать к методам обнаружения энтеротоксинов [2, 6, 8, 10].

Большое негативное влияние на развитие животноводства и повышение его продуктивности оказывают заболевания животных, среди которых наибольшее значение имеет мастит коров. Выделение значительного процента энтеротоксигенных стафилококков из проб маститного молока указывает на то, что вымя больных коров может являться резервуаром энтеротоксигенных культур, которые инфицируют новорожденных телят при скормливании им молока и молозива, а также вызывают пищевые отравления людей при употреблении ими молока и молочных продуктов [4, 7, 9].

Изучение энтеротоксигенности стафилококков представляет существенные трудности, обусловленные отсутствием стандартных коммерческих антиэнтеротоксичных сывороток (антиэнтеротоксинов). В развитых странах определение энтеротоксигенности изолированных культур стафилококков обязательно используется для их идентификации, а промышленность выпускает необходимые иммунологические и другие диагностические препараты. Это дает возможность определять энтеротоксигенность стафилококков в различных режимах (экспрессном, на этапах исследования материала, без выделения чистых культур и т.д.) [3, 5, 11, 12].

Иммуноферментный анализ — один наиболее перспективных исследований биологических активных веществ. По чувствительности он не уступает радио-

иммунологическому. Методы иммуноферментного анализа постоянно совершенствуются фирмами-производителями: повышается чувствительность и специфичность тест-систем, подбираются наиболее удобные условия для работы, сокращается число этапов проведения исследований, что способствует уменьшению возможности совершения ошибок. Однако количество подобных диагностикумов недостаточно, выпускаются они, в основном, за рубежом [3, 6, 11].

Для эффективной оценки роли стафилококков в возникновении пищевых отравлений самого факта выделения культуры стафилококков, даже коагулазопозитивных, недостаточно, тем более, что в пищевых продуктах, содержащих патогенные дозы энтеротоксина, жизнеспособные микробные клетки могут и не выявляться. Поэтому в процессе биологической диагностики стафилококковых пищевых отравлений необходимо преследовать двойную цель: найти энтеротоксигенные стафилококки и выявить энтеротоксин. Оба патогена надо искать на всех этапах эпидемической цепи и тогда определение стафилококков позволит конкретно выяснить источник и механизм развития эпидемического процесса, а нахождение энтеротоксина в продукте и в материале от потерпевших окончательно подтвердит диагноз пищевой стафилококковой интоксикации.

Материалы и методы исследований

Образцы сборного молока и молока от здоровых и больных субклиническим и клиническим маститом коров отбирались в хозяйствах и частных подворьях Московской области. Выделение золотистых стафилококков и определение их ДНК-азной и плазмокоагулирующей способности проводили в соответствии с ГОСТ 30347-97 «Молоко и молочные продукты. Метод определения *Staphylococcus aureus*» и согласно «Методическим указаниям по бактериологическому исследованию молока и секрета вымени коров» (1983). Для первоначального определения наличия энтеротоксинов у выделенных стафилококков использовали тест-систему RIDASCREEN SET (R-Biopharm AG, D-Darmstadt) с чувствительностью 0,2 нг/мл. В качестве продуцента использовали наиболее токсигенный полевой штамм *Staph. aureus*, вырабатывающий энтеротоксин типа С. Выраживание токсигенной культуры стафилококка про-

водили на плотной питательной среде на целлофане (Major, 1978). Антиэнтеротоксические сыворотки получали путем иммунизации кроликов породы шиншилла весом 2,5-3 кг по 3-м схемам. Количество токсигенного белка и содержание иммуноглобулинов определяли спектрофотометрически при 595 нм с помощью красителя кумасси бриллиантового синего G-250 по методу Sendmack Grossberg, 1977. Титр антисывороток определяли в реакции преципитации в агаровом геле по Ouchterlony, 1958. Очистку и концентрацию иммуноглобулинов проводили путем высаливания сульфатом аммония и диализа в дистиллированной воде. Для получения конъюгатов IgG с пероксидазой из хрена использовали метод перйодатного окисления (Nakane P.K. and Kawaoi A., 1974). Была использована пероксидаза хрена тип IV, RZ-3,0 («Sigma», США). Для определения оптимальной концентрации антител и оптимального разведения конъюгатов применяли метод «шахматного титрования» с применением полистироловых планшет. Постановку реакции осуществляли методом ИФА в «сэндвич»-варианте, оптимальные условия постановки которого определяли экспериментально.

Результаты исследований

Для выяснения уровня обсеменения молока золотистыми стафилококками на фермах и частных подворьях Московской, Вологодской и Смоленской областей были проведены микробиологические исследования 442 проб сборного молока и секрета вымени от лактирующих коров с различным состоянием вымени.

Как видно из представленных в рис.1 данных, из молока и секрета вымени здоровых и больных маститом коров было выделено 168 штаммов (38%) золотистого стафилококка, которые проявляли ДНК-азную активность и коагулировали кроличью плазму, из них 8 (8,7%) штаммов из молока клинически здоровых коров, 128 (59,3%) штаммов — из молока коров, больных субклиническим маститом, в 2 раза меньше (21 /28,8%) штаммов из секрета вымени коров с клинической формой мастита и 11 штаммов (18,0%) - из сборного молока, что в 3,2 раза ниже, чем из молока коров с субклинической формой воспаления.

При определении энтеротоксигенных золотистых стафилококков было обнаружено, что в сборном молоке их выявлялось 36,4%, тогда как в молоке здоровых коров и в секрете вымени больных клиническим маститом — 25,0 и 33,3% соответственно. Наибольшее количество *Staph. aureus*, вырабатывающих энтеротоксины, выявлялось в молоке коров с субклинической формой мастита (42,2%), что коррелирует со значительным процентом обнаружения золотистых стафилококков при этой форме заболевания (рис 2).

Нами были проведены исследования по определению типов энтеротоксинов, выявленных из культур золотистого стафилококка. Чаще всего выявлялись энтеротоксины типа С (53,8% от числа энтеротоксигенных стафилококков), причем количество распределялось приблизительно в равной пропорции между штаммами *Staph. aureus*, выделенными из сборного молока и секрета вымени коров с

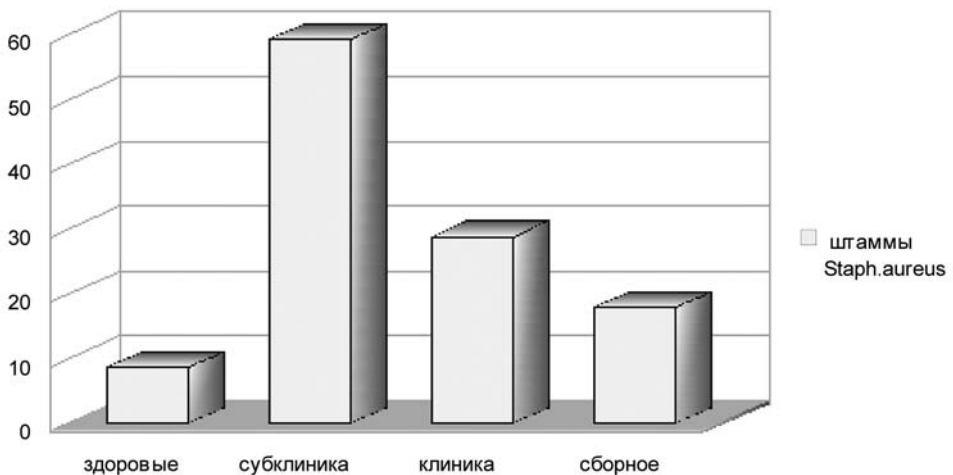


Рис. 1. Количество золотистых стафилококков из сборного молока и от лактирующих коров с разным состоянием молочной железы

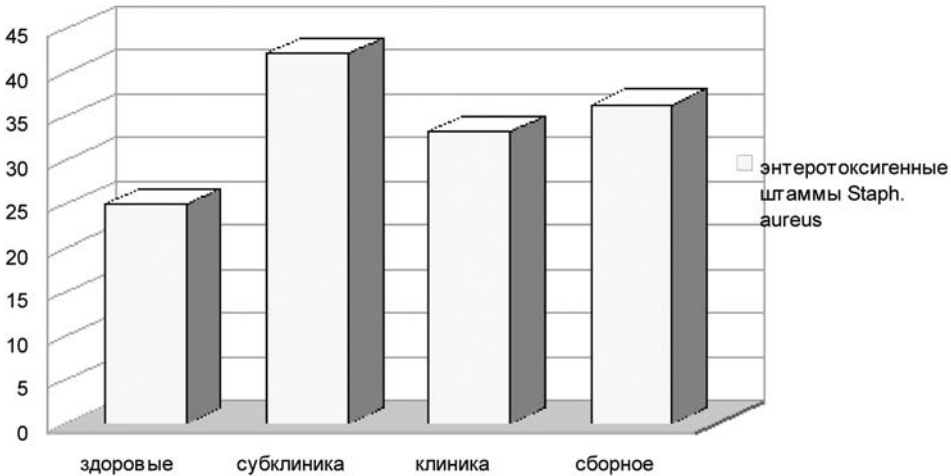


Рис. 2. Обнаружение энтеротоксигенных стафилококков среди золотистых, выделенных из сборного молока и от лактирующих коров с разным состоянием молочной железы

различным состоянием молочной железы; по 13,4% - типы D (были обнаружены только у клинически больных коров) и CD (чаще у здоровых коров — 50% от числа всех выделенных штаммов, вырабатывающих энтеротоксин тип CD). Что касается других типов энтеротоксинов, выявленных среди энтеротоксигенных стафилококков, то обнаруживались следующие: A, B, AB, BC, ABC, ACD и CDE - в количестве от 1,5 до 4,5%.

Для конструирования тест-системы было решено использовать наиболее токсигенный штамм *Staph. aureus*, вырабатывающий максимальное количество энтеротоксина типа C. С этой целью фильтрат бульонной культуры, содержащий энте-

ротоксин типа C, центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин и надосадочную жидкость насыщали сухим сульфатом аммония до 75%, диализовали, и после повторного центрифугирования использовали для иммунизации кроликов.

Иммунизацию кроликов энтеротоксином типа C с целью получения гипериммунных сывороток проводили в смеси с адьювантом Фрейнда по 3-м схемам в нарастающих дозах от 10 до 100 мкг/мл. Титр полученных антисывороток в РДП составил 1:32.

Иммуноглобулины выделяли как указано выше, значительного осаждения иммуноглобулинов удалось добиться при конечном насыщении раствора сульфатом

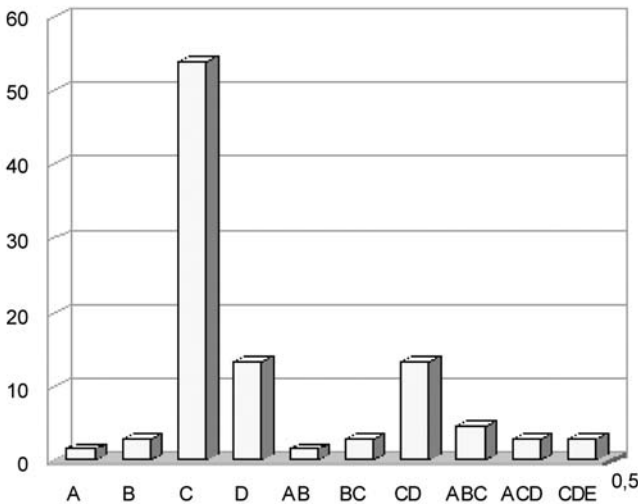


Рис. 3. Типы стафилококковых энтеротоксинов, вырабатываемые энтеротоксигенными *Staph. aureus*, выделенными из сборного молока и секрета вымени лактирующих коров

аммония до 45%.

Был получен конъюгат пероксидаза-антиэнтеротоксические иммуноглобулины и определены оптимальные параметры постановки реакции: рН, время сенсibilизации и температуру, при которой идет более эффективная сенсibilизация в планшетах. При изучении влияния рН среды сенсibilизирующей буферной системы в пределах (6,5-10,5) на чувствительность тест-системы было выяснено, что оптимальной является концентрация буфера 9,5. При определении оптимальной температуры и времени сенсibilизации не было выявлено значительных различий между режимами 4°C -24 ч и 20°C-16 ч, в то время как при 37°C-1 ч адсорбционная способность иммуноглобулинов была несколько ниже.

Определение концентрации антител, энтеротоксина и конъюгатов для создания тест-системы проводили методом «шахматного» титрования с применением полистироловых планшет. В экспериментах испытывали различные количества антител в интервале 1-20 мкг/мл, энтеротоксина (1-125 нг/мл) и разведений конъюгатов:

РЕЗЮМЕ

Были проведены исследования по выявлению энтеротоксигенных штаммов золотистого стафилококка в сборном молоке и молоке коров с различным состоянием молочной железы, определены типы энтеротоксинов и частота их обнаружения. Из культурального фильтрата наиболее токсигенного штамма *Staph. aureus*, вырабатывающего энтеротоксин типа С, получен энтеротоксин для иммунизации кроликов. Из антитоксических сывороток выделены и очищены иммуноглобулины, которые использовались для конструирования иммуноферментного диагностикума.

SUMMARY

The investigations were conducted to detect enterotoxigenic cultures of *Staph.aureus* in bulk milk and milk from the cows with the various state of milk udder. In addition, the types of enterotoxins were detected as well as a rate of their isolation. Enterotoxin for rabbit's immunization was extracted from most toxigenic culture of *Staph.aureus* which produced enterotoxin C. For immunoenzyme diagnosticum's construction we used pure immunoglobulins which was extracted from antitoxic sera.

Литература

1. Артемов А.А., Ванханен В.В. Идентификация источников загрязнения пищевых продуктов стафилококками // Рациональное питание.- Киев,1983.-вып.18.-С.101-103.
2. Бугрова В.И. Сравнительные данные о способности *Staph.aureus* вырабатывать энтеротоксины и другие биологически активные вещества.// Вопр.питания.-1982.-№4.-С.70-72.
3. Доморадская Т.Н. Современные методы обнаружения энтеротоксигенных стафилококков в продуктах питания // Вопр. Питания.-1991.-№1.-С.7-12.
4. Муруева Г.Б. Изучение В-энтеротоксинпродукции стафилококков, выделенных из молока коров // Ветеринария.-1982.-№8.-С.93.
5. Сиротинина О.Н. Энтеротоксин стафилококков и методы его определения в пищевых продуктах.//Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.-1982.-№1.-С.9-11.
6. Флуер Ф.С. Бактериальные энтеротоксины и проблемы их дальнейшего изучения. // Материалы VIII Всероссийского съезда эпидемиологов, микробиологов и паразитологов: Сб. Статей в 4 томах, 2002.-Т.1.-С.267-268.
7. Adesiyun A.P. Characteristics of *St. aureus* strains isolated from bovine mastitis milk; bacteriophage and antimicrobial agent susceptibility and enterotoxigenicity // J.Veter. Med. Sc. B.-1995.-Vol.42.-№3.-P.129-139.
8. Bergdoll M.S. The enterotoxins.// In:I.O.Cohen(editor).The staphylococci.John Wiley,New York.-1972.-№9.-P.301-331.
9. Bolstriege M.C., Roth G. Enterotoxigenicity of strain of *S. aureus* isolated from milk and milk products // SuidAfrikaanse Tydskrifvir Sauvelknnde.-1985.-V.17.-№3.-P.91-95.
10. Davison N., Dack G.M. Some chemical and physical studies of staphylococcus enterotoxin // J. Infection Dis.-1939.-№64.-P.302-306.
11. James V., Smit and Mariane M. et al. A review of methods for detection of *Staphylococcus* enterotoxins and evaluation of enzyme-liked immunosorbent assay appliend to foods // L.of Food Satety.-1985.-№7.-Kauffman P.E. Ensyne immunoassay for staphylococcal enterotoxin A // J. Assoc. Off. Anal. Chem.-1980.-№63.-P.1138-1143.
12. Sommerfeld P., Terplan G. Methoden sum Nachweis von Staphylokokken enterotoxinen.//Arch. Lebensmit.-1975.-№26.-P.128-137.