Государственная
Комисссия
СМ СССР по продовольствию и закупкам
107139, Москва, Б-139,
Орликов пер., I/II.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель начальника Главного Управления ветеринарии с Государственной ветеринарной инспекцией при Государственной комиссии СМ СССР по продовольствию и закупкам
В.А.Седов
25 сентября 1990

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по лабораторной диагностике стрептококкоза животных

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

I.I. Стрептококкоз - инфекционная болезнь , вызываемая стрептококками различных серологических групп и поражающая животных всех видов и возрастов.

Стрептококки, патогенные для животных, вызывают у молодняка, как правило, острые инфекции со значительным охватом поголовья(мыт, цервикальный лимфаденит, менинго-энцефалит, артрозо-артрит и др.) (см. Приложение I).

Тяжесть течения болезни и летальность зависят как от внешних факторов, так и от индивидуальных особенностей организма. У взрослых животных болезнь может протекать бессиптомно или проявляться в виде абортов, метритов и маститов.

I.2. Возбудители болезни относятся к роду *Streptococcus* , который включает более 20 серологических групп стрептококков, Различающихся антигенными свойствами и обозначаемых заглавными буквами латинского алфавита.

Кроме указанных в Приложении I, от животных выделяется стрептококки серогрупп A, G,K,M,O,P,R,S, а также пневмококки.

I.3. Микроорганизмы, относящиеся к роду *Streptococcus* ,- сферические или овоидные клетки, располагающиеся парами или цепочками различной длины, как правило, неподвижны, спор не образуют,каталазоотрицательные, аэробы или факультативные анаэробы,по Граму окрашиваются всегда положительно, при ферментации глюкозы никогда не выделяют газа.

I.4. Кроме стрептококков от животных часто выделяют другие грамположительные кокки, первичную дифференциацию которых проводят в соответствии с Приложением 2.

gost.e-ecolog.ru

I.5. Диагноз на стрептококкоз устанавливают по результатам лабораторных исследований с учетом эпизоотологических клинических данных.

I.6. Лабораторная диагностика стрептококкеза включает микроскопию мазков-отпечатков, выделение культур стрептококков с последующей их идентификацией.

I.7. Материалом для лабораторного исследования служат головной и костный мозг, кровь сердца, селезенка, печень, суставная жидкость, содержимое абсцессов павших или вынужденно убитых животных, головной мозг и кровь сердца абортированного плода, сперма, молоко, при метрите - истечения из шейки матки.

Взятие и доставку материала осуществляют в соответствии с действующими правилами взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования.

Патологический материал должен быть взят и исследован в течение 6 часов, а при условии хранения его в охлажденном состоянии - I0-I2 ч

2. ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУРЫ СТРЕПТОКОККОВ

2.I. Высевы из патологического материала делают пастеровской пипеткой в мясо-пептонный бульон с I% глюкозы и I0% инактивированной нормальной сыворотки лошади и на мясо-пептонный агар с I% глюкозы 5-I0% дефибринированной крови барана или кролика. Посевы инкубируют в термостате при 37-38°С в течение I8-24 часов.

2.2. На глюкозо-кровяном агаре стрептококки растут в виде мелких росинчатых, прозрачных или слегка мутноватых колоний с ровными краями, окруженных, как правило, зоной гемолиза.

В препаратах из культуры с плотной питательной среды стрептококки располагаются парами, короткими цепочками, иногда образуют скопления.

В мазках из бульонных культур стрептококки располагаются в основном цепочками различной длины.

3. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СТРЕПТОКОККОВ

3.I. Для предварительной дифференциации стрептококков от других кокков пользуются данными Приложения 2.

3.2. Для дифференциации стрептококков от стафилококков используют каталазную пробу.

Для постановки каталазной пробы на предметное стекло наносят каплю свежеприготовленного 3%-ного раствора перекиси водорода. Бактериологической петлей снимают одну или несколько колоний тестируемых микроорганизмов и растирают их в капле перекиси водорода. Стафилококки, в отличие от стрептококков, образуют каталазу и вызывают пенообразование.

3.3. Для предварительной идентификации стрептококков, пневмококков и энтерококков (стрептококки группы Д) используют признаки, указанные в таблице.

Серологическая группа стрептококков	Гемолиз	Рост на среде с 10% желчи	Рост на среде с 40% желчи	Рост на среде с 6,5% хлорист. натра	Характер роста в жидкой питательной среде	Ферментация раффинозы	Ферментация сорбита	Ферментация маннита
A	β	+	–	–	диффузный	–	–	–
B	α	+	–	–	придонный	–	–	–
C	β	+	–	–	придонный	–	–	–
Д	α	+	+	+	диффузный	–	–	+
E	β	+	–	–	диффузный	–	+/–	+
F	β	+	–	–	диффузный	–	+/–	–
G	β	+	–	–	диффузный	–	–	–
K	β	+	–	–	диффузный	–	–	–
L	β	+	–	–	придонный	–	–	–
N	α	+	–	–	диффузный	–	–	–
O	β	+	–	–	диффузный	+	–	–
P	β	+	–	–	диффузный	–	+	+
R	α	+	–	–	диффузный	+	–	–
RS	α	+	–	–	диффузный	+	–	–
S	α	+	–	–	диффузный	+	–	–
Рпеимос.	α	–	–	–	диффузный	+	–	–

Обозначения: "+" – рост (ферментация) имеется
"–" – рост(ферментация) отсутствует
"+/–" – признак не постоянный

3.3.I. Гемолиз. По характеру гемолиза стрептококки делят на три группы:

α– гемолитические стрептококки – вызывают неполный гемолиз эритроцитов, характеризующийся образованием вокруг колоний зеленоватой зоны гемометаморфоза;

β – гемолитические стрептококки – вызывают полный гемолиз эритроцитов, характеризующийся образованием вокруг колоний зоны полного просветления;

γ– стрептококки – не вызывают гемолиза эритроцитов.

3.3.2. Рост на среде с I0% желчи.

В 2 пробирки с глюкозо-сывороточным бульоном(в одну из которых добавлено I0% желчи крупного рогатого скота, вторая – контрольная, без желчи) вносят по 0,5–0,7 $см^3$ суточной бульонной культуры и выдерживают при 37–38°С в течение одного часа.

В случае лизиса культуры содержимое опытной пробирки просве

3.3.3. Рост на среде с 40% желчи. Чистую культуру стрептококков засевают в глюкозо-сывороточный бульон, содержащий 40% желчи крупного рогатого скота, и инкубируют при 37-38°С в течение 18-24 часов, после чего учитывают наличие или отсутствие роста.

3.3.4. Рост на среде с 6,5% хлористого натрия. Чистую культуру стрептококков засевают в глюкозо-сывороточный бульон, содержащий 6,5% хлористого натрия. Учет результатов проводят через 18-24 ч инкубирован при 37-38°С по наличию или отсутствию роста.

3.3.5. Ферментативные свойства. Для определения ферментативных свойств выделенных культур стрептококков используют: среды Гисса с раффинозой, сорбитом, маннитом. Посевы инкубируют при 37-38°С 18-24 ч, после чего проводят учет результатов.

3.4. При выделении культуры стрептококков серологической группы Д следует определить разновидность энтерококков, поскольку кроме патогенных *Str. faecalis* в эту группу входит и *Str. faecium*, являющийся облигатным обитателем кишечника человека и животных. Для этого используют среду с теллуритом калия или энтерококковую дифференциально-диагностическую среду. Культуры *Str. faecalis* устойчивы к теллуриту калия (0,07%) и хорошо растут на плотной среде в его присутствии, образуя колонии черного цвета. Культуры *Str. faecium* на этой среде не растут.

На энтерококковой дифференциально-диагностической среде через 14-18 ч роста колонии *Str. faecalis* приобретают вишнево-красный цвет, а колонии *Str. faecium* остаются бесцветными или белыми.

4. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СТРЕПТОКОККОВ

4.1. Для установления серогрупповой принадлежности стрептококков используют стрептококковые групповые преципитирующие сыворотки.[ж]

Данные таблицы 3, а также характеристика наиболее широко распространенных стрептококкозов (Приложение 2) служат отправными точками при выборе необходимой сыворотки.

4.2. Серогрупповую принадлежность стрептококков определяют в реакции преципитации в капиллярах.

[ж] Стрептококковые групповые преципитирующие сыворотки изготавливает и высылает по заявкам ВГНКИ ветпрепаратов.

4.3. Приготовление антигена для постановки реакции преципитации.

4.3.I. Испытуемые культуры стрептококков выращивают в мясо-пептонном бульоне или бульоне Хоттингера с I% глюкозы при температуре 37-38°С в течение I8-20 часов.

4.3.2. Выращенные культуры в объеме 7-9 $см^3$ переносят в стеклянные центрифужные пробирки вместимостью I2-I5 $см^3$ и центрифугируют при 3500-4000 об/мин в течение 25-30 минут.

4.3.3. После окончания центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 0,3-0,4 $см^3$ 0,2N раствора соляной кислоты, тщательно взбалтывают и помещают эту суспензию в кипящую водяную баню на I0 минут.

4.3.4. После охлаждения пробирки под струей водопроводной воды к ее содержимому добавляют одну каплю 0,04%-ного спиртового раствора фенолфталеина (индикатор) и нейтрализуют 0,2N раствором едкого натра, добавляя этот раствор по одной капле и доводя окраску смеси до бледно-розовой.

4.3.5. Затем смесь вновь центрифугируют при 3500-4000 об/мин. в течение 25-30 мин до получения прозрачной надосадочной жидкости, которую используют в качестве антигена для постановки реакции преципитации

4.4. Постановка реакции преципитации.

4.4.I. Для постановки реакции преципитации используют стеклянные капилляры или тонко оттянутые кончики пастеровских пипеток диаметром 0,5-I,0 мм.

4.4.2. Капилляр опускают во флакон с сывороткой и набирают в него небольшое количество сыворотки (около I,0-I,5 см длины капилляра), закрывая отверстие капилляра указательным пальцем.

4.4.3. Удаляют ватой излишки сыворотки с наружной стороны капилляра, погружают его в пробирку с антигеном и набирают в капилляр равное количество антигена, чтобы общее количество сыворотки и антигена занимало около 2,0-3,0 см его длины.

4.4.4. Перевернув капилляр, достигают того, чтобы смесь сыворотки с антигеном оказалась в середине капилляра, после чего капилляр вставляют в пластилиновую пластинку,

4.4.5. Результаты реакции учитывают через пять минут на темном фоне при ярком освещении.

Положительная реакция характеризуется образованием хлопьев или резким помутнением в середине столбика сыворотки и антигена.

При отрицательной реакции смесь сыворотки и антигена остается прозрачной.

4.4.6. При постановке реакции необходимо обратить внимание на следующие положения:

- антиген,сыворотка, растворы соляной кислоты и едкого натра должны быть абсолютно прозрачными;

- растворы соляной кислоты и едкого натра готовят не реже одного раза в два месяца;

- если в результате перетитровки едким натром окраска антигена стала малиновой, следует добавить 1-2 капли 0,2% раствора соляной кислоты;

- сыворотка и антиген в капилляре должны слиться. В случае, если между ними образовался пузырек воздуха, следует взять другой капилля и повторить реакцию.

5. ДИАГНОЗ

5. Лабораторный диагноз на стрептококкоз считают установленным в случае выделения из исследуемого материала культуры стрептококков соответствующей группы.

6. Одновременно с результатами идентификации стрептококков в хозяйство сообщают также данные о чувствительности выделенных культур к антибиотикам.

7. Все культуры, не идентифицирующиеся входящими в набор сыворотками, следует направлять во Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов по адресу: 123022,г.Москва, Звенигородское шоссе, 5.

ж ж ж

С утверждением настоящих Методических указаний утрачивают силу Методические указания по лабораторной диагностике стрептококкоза животных и лабораторным исследованиям на пневмококковую инфекцию животных, утвержденные Главным управлением ветеринарии соответственно 30 августа 1983 г. и 5 января 1984 г.

Приложение I.

Наиболее распространенные стрептококкозы и их возбудители

Наименование болезни	Серологическая группа
Мастит животных	B, C, E
Артрозо-артрит поросят, полиартрит ягнят, мыт лошадей, стрептококкоз кур, пушных зверей, морских свинок	G
Энтерококковая инфекция телят, ягнят, поросят, стрептококкоз кур	Д
Цервикальный лимфаденит свиней	E
Сепсис свиней	I
Менинго-энцефалит поросят отъемного возраста	R
Менинго-энцефалит поросят подсосного возраста	S

Приложение 2.

Отличительные особенности родов семейства
Streptococcaceae

Наименование рода	Характерные признаки
Streptococcus	Клетки делятся в одной плоскости. Глюкозу ферментируют до образования молочной кислоты без выделения углекислого газа.
Leuconostoc	Клетки делятся в одной плоскости. Глюкозу ферментируют с образованием углекислого газа.
Pediococcus	Клетки делятся в двух плоскостях, образуя тетрады. Глюкозу ферментируют до образования молочной кислоты без выделения углекислого газа.
Aerococcus	Клетки делятся в двух плоскостях, образуя тетрады. Глюкозу ферментируют до образования молочной кислоты без выделения углекислого газа.
Gemella	Клетки делятся в одной плоскости. По Граму окрашиваются негативно.

Приложение 3.

РЕЦЕПТЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

I. Глюкозо-сывороточный бульон. В свежеприготовленный мясо-пептонный бульон, содержащий I% глюкозы (pH 7,4-7,6), соблюдая правила стерильности, добавляют I0% нормальной инактивированной сыворотки крови лошади и асептично разливают в стерильные пробирки по 5-7 $см^3$:

Сыворотку инактивируют прогреванием в течение 30 мин в водяной бане при 56°С.

2. Глюкозо-кровяной агар. К расплавленному и стерильному 2%-ному мясо-пептонному агару, охлажденному до 45°С (не выше), содержащему I% глюкозы, прибавляют 5-I0% дефибринированной, стерильно взятой крови кролика или барана. Кровь добавляют в среду, соблюдая правила стерильности. Приготовленную среду разливают в стерильные чашки Петри (предварительно нагретые в термостате), дают застыть и подсушивают в термостате. Слой агара должен быть равномерно окрашен в красный цвет.

3. Желчный бульон. К мясо-пептонному бульону добавляют нативную желчь крупного рогатого скота и устанавливают pH среды 7,4-7,6. Для получения I0%-ного желчного бульона к 90$см^3$ МПБ прибавляют I0 $см^3$ желчи, для получения 40%-ного - к 60 $см^3$ МПБ прибавляют 40 $см^3$ желчи.

Приготовленный желчный бульон разливают в пробирки по 5-7 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве 20-30 мин при II3-II5°С (0,6-0,7 атм).

4. Среда с 6,5% хлорида натрия. В I00 $см^3$ МПБ в количестве 6,0 г хлорида натрия, после его растворения разливают в пробирки по 5-7 $см^3$ и стерилизуют в течение 20-30 мин при I атм.

5. Среда с теллуритом калия. К мясо-пептонному агару, охлажденному до 45-50°С, добавляют из расчета на I000 $см^3$ - 50$см^3$ инактивированной нормальной сыворотки крови лошади, 0,I г налидиксовой кислоты (неграм или невиграмон) и 0,7 г(35 $см^3$ 2%-ного водного раствора) теллурита калия. Среду перемешивают и разливают в чашки.

6. Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда. К мясо-пептонному агару, охлажденному до 45-50°С, перед употреблением кроме I% глюкозы и 5% дефибринированной крови добавляют из расчета на I000 $см^3$: ТТХ(2,3,5-трифенилтетразолий хлорид) 0,I г , 0,0I%-ный водный раствор кристаллического фиолетового- I2,5 $см^3$, налидиксовой кислоты- 0,I г, стерильного обезжиренного молока - 200 $см^3$:

ТТХ и налидиксовую кислоту предварительно растворяют в небольшом количестве стерильного бульона.

gost.e-ecolog.ru