

УДК: 614.31

## МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Боталов Н.С.<sup>1</sup>, Чепкасова Н.И.<sup>1</sup>, Некрасова Ю.Э.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия

Боталов Н.С. (Botalov N.S.) – студент медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО “Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера” Минздрава России

Чепкасова Н.И. (Cherkasova N.I.) – студентка медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО “Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера” Минздрава России;

Некрасова Ю.Э. (Nekrasova J.E.) – студентка медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО “Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера” Минздрава России;

Для корреспонденции: Боталов Никита Сергеевич, г. Пермь, ул. Луначарского 74а, e-mail: [nikitabotalov@gmail.com](mailto:nikitabotalov@gmail.com), тел: 89519544113.

### Специальность 03.00.07 – Микробиология

Питание является одним из важнейших факторов, определяющих здоровье населения. Правильное питание способствует профилактике заболеваний, повышению работоспособности, создает условия для адекватной адаптации к окружающей среде.

Одним из важнейших показателей, характеризующих качество и безопасность продовольственного сырья и продуктов питания, является контаминация их микроорганизмами. Учитывая особую значимость продуктов питания в возникновении острых кишечных инфекционных заболеваний и бактериальных пищевых отравлений, уделяется пристальное внимание мониторингу за микробиологической чистотой продовольственного сырья и пищевых продуктов.

Ведущее место в санитарно-бактериологических исследованиях является выполнение исследований продовольственного сырья и пищевых продуктов. Стафилококки – одна из ведущих причин микробных пищевых отравлений. Стафилококки вызывают множество инфекций в организме человека, в том числе поверхностные и глубокие гнойные инфекции, интоксикации, инфекции мочевых путей.

Важнейшим патогенным стафилококком является Золотистый стафилококк – *Staphylococcus aureus* – стойкий, высоковирулентный, легко приобретающий устойчивость к антимикробным препаратам возбудитель инфекции. *Staphylococcus aureus* является одним из важнейших возбудителей инфекций человека и вызывает более 100 нозологических форм заболеваний.

Золотистый стафилококк может размножаться в продуктах питания. Чаще всего, в кондитерских изделиях и молочных продуктах, в мясных изделиях (полуфабрикаты и колбасы), в рыбе (слабосоленая, консервы).

Сам микроорганизм не представляет угрозы для человека. Он быстро погибает в желудке под воздействием соляной кислоты. Но в процессе жизнедеятельности золотистый стафилококк выделяет энтеротоксин, который накапливается в продуктах питания. Попадая в желудочно-кишечный тракт, этот токсин вызывает симптомы пищевого отравления.

Ключевые слова: пищевые продукты, *Staphylococcus aureus*, пищевые токсикоинфекции, стафилококковый энтеротоксин А.

# METHODS OF IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF QUANTITY OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN FOODSTUFFS

**Botalov N.S.<sup>1</sup>, Chepkasova N.I.<sup>1</sup>, Nekrasova J.E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia*

Nutrition is one of the most important factors determining the health of the population. Proper nutrition contributes to the prevention of disease, improving efficiency, creating conditions for adequate adaptation to the environment.

One of the most important indicators characterizing the quality and safety of food raw materials and food products is contamination by microorganisms. Given the special importance of food in the emergence of acute intestinal infectious diseases and bacterial food poisoning, close attention is paid to monitoring the microbiological purity of food raw materials and food products.

The leading place in sanitary and bacteriological research is the implementation of studies of food raw materials and food products. Staphylococcus is one of the leading causes of microbial food poisoning. Staphylococcus cause a lot of infections in the human body, including superficial and deep purulent infections, intoxications, urinary tract infections.

The most important pathogenic staphylococcus is Staphylococcus aureus - resistant, highly virulent, easily acquiring resistance to antimicrobial drugs, the causative agent of infection. Staphylococcus aureus is one of the most important pathogens of human infections and causes more than 100 nosological forms of diseases.

Staphylococcus aureus can reproduce in food. Most often, in confectionery and dairy products, in meat products (semi-finished products and sausages), in fish (slightly salted, canned).

The microorganism itself does not pose a threat to man. He quickly dies in the stomach under the influence of hydrochloric acid. But in the process of life, Staphylococcus aureus produces an enterotoxin that accumulates in food. Getting into the gastrointestinal tract, this toxin causes symptoms of food poisoning.

Keywords: foodstuffs, Staphylococcus aureus, foodborne illness, staphylococcal enterotoxin A.

Основными источниками обсеменения стафилококками пищевых продуктов являются люди и животные с гнойно-воспалительными процессами (абсцессы, фурункулы, гнойные раны и др.), а также носители этих микроорганизмов. Перенос стафилококков от людей на пищевые продукты может происходить воздушно-капельным путем, при непосредственном контакте людей с продуктами, оборудованием, в процессе убоя скота и разделки туш.

Чаще всего причиной стафилококковых токсикозов является употребление молока, мяса и мясных изделий, кондитерских изделий с заварным кремом и др., контаминированных патогенными стафилококками. Органолептические свойства продуктов, в которых размножаются стафилококки и накапливаются энтеротоксины, не изменяются [2].

Энтеротоксигенные стафилококки размножаются в пищевых продуктах даже при содержании в них около 40% влаги. Они могут развиваться в продуктах, содержащих от 7% до 12% хлорида натрия. Сахар угнетает развитие стафилококков при концентрациях 30–40%. Некоторые микроорганизмы (*B. cereus*, дрожжи из рода *Candida* и др.) оказывают на стафилококки стимулирующий эффект (они усиливают образование энтеротоксина).

Энтеротоксин стафилококков обладает высокой термоустойчивостью. Инактивирование (разрушение) токсина происходит только через 2,5–3 часа кипячения. При автоклавировании (120°C) токсин разрушается через 20 мин. При благоприятных температурных условиях энтеропатогенные стафилококки быстро размножаются в

продуктах и продуцируют токсин. Пищевые токсикозы, вызванные энтеропатогенными стафилококками, протекают в форме острого гастроэнтерита, сопровождающегося рвотой, реже диареей, головной болью. Инкубационный период очень короткий – от 30 мин до 6 ч. Длится заболевание один, реже – два, три дня [1].

Выявление и определение количества этих микроорганизмов в пищевых продуктах проводят в соответствии с ГОСТ 31746-2012. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*.

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, кроме молока и молочных продуктов, и устанавливает методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus* посевом: в жидкую селективную среду (с предварительным обогащением) и на (в) агаризованные селективно-диагностические среды [4].

Метод определения наиболее вероятного числа (НВЧ) коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus* посевом в жидкую селективную среду предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта менее 150 или в 1 см жидкого продукта менее 15 колониеобразующих единиц (КОЕ) коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus*.

Метод определения количества коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus* посевом на агаризованные селективно-диагностические среды предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта более 1500 или в 1 см жидкого продукта более 150 КОЕ коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus* [4].

Метод выявления и метод НВЧ - определение количества коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus* посевом с предварительным обогащением основаны на высевах навески продукта и (или) разведений навески продукта в жидкую селективную среду, инкубировании посевов, пересеве культуральной жидкости на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды, подтверждении по биохимическим признакам принадлежности выделенных типичных и (или) атипичных колоний к коагулазоположительным стафилококкам и *S. aureus*.

При пересеве на агаризованную среду с кроличьей плазмой и бычьим фибриногеном выросшие типичные колонии без подтверждения по биохимическим признакам относят к коагулазоположительным стафилококкам.

Определенное количество жидкого продукта или определенное количество исходной суспензии при использовании продукта другой консистенции вносят в жидкую селективную питательную среду [6].

Перед посевом анаэробные условия в среде создают кипячением при  $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 15 мин, наслоением агара или парафина в каждую пробирку после посева, а также с помощью альтернативной процедуры - инкубирования пробирок в емкости или инкубаторе в анаэробных условиях.

Пробирки с посевами инкубируют при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 24-48 ч. Предположительное присутствие коагулазоположительных стафилококков на Жиолитти-Кантони бульоне определяется по редукции теллурита калия, а на глюкозном или солевом бульоне - по помутнению среды [3].

Поверхность одной из агаризованных селективно-диагностических сред (Байрд-Паркер агара, молочно-солевого, яично-желточно-азидного, яично-желточно-солевого агара, агара с кроличьей плазмой и бычьим фибриногеном), инокулируют из предположительно положительных пробирок после 24 ч и все оставшееся пробирки после 48 ч.

Чашки Петри с посевами инкубируют при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 24-48 ч. Предположительное присутствие коагулазоположительных стафилококков определяется по редукции теллурита калия и яично-желточной реакции (лецитиназной активности) [7].

На агаре с кроличьей плазмой и бычьим фибриногеном после инкубирования присутствие коагулазоположительных стафилококков определяется по типичным колониям, показавшим специфичную реакцию (бычий фибриноген/кроличья плазма).

Подтверждение принадлежности типичных и (или) атипичных колоний к коагулазоположительным стафилококкам проводят по изучению отношения выявленных микроорганизмов к окраске по Граму, определению присутствия у них каталазы и коагулазы.

Подтверждение принадлежности коагулазоположительных стафилококков к *S. aureus* проводят по определению образования ацетона, определению ферментации в аэробных условиях мальтозы и, при необходимости, определению термостабильной нуклеазы и гемолитической активности. Результаты выявления коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus* выражают: "обнаружены" или "не обнаружены"[5].

Метод НВЧ - определение количества коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus*. Навески продукта и (или) серию разведений навески продукта вносят в жидкую

селективную питательную среду. Наиболее вероятное число коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus* в 1 см или в 1 г продукта определяют для подтвержденных посевов, пользуясь НВЧ-таблицей по ГОСТ 26670.

Методы определения количества коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus* посевом на (в) агаризованные селективно-диагностические среды основаны на высеве навески продукта и/или разведения навески продукта на (в) агаризованную селективно-диагностическую среду, инкубировании посевов, подсчете типичных и (или) атипичных колоний, подтверждении по биохимическим признакам принадлежности выделенных колоний к коагулазоположительным стафилококкам и *S. aureus* [4].

Проводят посев определенного количества жидкого продукта или определенное количество исходной суспензии при использовании продукта другой консистенции на (в) агаризованную селективно-диагностическую питательную среду на две параллельные чашки Петри. Аналогично проводят посев десятикратных разведений испытуемого продукта. Посевы в чашках Петри инкубируют при температуре 37 °С в течение 24-48 ч.

Количество коагулазоположительных стафилококков в 1 см или 1 г продукта определяют по числу типичных и/или атипичных колоний, выросших на чашках Петри, принадлежность которых к коагулазоположительным стафилококкам подтверждена путем определения отношения микроорганизмов из этих колоний к окраске по Граму, наличия у них каталазы и коагулазы [3,4].

При посеве в (на) агаризованную среду с кроличьей плазмой и бычьим фибриногеном определяют только типичные колонии и без подтверждения по биохимическим признакам их относят к коагулазоположительным стафилококкам.

Количество *S. aureus* в 1 см или 1 г продукта определяют исходя из количества коагулазоположительных стафилококков, принадлежность которых к *S. aureus* подтверждена по образованию ацетона, определению ферментации в аэробных условиях мальтозы и, при необходимости, определению термостабильной нуклеазы и гемолитической активности.

При выявлении коагулазоположительных стафилококков в определенной навеске исследуемого продукта или его эквивалентном разведении с предварительным обогащением эту навеску или разведение вносят в одну из питательных сред [6,7].

Перед использованием Жиолитти-Кантони бульон прогревают кипячением при  $(100\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 15 мин для удаления воздуха. Охлаждают до  $44^\circ\text{C}$  -  $47^\circ\text{C}$  и с соблюдением правил асептики прибавляют раствор теллурита калия.

В 10 см модифицированного Жиолитти-Кантони бульона нормальной концентрации или сред вносят 1 см жидкого продукта или 1 см исходной суспензии (т.е. 0,1 г или 0,1 см продукта). После посева навески продукта и (или) его разведений на поверхность Жиолитти-Кантони бульона осторожно наслаивают слой стерильного голодного агара или слой стерильного парафина и охлажденных до температуры  $44^\circ\text{C}$  -  $47^\circ\text{C}$ , дают полученному слою агара или парафина застыть и герметично закрывают.

Соотношение между количеством высеваемого продукта или его разведением и питательной средой нормальной концентрации 1:10. При использовании среды двойной концентрации соотношение между количеством высеваемого продукта или его разведением и питательной средой 1:1 [3].

Если при последующем подтверждении принадлежности коагулазоположительных стафилококков к *S. aureus* не определяют наличие термостабильной нуклеазы и гемолитической активности, то допускается проводить посев в Жиолитти-Кантони бульон без прогрева перед посевом и без наслаивания голодного агара или парафина после посева.

Посевы инкубируют при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24\pm 2)$  ч. Если появилось почернение или черный осадок в Жиолитти-Кантони бульоне или помутнение в солевом или сахарном бульоне, то проводят подтверждение принадлежности выросших микроорганизмов к коагулазоположительным стафилококкам. Если почернения, черного осадка или помутнения нет, то посевы инкубируют еще  $(24\pm 2)$  ч [2].

Для получения изолированных колоний стерильной петлей делают пересевы культур из каждого посева на поверхность чашки Петри с одной из агаризованных селективно-диагностических сред: Байрд-Паркер агара, Байрд-Паркер агара с кроличьей плазмой и бычьим фибриногеном, молочно-солевого агара, яично-желточно-азидного агара или яично-желточно-солевого агара. Пересевы проводят также из пробирок, в которых нет видимых признаков роста.

Чашки Петри с пересевами инкубируют в термостате при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24\pm 2)$  ч или  $(48\pm 2)$  ч. После 24 ч инкубирования чашек Петри по отмечают на дне чашек присутствие типичных и атипичных для коагулазоположительных стафилококков колоний [1].

На Байрд-Паркер агаре после инкубирования в течение 24 ч коагулазоположительные стафилококки образуют типичные колонии черного или серого цвета, блестящие и выпуклые, окруженные прозрачной зоной, диаметр колоний около 1,0-1,5 мм и до 1,5-2,5 мм после инкубирования в течение 48 ч. После инкубирования в течение 24 ч непосредственно около колонии в прозрачной зоне может появиться опалесцирующее кольцо, окружающее колонию.

Принадлежность выявленных коагулазоположительных стафилококков к *S. aureus* проводят по определению их способности образовывать ацетон и ферментировать мальтозу в аэробных условиях [5].

Определение образования ацетона (реакция Фогес-Проскауера). Культуру высевает в пробирки со средой Кларка. Посевы инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 48 ч. После инкубирования посевов к 1 см отобранной культуральной жидкости прибавляют 0,6 см раствора - нафтола и 0,2 см раствора гидроокиси калия. Появление розового окрашивания через 15-60 мин указывает на положительную реакцию. *S. aureus* образует ацетон.

Определение ферментации мальтозы в аэробных условиях. Способность ферментации мальтозы в аэробных условиях определяют с целью дифференциации *S. aureus* от других коагулазоположительных видов *S. intermedius* и *S. hyicus*. Для определения ферментации мальтозы в аэробных условиях культуры, подлежащие исследованию, высевает уколом петлей в среду Гисса с мальтозой. Посевы инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 48 ч. При ферментации мальтозы в аэробных условиях с образованием кислоты цвет среды Гисса изменяется. *S. aureus* ферментирует мальтозу в аэробных условиях [4].

Оценка результатов подтверждения принадлежности коагулазоположительных стафилококков к *S. aureus*. Если коагулазоположительные стафилококки образуют ацетон и сбраживают мальтозу в аэробных условиях, то считают, что выявленные коагулазоположительные стафилококки относятся к *S. aureus*. Для биохимической идентификации допускается использование тест-систем промышленного производства, зарегистрированных на территории государства, принявшего стандарт.

Оценка результатов посевов в жидкие среды. При определении НВЧ коагулазоположительных стафилококков или *S. aureus* или при их выявлении в определенной навеске продукта посевы считают положительными (то есть коагулазоположительные

стафилококки или *S. aureus* выявлены в испытуемой навеске продукта), если при последующем пересеве на агаризованные селективно-диагностические среды и подтверждении типичных и (или) атипичных колоний, выросших на этих средах, хотя бы в одной колонии будут обнаружены коагулазоположительные стафилококки или *S. aureus* [6].

Результаты выявления коагулазоположительных стафилококков или *S. aureus* записывают: обнаружены (не обнаружены) в 1 г (см<sup>3</sup>) продукта; масса или объем продукта, в котором выявляли коагулазоположительные стафилококки или *S. aureus*.

Если на двух чашках Петри при посеве 0,1 см<sup>3</sup> исследуемой пробы жидкого продукта или исходной суспензии продукта другой консистенции не обнаружено колоний коагулазоположительных стафилококков или *S. aureus*, то результат выражают следующим образом:

| Наименование тестов                                                                                                                                                                                                                        | <i>S. aureus</i>         |                      | <i>S. delphini</i> | <i>S. hyicus</i> | <i>S. intermedius</i> | <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>Coagulans</i> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------|------------------|-----------------------|----------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                            | subsp. <i>anaerobius</i> | subsp. <i>aureus</i> |                    |                  |                       |                                              |
| Образование ацетона                                                                                                                                                                                                                        | -                        | +                    | -                  | -                | -                     | +                                            |
| Ферментация мальтозы в аэробных условиях                                                                                                                                                                                                   | +                        | +                    |                    | -                | w                     | -                                            |
| Примечание - "+" означает, что 90% или более штаммов положительные; "-" означает, что 90% или более штаммов отрицательные; "w" означает, что реакция слабая; "отсутствие обозначения" означает, что определение показателя не проводилось. |                          |                      |                    |                  |                       |                                              |

- менее 10 КОЕ коагулазоположительных стафилококков или *S. aureus* в 1 см<sup>3</sup> жидкого продукта;
- менее 10/d КОЕ коагулазоположительных стафилококков или *S. aureus* в 1 г продукта другой консистенции (d - степень разбавления исходной суспензии).
- Если высевали 1 см<sup>3</sup> пробы, то результат выражают следующим образом:
- менее 1 КОЕ коагулазоположительного стафилококков или *S. aureus* в 1 см<sup>3</sup> жидкого продукта;



- менее 1/d КОЕ коагулазоположительных стафилококков или *S. aureus* в 1 г продукта другой консистенции.

Протокол испытания должен включать: всю информацию, необходимую для полной идентификации испытуемого продукта; используемый метод отбора проб; используемый метод испытания в соответствии с настоящим стандартом; все детали операций, не установленных настоящим стандартом; полученный(е) результат(ы).

Дифференциация коагулазоположительных видов и подвидов стафилококков по двум признакам - образованию ацетона и ферментации мальтозы в аэробных условиях [7].

### Список литературы

1. Билетова Н.В., Корнелаева Р.П., Кострикина Л.Г. и др. Под ред. Любашенко и С.Я. Санитарная микробиология. - М.: Пищевая промышленность, 2010 г.
2. Корнелаева Р.П., Степаненко П.П., Павлова Е.В., Санитарная микробиология сырья и продуктов животного происхождения. - М.: 2012 г.
3. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов
4. ГОСТ 31746-2012. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*.
5. Онищенко Г.Г., Абаев И.В., Дятлов И.А., Скрыбин Ю.П. и соавт. Молекулярно-генетическая идентификация штамма *Staphylococcus aureus* — возбудителя пищевой токсикоинфекции при вспышке в Санкт-Петербурге в 2013 г. // Актуальные вопросы микробиологии. – 2014, № 9-10. – С. 33-34.
6. Прусова В.Н., Кива М.С., Клименко В.В. Микробиологический мониторинг за пищевыми продуктами по обоснованию сроков годности и условий хранения // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2013. №2-3(52). С. 94-97.
7. Прусова В.Н., Кива М.С. Микробиологический мониторинг за пищевыми продуктами // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2015. №4(62). С. 142-146.