

Действие лизатов пробиотических штаммов лактобацилл на патогенную микрофлору, выделенную при маститах у коров

И.В. Савина, К.В.Н., Р.М. Нурғалиева, К.В.Н.,
ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ

Мастит – это воспаление молочной железы, которое в зависимости от характера воспалительной реакции и степени поражения тканей молочной железы может протекать как в клинически выраженной, так и субклинической форме [1].

Широкое распространение маститов коров наносит животноводству огромный экономический ущерб, включающий в себя снижение продуктивности, преждевременную выбраковку племенных животных, падёж и вынужденный убой, заболевания и гибель молодняка, затраты на проведение лечебно-профилактических мероприятий [2].

Необоснованное применение антибиотиков при лечении маститов у коров привело к возникновению высоко резистентных штаммов микроорганизмов, поэтому в качестве альтернативы антибиотикотерапии в последние годы стали использовать пробиотические препараты. Это направление в настоящее время относится к числу приоритетных в ветеринарии.

В медицине для лечения ряда заболеваний (например, дыхательного тракта, пиодермий и др.) стали применять лизаты пробиотических препаратов. Бактериальный лизат – это продукт расщепления бактериальных клеток, включающий фрагменты клеточной стенки и их внутриклеточного содержимого. Они стимулируют презентацию антигена, фагоцитоз, усиливают продуктивность противовоспалительных цитокинов, способствуют развитию адьювантного эффекта [3].

В ветеринарную практику лизаты пробиотиков внедряются достаточно медленно, но попытки их применения для лечения пиодермий у животных дали положительный результат [4]. Наиболее эффективными оказались лизаты из пробиотических штаммов лактобацилл, обладающих широким спектром действия.

В связи с безопасностью и эффективностью лизатов лактобацилл в отношении широкого круга микроорганизмов представляется актуальным изучение их антагонистического действия на микрофлору, выделенную при маститах у коров.

Исходя из поставленной цели были обозначены следующие задачи: определить видовой состав и биологические свойства возбудителей маститов у коров; выделить из пробиотических препаратов (Эуфлорин-Л, Аципол, Лактобифидол) штаммы лактобацилл и получить их лизаты; выявить антагонистическую активность полученных лизатов в отношении микроорганизмов, выделенных из патологического материала; изучить влияние ли-

затов на факторы патогенности и персистенции выделенных микроорганизмов.

Материал и методы исследования. Материалом для исследования послужил 31 штамм микроорганизмов, выделенных из секрета молочной железы больных маститом коров, и пробиотические препараты Эуфлорин-Л, Аципол, Лактобифидол.

Отбор проб молока и их бактериологическое исследование проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по микробиологическому исследованию молока и секрета вымени для диагностики мастита» [5].

Для получения лизатов бацилл был использован метод термолиза [6]. Антагонистическую активность бактериальных лизатов определяли по зонам угнетения роста микроорганизмов [7]. sIgA-протеазная активность бактерий исследовалась по методике, предложенной О.В. Бухариным [8].

Результаты исследования. Было отобрано 26 проб молока от больных коров с клинической и субклинической формами мастита. В результате проведённого бактериологического исследования выделен и идентифицирован 31 штамм микроорганизмов. Состав выделенных микроорганизмов был представлен следующими видами: *Staphylococcus aureus* – 51,8%; *Escherichia coli* – 29%, *Streptococcus agalactiae* – 40%; *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus simulans*, *Enterococcus cosseliflavus*, *Enterococcus hirae* в равных соотношениях – по 3,2% (рис. 1).

Полученные данные по видовому составу возбудителей маститов согласуются с данными других авторов о лидирующей роли стафилококков и увеличении числа случаев колиформного мастита [9].

На следующем этапе работы у выделенных из патологического материала микроорганизмов были изучены факторы патогенности.

При изучении плазмокоагуляционной активности *S. aureus* было установлено, что выделенные культуры обладают разной степенью выраженности этого признака. В ходе исследования была определена гемолитическая активность выделенных штаммов *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. simulans*. Полученные данные свидетельствуют о том, что 80% штаммов *S. aureus* обладали гемолитической активностью (давали β-гемолиз), оставшиеся 20% штаммов гемолитической активностью не обладали. Гемолитическая активность у штаммов *S. intermedius*, *S. simulans* отсутствовала.

Исследование гемолитической активности было проведено и в отношении штаммов *E. Cosseliflavus*, *E. hirae* и *S. agalactiae*. Все штаммы обладали в-гемолитической активностью. У выделенных штаммов *E. coli* гемолитическая активность отсутствовала.

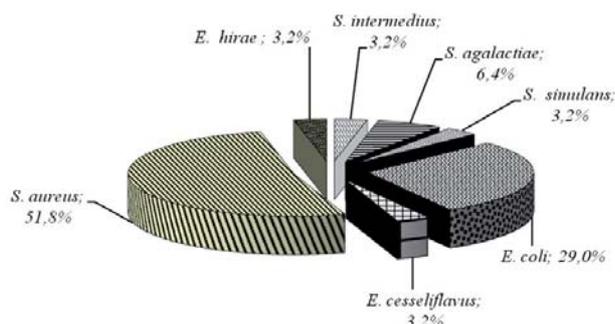


Рис. 1 – Видовой и количественный состав микрофлоры, выделенной из молока больных маститом коров

Из пробиотических препаратов Эуфлорин-Л, Аципол и Лактобифидол были выделены штаммы *Lactobacillus acidophilus*: NK-1; NK-5; NK-12. Из них методом термоллиза с последующим центрифугированием и фильтрованием через бактериальные фильтры были получены лизаты, которые контролировали на стерильность.

Антагонистическую активность бактериальных лизатов определяли по зонам задержки роста всех выделенных микроорганизмов. При изучении действия лизатов в отношении *S. aureus* наибольшую антагонистическую активность проявлял лизат штамма NK-1 *L. acidophilus* (препарат Эуфлорин-Л), наименьшую – из штамма NK-5 *L. acidophilus* (препарат Аципол) (рис. 2).

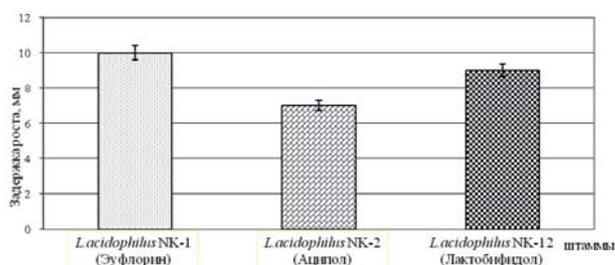


Рис. 2 – Антагонистическое действие лизатов пробиотических штаммов лактобацилл в отношении *S. aureus*

Наименьшую антагонистическую активность на *S. simulans* проявил лизат из штамма NK-5, а лизаты из штаммов NK-1 и NK-12 *L. acidophilus* оказали равнозначное действие. Исследование действия лизатов на *S. intermedius* показало картину, сходную с их влиянием в отношении *S. aureus*. Лизаты из штамма NK-1 подавляли рост *S. agalactiae* в большей степени, чем лизаты из штаммов NK-5 и NK-12 (рис. 3).

Равнозначную активность в отношении *E. coli* проявили лизаты из штаммов NK-1 и NK-12, меньшую – из штамма NK-5 (рис. 4).

Таким образом, все лизаты проявили выраженную антагонистическую активность на штаммы микроорганизмов, выделенные при маститах у коров, но наибольшей активностью обладал лизат, полученный из штамма *L. acidophilus*

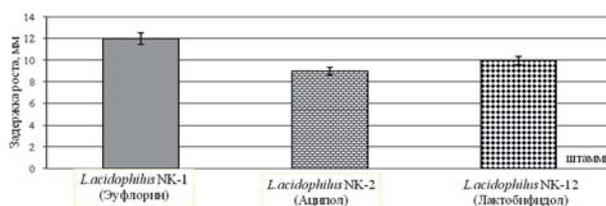


Рис. 3 – Антагонистическое действие лизатов пробиотических штаммов лактобацилл в отношении *S. agalactiae*

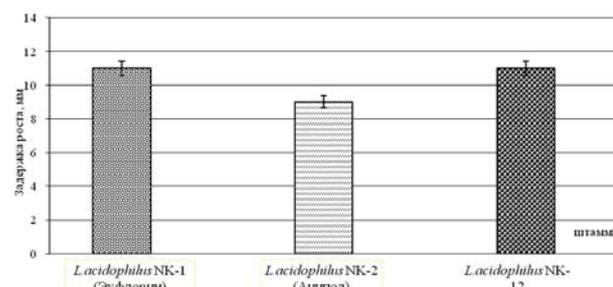


Рис. 4 – Антагонистическое действие лизатов пробиотических штаммов лактобацилл в отношении *E. coli*

NK-1 (Эуфлорин-Л), а самой низкой – лизат из штамма NK-5 (Аципол). Штаммы *S. agalactiae* и *S. intermedius* оказались более чувствительными к действию лизатов.

Поскольку наибольшую активность в подавляющем числе исследований показал лизат из штамма NK-1 *L. acidophilus* (Эуфлорин-Л), в дальнейшей работе было решено использовать только его.

Было изучено влияние лизатов на биологические свойства выделенных патогенных микроорганизмов. В результате исследования установлено, что после воздействия лизатов у всех штаммов *S. aureus*, *E. cecseliflavus*, *E. hirae* и *S. agalactiae*, ранее проявлявших свою гемолитическую активность, наблюдалось её полное отсутствие.

Лизат оказал достоверное влияние и на плазмокоагулазную активность *S. aureus*, она имела тенденцию к снижению.

Среди факторов, определяющих колонизационную резистентность микроорганизмов, важное значение имеет секреторный иммуноглобулин класса А (sIgA). sIgA-протеазная активность была отмечена у всех выделенных штаммов, но наиболее выраженной обладали штаммы *E. coli*, *E. cecseliflavus*, *E. hirae* и *S. agalactiae*.

После воздействия лизата выявлено достоверное снижение показателей sIgA – протеазной активности у всех выделенных штаммов микроорганизмов (рис. 5).

Выводы.

1. Видовой состав микроорганизмов, выделенных при маститах коров, был представлен *S. aureus*, *E. coli*, *S. agalactiae*, *S. intermedius*, *S. simulans*, *E. cecseliflavus* и *E. hirae*. Ведущая роль принадлежит *S. aureus*, *E. coli*, *S. agalactiae*. Все выделенные

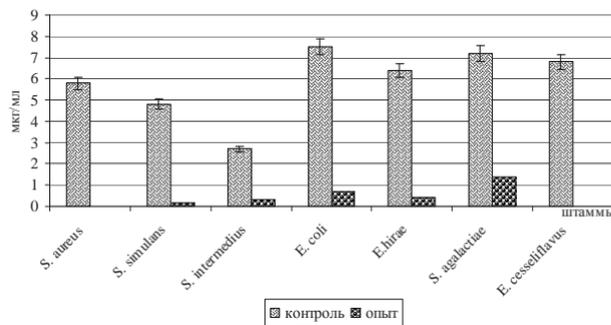


Рис. 5 – sIgA-протеазная активность выделенных штаммов до и после действия лизата *L. acidophilus* NK-1

микроорганизмы инактивировали sIgA, большая их часть обладала гемолитическими свойствами, все штаммы *S. aureus* характеризовались плазмокоагулазной активностью.

2. Наибольшая активность была отмечена у лизата, полученного из штамма NK-1 *L. acidophilus* (Эуфлорин-Л).

3. Лизат из пробиотического штамма NK-1 полностью подавлял гемолитическую активность,

существенно снижал плазмокоагулазную активность *S. aureus* и оказывал ингибирующее действие на sIgA – протеазную активность всех микроорганизмов.

Литература

- Архипов А.А. Адекватное лечение при острых маститах – залог благополучия стада // Ветеринария. 2008. №11. С. 15 – 17.
- Полянцев Н.И. Мастит коров. Ростов-на-Дону: Дон, 2005. 256 с.
- Савина И.В. Действие лизатов лактобацилл на возбудителей пиодермии животных // Вестник ветеринарии. 2015. № 74. С. 50 – 53.
- Карташова В.М. Методические рекомендации по микробиологическому исследованию молока и секрета вымени для диагностики мастита. М.: Россельхозакадемия, 1994. С. 35.
- Патент 2224792. Российская Федерация, МПК С1, 2N1/20, А61Р3 1/04. Способ получения пробиотического препарата «Лизоспорин», обладающего антибактериальным действием на пневмотропные бактерии / А.Е. Билев; заявитель и патентообладатель Самара. Самарский воен.-мед. институт № 2002116989/13; заявл. 25.06.2002; опубл. 27.02.2004.
- Осипова И.Г. Доклинические испытания новых споровых пробиотиков // Вестник РАМН. 2005. № 12. С. 36–39.
- Бухарин О.В. Диагностическое значение персистентных характеристик стафилококков при бактерионосительстве./ О.В. Бухарин, О.Л. Карташова, С.Б. Киргизова, Л.П. Потехина // Журнал микробиологии. 2007. № 5. С. 13–16.
- Головко А.Н. Этиопатогенез и терапия мастита у коров // Ветеринария. 2005. № 11. С. 35–38.
- Salminen S. Intestinal colonisation, microbiota and future probiotics // Asia Pac. J. Clin. Nutr. 2006; 15 (4): P. 558–62.