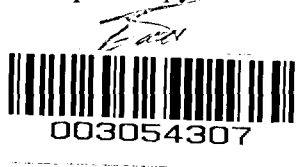


№21

На правах рукописи



БАЛА Сергей Сергеевич

**ФАКТОРЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ
МИКРОФЛОРЫ ПРИ МАСТИТАХ КОРОВ**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и
иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2007

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет» и Институте клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор **Карташова**
Ольга Львовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор **Маннапова Рамзия**
Тимергалеевна;

кандидат биологических наук,
доцент **Хазипов Рустем Барисович**

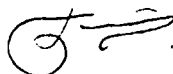
Ведущая организация: ФГОУ ВПО «Ульяновская
государственная сельскохозяйственная
академия»

Защита состоится «9» февраля 2007 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 220.003.03. ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет» (450001, г. Уфа, ул. 50 лет Октября, 34, ауд. 341/2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет»

Автореферат разослан «__» _____ 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор сельскохозяйственных
наук, профессор



М.Г. Гиниятуллин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Мастит следует рассматривать как одну из наиболее существенных и серьезных проблем в молочном скотоводстве. Заболевание широко распространено по всей территории России среди коров разных пород. Те или иные его формы охватывают значительное поголовье – 15-25 % от общего стада, а по отдельным данным и до 50 % (Сидоркин В.А., Староверов С.А., 2004).

Воспаление молочной железы приводит к снижению продуктивности, ухудшению качества молока и преждевременной выбраковке коров, поэтому необходимо проводить эффективные диагностические и лечебные мероприятия по ликвидации мастита.

Особое значение в возникновении заболевания имеет микробный фактор. Известно, что течение воспалительного процесса почти всегда сопровождается инфекцией, причем большая часть воспалений вызывается попадающими извне специфическими возбудителями, которые проникают через сосковый канал в вымя и выявляются в секрете больных его четвертей. Особую опасность при этом представляют стрептококки и стафилококки. Микроорганизмы могут быть непосредственной причиной возникновения мастита и осложнять развивающиеся процессы в вымени, возникающие в результате воздействия на молочную железу неблагоприятных факторов внешней среды (Гулина В.М., 1997).

Выживание возбудителей в организме хозяина возможно при соответствующей их адаптации к механизмам антимикробной защиты. В настоящее время широко изучается группа биологических свойств микроорганизмов, направленных на деградацию механизмов естественной резистентности хозяина (лизоцим, лактоферрин и другие) - факторов персистенции - и создающих предпосылки для развития инфекционного процесса (Бухарин О.В., 1999).

Имеются единичные работы по изучению факторов персистенции у микроорганизмов, вызывающих разные формы мастита. Так, установлено значение биологических характеристик стафилококков в формировании скрытой формы мастита (Черновой О.Л., 2001); показано, что микроорганизмы, выделенные при хроническом течении субклинической формы мастита, обладали набором факторов персистенции (АЛА и АИА) с высоким уровнем выраженности

признаков (Чернова О.Л., Комарова Н.К., Матюшина С.Б., 1997); построена математическая диагностическая модель, позволяющая диагностировать субклиническую форму мастита стафилококковой и стрептококковой этиологии (Исайкина Е.Ю., 2004).

К настоящему времени накопилось достаточно экспериментальных данных, которые дают основание сделать вывод о нарастающем распространении резистентных к антибиотикам микроорганизмов, возбудителей мастита, в результате чего большинство давно применяемых антибиотических препаратов не дают должного терапевтического эффекта. В связи с этим необходим поиск новых препаратов для лечения больных животных.

В ветеринарии и животноводстве широко применяют пробиотики – стабилизированные культуры симбионтных микроорганизмов или продукты их ферментации. Это обусловлено преимуществами перед антибиотиками и химиотерапевтическими препаратами (широкий диапазон лечебно-профилактического действия, безвредность для организма, экологическая безопасность, относительная дешевизна) (Андреева А.В., Михайлова Н.А., Ямалиев И.Ш., 2000; Буканов А.М., Маннапова Р.Т., 2003; Деблик А.Г., Деблик К.Е., Ижбулатова Д.А., 2006).

В связи с этим, известный интерес представляет с одной стороны, изучение биологических признаков, в том числе персистентных характеристик у микроорганизмов, выделенных от больных животных при разных формах мастита у коров, с другой – оценка влияния нетрадиционных методов терапии на биологические свойства микроорганизмов – возбудителей мастита.

Цель и задачи исследований. Целью исследований явилось изучение биологических свойств возбудителей с их последующей коррекцией для разработки новых способов прогнозирования развития, диагностики и лечения маститов у коров.

Для реализации этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить видовой состав и биологические свойства микроорганизмов, выделенных от здоровых животных и больных разными формами мастита коров.

2. Определить информативные биологические свойства микроорганизмов для построения диагностической модели прогнозирования развития болезни.

3. На основе комплекса информативных биологических свойств микроорганизмов разработать микробиологические критерии прогнозирования развития мастита.

4. Изучить антагонистическую активность широко применяемых спорообразующих культур пробиотиков в отношении наиболее часто встречаемых возбудителей мастита и изменения их персистентных свойств под действием пробиотиков.

5. Разработать способ местного лечения разных форм мастита у коров с использованием экспериментально отобранного эффективного пробиотика.

Научная новизна. Выявлена способность микроорганизмов, выделенных от здоровых и больных маститом животных, к инаktivации факторов естественной резистентности хозяина и представлена сравнительная оценка диагностической значимости биологических свойств микроорганизмов. Полученные данные использованы при разработке математической диагностической модели прогнозирования развития мастита и способа диагностики субклинической формы мастита у коров (Патент РФ на изобретение № 2264171 от 20 ноября 2005 года).

В эксперименте *in vitro* изучены: антагонистическая активность широко применяемых спорообразующих пробиотиков в отношении наиболее часто выделяемых возбудителей мастита, изменения персистентных свойств микроорганизмов под их влиянием и отобран наиболее эффективный пробиотик Споробактерин. Впервые проведена регуляция персистентных свойств микроорганизмов Споробактерином в экспериментальных и клинических условиях, что послужило основой для разработки качественно нового способа терапии больных животных. Обоснованы преимущества локального применения Споробактерина по сравнению с традиционной терапией антибиотиками через снижение персистентных свойств возбудителей, быстрой его элиминацией из очага нагноения и значительного сокращения сроков лечения.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные результаты расширяют представление о роли факторов персистенции микроорганизмов в течении мастита у коров и являются основой для разработки новых практических решений по диагностике, прогнозированию и терапии заболевания.

Практическое значение работы подтверждено разработкой способа диагностики субклинической формы мастита у коров (Патент РФ на изобретение № 2264171 от 20 ноября 2005 года), математической диагностической модели прогнозирования развития мастита и способа лечения маститов у коров, который апробирован и внедрен в работу СПК «За мир» Илекского района и ЗАО «Шевченко» Ташлинского района Оренбургской области.

Положения, выносимые на защиту:

1. Факторы персистенции микроорганизмов, вызывающих мастит, определяют характер течения заболевания.

2. Факторы персистенции микроорганизмов и их последующая коррекция – основа разработки новых методов прогнозирования развития и лечения маститов у коров.

Апробация работы. Результаты проведенных исследований доложены и обсуждены на международной научной конференции «Актуальные вопросы морфологии и хирургии XXI века» (Оренбург, 2001); конференции, посвященной 150 - летию Оренбургской государственной ветеринарной службы (Оренбург, 2002); международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и биологии» (Оренбург, 2003); конференции «Успехи современного естествознания (медико-биологические науки)» (Сочи, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе патент РФ на изобретение № 2264171 от 20 ноября 2005 года.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, главу по материалам и методам исследований, три главы собственных исследований, заключение, выводы. Указатель литературы содержит 220 источников литературы, из которых 159 отечественных и 61 иностранный. Текст иллюстрирован 8 рисунками и 20 таблицами.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служили микроорганизмы, выделенные из проб молока 340

животных СПК сельхозартели «За мир» Илекского района и ЗАО «Шевченко» Ташлинского района Оренбургской области. Было изучено 485 штаммов разных видов стафилококков и стрептококков, выделенных из молока 177 коров с субклинической формой мастита, 109 с клинической формой мастита и от 70 здоровых животных. Выделение и идентификацию штаммов проводили общепринятыми методами по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам (Биргер М.О., 1982). Биохимические свойства микроорганизмов выявляли с использованием тест-систем MikroLaTest (Lachema, Чехия). У выделенных штаммов изучали биологические свойства: способность коагулировать плазму, проявлять лецитовителизную, гемолитическую и лизоцимную активности (Биргер М.О., 1982). Способность стафилококков к инаktivации факторов естественной резистентности (лизоцима, интерферона, лактоферрина) изучали по методикам, описанным О.В.Бухариным с сотрудниками (1982), В.Ю.Соколовым (1990), И.В.Вальшевой с соавт. (2003). Определение антагонистической активности пробиотиков проводили методом отсроченного антагонизма (М.О.Биргер, 1982). Изучение влияния стерильных фильтратов споровых пробиотиков на антилизоцимную, антиинтерфероновую и антилактоферриновую активности микроорганизмов проводили с использованием планшетного фотометрического метода (О.В. Бухарин с соавт., 1997).

Работа по созданию модели для прогнозирования развития мастита выполнена на 340 штаммах микроорганизмов, выделенных от здоровых и больных животных. Статистическая и математическая обработка результатов проводилась общепринятым параметрическим методом вариационной статистики с использованием критерия Фишера - Стьюдента (И.П.Ашмарин, А.А. Воробьёв, 1962); непараметрическим методом критерия знаков (Е.В.Гублер, А.А.Генкин, 1973) и с применением автоматизированной системы программ: «Распределение», «Информативность», «Корреляционный анализ», «Дискриминантный анализ».

Обследованные больные животные были разделены на группы с клинической и субклинической формами мастита, сформированные по принципу аналогов (с учётом возраста, массы тела и периода лактации). Каждая из этих групп, в свою очередь, была разбита на 4-е

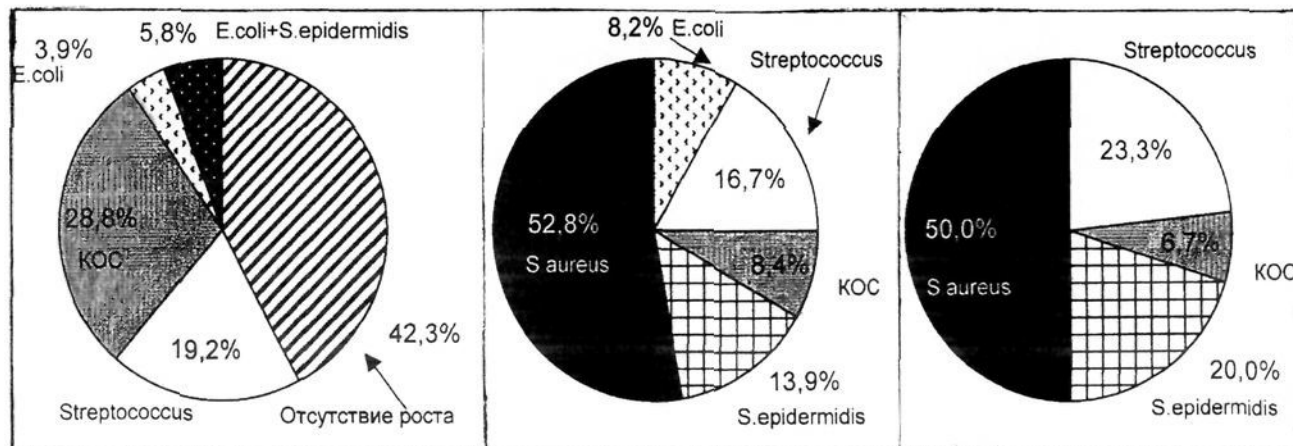
подгруппы (споробактерин вводили в количестве – 5, 10 и 15 мл), в контрольной группе применяли традиционные методы лечения. Споробактерин вводили интрацестернально (в подогретом до 38-40°C состоянии) каждые 24 часа до получения положительных клинических результатов. Оценка эффективности лечения больных животных проводилась в ближайшие и отдаленные сроки после лечения по данным общеклинического обследования и бактериологических методов исследования.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведение данной работы мы начали с расшифровки этиологической структуры заболевания. Проведенные исследования показали, что при клинической форме мастита стафилококки (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. auricularis*) были выделены в 75,1 %, энтеробактерии (*E. coli*) - в 8,2 %, стрептококки - в 16,7 % случаев. При субклинической форме заболевания существенных изменений частоты выделения бактерий не обнаружено: стафилококки (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. warneri*) - регистрировали у 76,7 %, стрептококки - у 23,3 % обследованных животных. Анализ видового спектра выделенной микрофлоры представлен на рис. 1. Установлено, что лидирующим видом являлся *S. aureus*, который наиболее часто выделяли в монокультуре (в 52,8 и 50,0 % случаев соответственно). Меньшая доля приходилась на *S. epidermidis* (13,9 % при клинической и 20,0 % - субклинической форме заболевания), а стрептококки составляли соответственно 16,7 % и 23,3 %. Среди выделенных стрептококков преобладал *Str. agalactiae* - 80,1 %; другие стрептококки были представлены следующими видами: *Str. pyogenes* (7,7 %), *Str. lactis* (5,0 %), *Str. uberis* (4,4 %) и *Str. faecium* (2,8 %).

Микроорганизмы, выделенные из молока здоровых животных, были представлены, в основном, следующими видами: КОС - *S. epidermidis*, *S. auricularis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* (28,8 % случаев); *Streptococcus* (19,2 %); а также ассоциациями *E. coli* и *S. epidermidis* в 5,8 % и *E. coli* - в 3,9 % случаев.

В настоящее время ведется поиск информативных биологических характеристик микроорганизмов, определяющих их длительное персистирование в организме. В этом плане перспективным представляется подход, основанный на регистрации и анализе у изолирован-



Здоровые животные

Клиническая форма мастита

Субклиническая форма мастита

Рис. 1. Видовая характеристика микрофлоры молока у здоровых и больных маститом коров

ных штаммов комплекса биологических свойств, направленных на инактивацию факторов естественной противоинойфекционной защиты макроорганизма и обозначенных как маркеры бактериальной персистенции (О.В. Бухарин, Б.Я.Усвятцов, 1996).

В связи с этим, мы изучили связь биологических свойств стафилококков и стрептококков, инициирующих развитие воспалительного процесса, с особенностями течения мастита (табл.1).

Таблица 1

Распространенность и выраженность биологических свойств микроорганизмов, выделенных от здоровых и больных маститом животных

Состояние животного	Микроорганизмы	Биологические свойства			
		Гемолиз	АИА (мкг/мл)	АИА (услед.)	АЛФА (мкг/мл)
Клиническая форма мастита 1 группа	Стафилококки	100%	1,62±0,02	1,38±0,04	2,96±0,08
			80,0±0,8%	75,0±0,87%	100%
	Стрептококки	100%	1,22±0,04	1,7±0,06	3,0±0,09
			86,7±0,67%	93,3±2,49%	100%
Субклиническая форма мастита 2 группа	Стафилококки	86,0±0,45 %	3,1±0,11	2,6±0,09	2,63±0,09
			100%	100%	100%
	Стрептококки	94,3±0,45 %	2,6±0,07	2,9±0,1	2,68±0,08
			100%	100%	100%
Здоровые животные 3 группа	Стафилококки	40,0±0,97 %	1,16±0,04	1,1±0,03	1,59±0,05
			60,0±0,97%	66,7±0,94%	100%
	Стрептококки	33,3±2,98 %	1,0±0,03	1,0±0,04	1,64±0,05
			77,7±1,0%	60,0±0,97%	100%

В числителе - выраженность, в знаменателе - распространенность.

При изучении АЛА у стафилококков, выявлено, что признак встречался в 100% случаев среди микроорганизмов, выделенных от 2 группы животных со средним показателем $-3,1 \pm 0,11$ мкг/мл. Штаммы стафилококков от животных 1 и 3 группы обладали данным признаком лишь в $80,0 \pm 0,8$ % и $60,0 \pm 0,97$ % случаев, со средним показателем $1,62 \pm 0,02$ и $1,16 \pm 0,04$ мкг/мл, соответственно. У стрептококков антилизотическая активность регистрировалась в 100% случаев только у микроорганизмов, выделенных от животных 2 группы (среднее значение $-2,6 \pm 0,07$ мкг/мл). Штаммы 1 и 3 групп данный признак проявляли реже ($86,7 \pm 0,67$ % и $77,7 \pm 1,0$ % случаев, соответственно) и средние показатели характеризовались более низкими значениями ($1,22 \pm 0,04$ и $1,0 \pm 0,03$ мкг/мл).

Антиинтерфероновой активностью обладали в 100 % случаев только штаммы, выделенные от животных 2 группы (со средним показателем у стафилококков $-2,6 \pm 0,09$ усл. ед. и у стрептококков $-2,9 \pm 0,1$ усл.ед.). Среди штаммов стафилококков, выделенных от животных 1 и 3 групп, признак обнаруживался в $75,0 \pm 0,87$ % и $66,7 \pm 0,94$ % случаев соответственно, причем у стафилококков, выделенных от животных 1 группы среднее значение данного показателя было выше чем у стафилококков, выделенных от животных 3 группы ($1,38 \pm 0,04$ усл.ед. и $1,1 \pm 0,03$ усл.ед. соответственно). Результаты исследования АИА стрептококков, выделенных от животных 1 и 3 групп, показали, что данное свойство регистрировалось в $75,0 \pm 0,87$ % и $60,0 \pm 0,97$ % случаев, средняя величина признака равнялась соответственно $1,7 \pm 0,06$ усл.ед и $1,0 \pm 0,04$ усл.ед.

Антилактоферриновая активность обнаруживалась у всех штаммов микроорганизмов, выделенных из молока как здоровых так и больных животных, признак обнаруживался в 100 % случаев, но с разным уровнем выраженности. Так, у стафилококков и стрептококков, выделенных из молока животных 1 группы, АЛФА имела самые высокие показатели: $2,96 \pm 0,08$ мкг/мл и $3,0 \pm 0,09$ мкг/мл соответственно. Изученные культуры стафилококков и стрептококков от животных 2 группы обладали уровнем АЛФА, равным $2,63 \pm 0,09$ мкг/мл и $2,68 \pm 0,08$ мкг/мл. Самые низкие показатели данного признака были зафиксированы у штаммов стафилококков и стрептококков, выделенных из молока здоровых

животных, величина признака соответственно составила $1,59 \pm 0,05$ мкг/мл и $1,64 \pm 0,05$ мкг/мл.

Наиболее часто (в 100 % и в $86,0 \pm 0,45$ %- $94,3 \pm 0,45$ % случаев) ($p < 0,05$) гемолизин обнаруживался у стафилококков и стрептококков, выделенных из молока коров с клинической и субклинической формой мастита. Тогда как у микроорганизмов, выделенных из молока здоровых животных, способность продуцировать гемолизин была отмечена только в $40,0 \pm 0,97$ % у стафилококков и в $33,3 \pm 2,98$ % случаев у стрептококков.

Вместе с тем, среди изученных штаммов не наблюдалось существенных отличий по лизоцимной активности и способности коагулировать плазму.

Таким образом, анализ полученных данных показал зависимость формы течения мастита от спектра исходных биологических характеристик возбудителя. Для микрофлоры, выделенной из молока коров с клинической формой мастита, было характерно выделение штаммов с гемолитической активностью и более высоким уровнем антилактоферриновой активности. При субклинической форме заболевания микрофлора была, как правило, представлена микроорганизмами, обладающими факторами персистенции в 100 % случаев и с более высокими средними значениями антилизоцимной и антиинтерфероновой активностей. Из молока здоровых коров выделялись микроорганизмы достаточно редко обладающие факторами персистенции с низким уровнем экспрессии.

Проанализированная связь биологических характеристик возбудителей маститов, в частности, их способности к инаktivации факторов естественной резистентности, с различными формами заболевания, позволила в процессе выполнения работы рассчитать математическую модель и разработать способ прогнозирования развития мастита.

В результате проведенной работы - оценки степени информативности изученных свойств, было выявлено четыре наиболее информативных показателя: гемолитическая активность, антилизоцимная активность, антиинтерфероновая активность, антилактоферриновая активность, которые составили главную информативную комбинацию. Конечным этапом математической

обработки материала явилось построение с помощью линейных дискриминантных функций модели прогнозирования развития мастита стрептококковой и стафилококковой этиологии у крупного рогатого скота:

$$Д = x_1a_1 + x_2a_2 + \dots x_na_n + C,$$

где Д - дискриминантная функция, характеризующая вероятность развития мастита; х - значение показателя в баллах; а - коэффициент показателя; С - поправочная константа.

В таблице 2 даны коэффициенты для каждого показателя и поправочные константы. Они рассчитаны на основании машинного анализа динамики их многомерных средних значений применительно к штаммам стафилококков и стрептококков, выделенным из молока здоровых и больных животных.

Для прогнозирования вероятности развития мастита, полученные у данного штамма стафилококка или стрептококка количественные значения по показателям, переводят в баллы и используют для расчета дискриминантной функции по приведенной формуле. Расчет проводится по всем строкам соответствующей таблицы.

Наибольшая величина дискриминантной функции из всех полученных будет в 95 % случаев соответствовать обозначенной на данной строке вероятности развития мастита. Примеры расчета по диагностическим моделям:

Пример 1. Исследуемый штамм *Str. agalactiae*, выделенный из молока животного, характеризовался следующими признаками: наличием гемолиза (1 балл), АЛА - 2 мкг/мл (2 балла), АИА - 2 усл.ед. (3 балла), АЛфА - 2,3 мкг/мл (2 балла). Расчет математической модели прогнозирования вероятности развития мастита по строкам таблицы следующий:

$$Д_1 = 51,3 \times 1 + 45,1 \times 2 + 28,46 \times 2 + 55,33 \times 2 + -62,26 = 246,82.$$

$$Д_2 = 93,83 \times 1 + 139,13 \times 2 + 112,69 \times 2 + 97,37 \times 2 + -384,63 = 407,58$$

$$Д_3 = 123,37 \times 1 + 65,25 \times 2 + 33,71 \times 2 + 165,79 \times 2 + -337,02 = 315,85$$

В результате проведенного расчета максимальная величина дискриминантной функции установлена на второй строке ($Д_2$), что позволяет прогнозировать высокую вероятность развития субклинической формы мастита у данного животного.

Коэффициенты показателей и поправочные константы для модели прогнозирования развития мастита стрептококковой и стафилококковой этиологии

Стрептококки					
Вероятность развития мастит	Свойства микроорганизмов				С
	Гемолиз	АЛА	АИА	АЛФА	
Низкая вероятность развития	51,3	45,1	28,46	55,33	-62,26
Высокая вероятность развития мастита субклинической формы	93,83	139,13	112,69	97,37	-384,63
Высокая вероятность развития мастита клинической формы	123,37	65,25	33,71	165,79	-337,02
Стафилококки					
Вероятность развития мастит	Свойства микроорганизмов				С
	Гемолиз	АЛА	АИА	АЛФА	
Низкая вероятность развития	131,7	25,5	36,16	61,88	-81,74
Высокая вероятность развития мастита субклинической формы	370,37	71,66	117,79	122,69	-547,37
Высокая вероятность развития мастита клинической формы	360,83	26,5	86,8	159,59	-465,87

Пример 2. Исследуемый штамм *S.aureus*, выделенный из молока животного характеризовался следующими признаками: наличие гемолиза (1 балл), АЛА –1 мкг/мл (1 балл), АИА - 1 усл. ед. (1 балл), АЛФА - 3,1 мкг/мл (3 балла). Расчет математической

модели прогнозирования вероятности развития мастита по строкам таблицы следующий:

$$D_1 = 131,7 \times 1 + 25,5 \times 1 + 36,16 \times 1 + 61,88 \times 3 + - 81,74 = 297,26$$

$$D_2 = 370,37 \times 1 + 71,66 \times 1 + 117,79 \times 1 + 122,69 \times 3 + - 547,37 = 380,52$$

$$D_3 = 360,83 \times 1 + 26,5 \times 1 + 86,8 \times 1 + 159,59 \times 3 + - 465,87 = 487,03$$

В результате проведенного расчета максимальная величина дискриминантной функции установлена на третьей строке (D_3), что позволяет с высокой вероятностью прогнозировать развитие клинической формы мастита у данного животного.

Таким образом, с помощью созданных диагностических математических моделей, основанных на биологических свойствах возбудителя, возможно своевременно прогнозировать развитие заболевания у животных.

Следующим этапом работы явилась разработка способа диагностики субклинической формы мастита микробной этиологии у коров. Проведенными нами исследованиями было установлено, что антилактоферриновая активность определялась у всех микроорганизмов, выделенных из молока здоровых и больных субклинической формой мастита коров, однако у возбудителей, выделенных от больных животных, уровень выраженности данного признака был в 1,9 выше (от 2,6 до 2,9 мкг/мл и от 1,1 до 1,8 мкг/мл). Таким образом, было выявлено, что все виды стафилококков и стрептококков, выделенные из молока животных с субклинической формой мастита, обладают антилактоферриновой активностью с уровнем выраженности данного признака больше 2 мкг/мл. Обнаружение у исследуемого штамма-возбудителя мастита антилактоферриновой активности с указанными выше количественными характеристиками позволяет повысить эффективность диагностики субклинических форм мастита микробной этиологии у коров, подобрать оптимальные схемы лечения и сократить экономический ущерб, наносимый животноводству.

В условиях прогрессирующей антибиотикостойчивости микрофлоры, нетрадиционным и перспективным для борьбы с местной инфекцией представляется использование живых микробов-антагонистов, способных подавлять рост патогенных и условно-пато-

генных бактерий и грибов. Пробиотические препараты обладают комплексным действием при отсутствии токсичности и побочных эффектов, они не вызывают привыкания микрофлоры, не оказывают негативного воздействия на качество молока. В современных экономических условиях пробиотики привлекают внимание также сравнительно невысокой стоимостью, все это открывает возможности для их широкого применения. Среди пробиотиков наиболее перспективными являются препараты на основе бактерий рода *Bacillus*, которые наряду с антагонистической активностью, обладают также выраженной иммуномодулирующей способностью. Широкое распространение в России получили бактериальные препараты Бактисубтил (*Bacillus cereus* IP 5832), Споробактерин (*B. subtilis* 534), Биоспорин (*B. subtilis* 3 и *B. licheniformis* 31Б), Ветом 1.1 (*B. subtilis* ВКПМ 7092), в состав которых входят аэробные спорообразующие бактерии, обитающие в почве и окружающей среде. В связи с вышеизложенным, нами были изучены антагонистическая активность указанных пробиотиков в отношении наиболее распространенных возбудителей мастита, а также влияние пробиотиков на факторы персистенции этих микроорганизмов.

Для изучения антагонистической активности споровых микроорганизмов в отношении условно-патогенных бактерий с помощью проведенных экспериментальных исследований выбрана плотная питательная среда Гаузе № 2 и найден временной интервал (72-96 часов), характеризующийся максимальным образованием зрелых спор. Наибольшей антагонистической активностью в отношении грамотрицательных микроорганизмов (кишечная палочка и сальмонеллы) обладал Бактисубтил, зоны задержки роста тест-культур составили в среднем $22,5 \pm 1,91$ и $21,5 \pm 2,07$ мм соответственно. Биоспорин, Ветом 1.1 и Споробактерин угнетали рост, в основном, грамположительных бактерий (стафилококки, стрептококки).

Изучение регуляции факторов персистенции грамположительных микроорганизмов под действием спорообразующих пробиотиков выявило их разнонаправленное влияние: установлено снижение, повышение и индифферентное действие на антилизосимную и антиинтерфероновую активности изученных микроорга-

низмов; снижение и повышение антилактоферриновой активности. При этом, на антилизоцимную активность *S. aureus*, *S. epidermidis*, грибов рода *Candida*, *Str. agalactiae* наибольшее влияние оказывал Споробактерин, снижая признак у 28 штаммов соответственно; под действием Биоспорина, Споробактерина и Ветома 1.1. антиинтерфероновая активность снижалась у 100 % исследованных золотистых стафилококков, Биоспорин наиболее эффективно снижал АИА у *S. capitis*, а Споробактерин - у *S. epidermidis*, грибов рода *Candida*, *Str. agalactiae*. Все изученные пробиотики оказывали одинаковое действие на антилактоферриновую активность золотистых стафилококков, снижая признак у 50 % и повышая у 50 % штаммов; установлено, что наиболее эффективное действие на АЛФА *S. epidermidis*, *S. capitis*, грибов рода *Candida*, *Str. agalactiae* оказывал Споробактерин, снижая признак у 70, 68, 66,6 и 75 % изученных штаммов соответственно.

Изучение влияния пробиотиков на выраженность факторов персистенции условно-патогенных микроорганизмов позволило заключить, что все пробиотики в той или иной степени снижали АИА, АЛА и АЛФА стафилококков, стрептококков и кандид. При этом, максимальное подавление изученных факторов персистенции у золотистых стафилококков и агалактийных стрептококков, являющихся основными возбудителями мастита, оказывал Споробактерин.

Таким образом, полученные результаты показали, что к числу наиболее биологически активных пробиотиков относится Споробактерин, который помимо выраженного антагонистического действия, снижения персистентных свойств микроорганизмов, также обладает противовоспалительным эффектом (Жданов П.И., 1998), оказывает иммуномодулирующее действие (Никитенко В.И., 1991, 1999). Данные свойства Споробактерина и явились побудительным мотивом к его использованию для лечения животных с разными формами мастита.

Клинические наблюдения по действию традиционного (мастисан А) и разработанного методов лечения были проведены под контролем бактериологического исследования. Анализируя полученные результаты, следует отметить, что под действием пробиотика достоверно снижалась микробная обсемененность мо-

лока, быстрее наступало улучшение состояния больных животных и их выздоровление в сравнении с группой животных, у которых лечение проводилось традиционным методом (табл. 3.)

Таблица 3.

Сравнительная оценка эффективности споробактерина и мастисана А при различных формах мастита у коров

Форма мастита	Показатели	Контроль (мастисан А)	1 группа (споро-бак-терин в дозе 5мл)	2 группа (споро-бак-терин в дозе 10мл)	3 группа (споро-бак-терин в дозе 15мл)
Субклинический	Число животных	44	44	45	44
	Число введений	2,7	2,5	2,1	2,0
	Продолжительность лечения, дни	3	2,4	2,2	2,0
	Клиническое выздоровление, дни	6±0,5	6,2±0,5	5,1±0,4	4±0,5
Серозный	Число животных	10	10	10	11
	Число введений	4,1	3,6	2,8	2,6
	Продолжительность лечения, дни	3,8	3,6	3,1	2,8
	Клиническое выздоровление, дни	7,2±0,6	7,0±0,5	5,6±0,3	4,5±0,5
Катаральный	Число животных	9	8	8	8
	Число введений	5,9	5,5	4,3	3,8
	Продолжительность лечения, дни	6	6,1	5,2	4,1
	Клиническое выздоровление, дни	8,1±0,4	7,5±0,8	6,2±0,4	5,6±0,3
Катарально-пнойный	Число животных	7	8	8	8
	Число введений	7,4	6,7	5,9	5,2
	Продолжительность лечения, дни	7,8	7,4	6,8	5,1
	Клиническое выздоровление, дни	11±0,5	10,5±0,9	8,5±0,5	7,4±0,6

Согласно полученным данным высокая терапевтическая эффективность споробактерина выявлена при назначении пробиотика в дозе 10 мл в сутки, интрацестернально при субклинической и серозной формах мастита. При катаральной и гнойно-катаральной формах мастита наиболее выраженным терапевтическим действием споробактерин обладал при введении в количестве 15 мл в сутки, интрацестернально при одновременном введении новокаина по методике Логвинова.

Таким образом, проведенные исследования показали, что использование споробактерина является наиболее эффективным методом лечения клинического и субклинического мастита в сравнении с традиционным. Применение споробактерина, кроме того, способствовало подавлению биологических свойств стафилококков и стрептококков *in vivo* и позволило достигнуть выздоровления в ближайшие сроки после лечения у 100 % с субклинической формой мастита и у 80-100 % животных с клинически выраженной формой мастита.

Выявление совпадения результатов направленности воздействия регулирующего фактора на персистентные свойства микроорганизмов-возбудителей мастита в условиях *in vitro* и *in vivo* имеет большое практическое значение, так как позволяет в лабораторных условиях подобрать эффективные оптимальные терапевтические воздействия (независимо от их природы), направленные на снижение персистентного потенциала возбудителя и, следовательно, способствующие выведению патогена из организма.

Подводя общий итог проделанной работе, следует выделить два основных момента. Во-первых, длительность и характер течения мастита определяются наличием комплекса биологических свойств, ответственных за инактивацию эффекторных механизмов естественного иммунитета. Совокупность информативных биологических признаков послужила основой для создания математической модели прогнозирования развития заболевания. Во-вторых, на основе полученных результатов разработаны способ диагностики субклинической формы мастита и новый метод лечения заболевания, основанный на коррекции пробиотиками биологических свойств возбудителей мастита у животных.

ВЫВОДЫ

1. Изучение бактериальной флоры при маститах у коров выявило ведущее значение микроорганизмов родов *Staphylococcus* и *Streptococcus*, которые при клинической форме заболевания выделялись в 75 % и 16,7 % случаев, а при субклинической – в 76,7 % и 23,3 % случаев соответственно. Доминирующее положение занимали штаммы *S. aureus* и *Str. agalactiae*.

2. Клинико-бактериологический анализ микроорганизмов, выделенных от больных животных, выявил зависимость характера течения заболевания от биологических свойств возбудителя. Микроорганизмы с гемолитической активностью и высоким уровнем антилактоферриновой активности выделялись при клинической форме мастита, тогда как штаммы с персистентными характеристиками - при субклинической форме заболевания, что позволило разработать способ прогнозирования развития заболевания.

3. Выявлены отличия по распространенности и выраженности антилактоферриновой активности у микроорганизмов, выделенных у здоровых и больных субклинической формой мастита коров. Высокие значения признака характерны для культур, выделенных при субклинической форме и на этой основе разработан способ диагностики субклинической формы заболевания.

4. Изучено антагонистическое действие пробиотиков на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы. Установлено, что максимальным ингибирующим эффектом в отношении грамотрицательных микроорганизмов (кишечная палочка и сальмонеллы) обладает Бактисубтил, а Биоспорин, Ветом 1.1 и Споробактерин угнетают рост, в основном, грамположительных бактерий (стафилококки, стрептококки).

5. В эксперименте установлена возможность модификации способности микроорганизмов к инаktivации факторов естественной резистентности под воздействием споровых пробиотиков: снижение, повышение и индифферентное действие. Полученные данные позволили отобрать препарат Споробактерин, наиболее эффективно снижающий персистентные свойства стафилококков и стрептококков.

6. Разработан способ лечения маститов у коров с использо-

ванием Споробактерина. Установлено, что Споробактерин при местном лечении снижает микробную обсемененность и уменьшает выраженность персистентных свойств стафилококков и стрептококков.

7. Терапия больных маститом животных с использованием Споробактерина позволяет сократить сроки лечения (на 1 - 2,7 и 1,2 дня) и достигнуть положительного результата в ближайшие (2,8-5,1 и 3 дня) и отдаленные (6-10 месяцев) сроки наблюдения у коров с клинической и субклинической формами мастита соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Уровень выраженности факторов персистенции микроорганизмов рекомендуется использовать в практике лабораторной диагностики субклинической формы мастита у коров и прогнозирования возможности развития заболевания.

2. Для терапии маститов у коров целесообразно применение Споробактерина: при субклинической форме заболевания в дозе 10 мл (интрацистернально, один раз в сутки, в течении 1-3 дней), при клинической - в дозе 10-15 мл (интрацистернально, один раз в сутки, в течении 3-6 дней).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бала С.С. Пробиотики и антибиотикорезистентность микроорганизмов / С.С. Бала // Актуальные вопросы морфологии и хирургии 21 века: материалы международной научной конференции, т. II хирургия. - Оренбург, 2001. - С. 11-13.

2. Бала С.С. Влияние некоторых факторов на рост и спорообразование штамма *B. subtilis* 534. / С.С. Бала // Вестник ветеринарии. - Оренбург: Издат. центр ОГАУ, 2002. - №5. - С. 27-29.

3. Савина И.В. Чувствительность маститной микрофлоры к пробиотику Споробактерин /И.В.Савина, С.С. Бала, Ю.А. Гонохов// Актуальные проблемы ветеринарной медицины и биологии: материалы международной научно-практической конференции. - Оренбург, 2003. - С.128-131.

4. Бала С.С. Влияние споробактерина и бактисубтила на

рост и антилизоцимную активность патогенных и условно-патогенных микроорганизмов /С.С. Бала // Актуальные проблемы ветеринарной медицины и биологии: материалы международной научно-практической конференции. - Оренбург: Изд-во «Оренбургская губерния», 2003. - С.25-27.

5. Бала С.С. Антагонистическая активность пробиотиков на основе аэробных спорообразующих бактерий / С.С. Бала // Успехи современного естествознания. - 2004. - №12. - С. 84.

6. Карташова О.Л. Биологические свойства микрофлоры, выделенной из молока, и возможность их использования в прогнозировании развития мастита у коров /О.Л. Карташова, С.Б. Киргизова, С.С. Бала // Вестник ОГУ. Приложение Биология и медицина. - 2005. - №5. - С. 28-30.

7. Бала С.С. Диагностика и лечение маститов у коров/ С.С. Бала, И.В. Савина // Успехи современного естествознания. -2005. - №12.- С.36.

8. Карташова О.Л. Способ диагностики субклинической формы мастита /О.Л. Карташова, С.Б. Киргизова, С.С. Бала и др. // Патент РФ № 2264171 от 20.11.05 г.

Подписано в печать 25.12.06. Печ. листов 1. Тираж 100 экз.
Заказ 161. Формат 60×90/16. Издат. Центр **ВНИИМС**.
460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29.