



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК 619:615.339:636.2:612.3

ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ И ИНВАЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *BACILLUS*

Коптев В.Ю. – к.в.н., ст. научный сотрудник; Ладейщикова Е.Е. – лаборант; Козенёва В.С. – лаборант (ИЭВСиДВ СФНЦА РАН)

Ключевые слова: пробиот и ки, бациллы, факт оры пат огенност и, инвазивность, контаминация. **Key words:** probiotics, bacillus, pathogenicity factors, invasiveness, contamination



РЕФЕРАТ

В последнее время в широкой ветеринарной практике все чаще применяют пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus*. Однако, несмотря на большое количество публикаций о положительном эффекте их применения, все чаще среди практикующих ветеринарных специалистов звучат мнения о том, что данные препараты ухудшают здоровье животных, либо снижают качество получаемой продукции.

В статье приведены данные о результатах исследования наличия факторов патогенности и инвазивных свойствах некоторых пробиотических штаммов микроорганизмов рода *Bacillus*. Опыты проводили как *in vitro* – с использованием стандартных микробиологических методик изложенных в общей фармакопейной статье ОФС.1.7.2.0012.15, так и *in vivo* – на лабораторных животных (белые мыши линии ISR, цыплята). Оценивали наличие у исследуемых штаммов факторов патогенности, а так же их инвазивные свойства.

Полученные в результате работы данные указывают на то, что изученные штаммы представляют экологическую и санитарную опасность при применении их как в ветеринарии в качестве пробиотиков, так и в гуманитарной медицине за счет выработки комплекса ферментов, являющихся факторами патогенности и выраженной инвазивной способности, приводящей к контаминации органов и тканей организма.

Применение данных штаммов способно ухудшить экологическую безопасность продуктов птицеводства за счет контаминации тушек птиц микроорганизмами рода *Bacillus*, а также ухудшения товарного вида птицы за счет образования слизистых колоний на поверхности тушки.

В соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи ОФС.1.7.2.0012.15 – все исследуемые штаммы не могут быть использованы как пробиотические, т.к. представляют санитарную опасность при применении их как в ветеринарии, так и в гуманитарной медицине и способны нанести вред организму животного и человека.

ВВЕДЕНИЕ

О пользе для здоровья пробиотиков свидетельствуют наличие устойчивого рынка разнообразных продуктов, содержащих живые бактерии, а также много-

численные публикации, подтверждающие с научной точки зрения механизмы пробиозиса — выгодного содружества животных организмов с определенными группами автохтонных микроорганизмов.

В итоге на сегодняшний день в мире создано более полусотни таких препаратов, которые полностью или частично составлены на основе спорообразующих бактерий. Хотя большинство бактерий, обладающих пробиотическими свойствами, являются представителями семейств *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, все чаще в таком качестве стали использоваться и спорообразующие бактерии, в особенности из рода *Bacillus* [1,2]. Несмотря на то, что ученые все еще спорят о правомерности принудительного насаждения нормальной микрофлоры, в продажу выпускается огромное количество лекарственных средств, биологически активных добавок и продуктов функционального питания, которые содержат не только молочнокислые, но и спорообразующие бактерии пробиотического действия.

Несмотря на то, что ученые все еще спорят о правомерности принудительного насаждения нормальной микрофлоры, в продажу выпускается огромное количество лекарственных средств на основе микроорганизмов рода *Bacillus* [2,4,5], что может представлять определенную опасность при применении их как в ветеринарии в качестве пробиотиков, так и при непосредственном применении на людях [7].

В России применение пробиотических штаммов микроорганизмов регламентировано ОФС.1.7.2.0012.15. Если используемый штамм не соответствует требованиям данной фармакопейной статьи – его применение запрещено.

Исходя из вышесказанного, была сформулирована следующая цель работы: изучить наличие факторов патогенности и инвазивную способность пробиотических штаммов микроорганизмов рода *Bacillus*.

Для ее выполнения были поставлены следующие задачи исследования:

1. Определить наличие факторов патогенности у исследуемых микроорганизмов;

2. Изучить инвазивную способность пробиотических штаммов микроорганизмов рода *Bacillus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась в октябре-декабре 2017г на базе лаборатории болезней молодняка ИЭВСиДВ СФНЦА РАН. В качестве объекта исследования были использованы 10 различных пробиотических штаммов микроорганизмов рода *Bacillus*.

Исследования проводились как в опытах *in vitro* – путем посевов на твердые и жидкие питательные среды, так и *in vivo* – путем постановки биопробы на белых мышках и цыплятах.

Исследования по изучению наличия факторов патогенности у пробиотических штаммов микроорганизмов рода *Bacillus*, проводили согласно ОФС.1.7.2.0012.15

Изучение инвазивной способности исследуемых пробиотических штаммов проводили путем постановки биопробы на белых мышках и цыплятах, разделенных по принципу аналогов на 10 групп по 5 особей в каждой, которым ежедневно в течение 10 дней вводили суточную культуру исследуемого микроорганизма по определенной схеме. По окончании опыта животных подвергали эвтаназии и с соблюдением правил асептики, производили отбор проб внутренних органов и тканей для посевов на жидкие и твердые питательные среды.

Наличие в биологическом материале микроорганизмов рода *Bacillus* подтверждалось изучением культуральных, тинкториальных и морфологических свойств выросших бактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования по установлению наличия факторов патогенности проводили согласно ОФС.1.7.2.0012.15. Результаты исследования представлены в таблице 1.

В результате исследований было установлено, что практически все исследуемые пробиотические штаммы продуцируют гемолизины – вещества, разрушающие эритроциты. Также большинство штаммов выделяют фермент каталазу, который подавляет активность фагоцитов.

Все исследуемые штаммы, за исключением *B.licheniformis* SB и *B. subtilis* B-

Таблица 1

Наличие факторов патогенности у пробиотических штаммов микроорганизмов рода *Bacillus*

№	Исследуемый штамм	Фактор патогенности							Соответствие требованиям ОФС.1.7.2.0012.15
		Наличие капсулы	Каталазная активность	Лецитиназная активность	Плазмокоагулязная активность	Гемолитическая активность	Фибринолитическая активность	Гиалуронидазная активность	
1	<i>B. subtilis</i> B-2335	+	+	–	–	+	+	+	–
2	<i>B. subtilis</i> SB-1	+	+	+	–	+	+	+	–
3	<i>B. licheniformis</i> SB	+	+	–	–	+	+	–	–
4	<i>B. subtilis</i> B-7920	+	–	–	–	+	+	–	–
5	<i>B. amiloliquefaciens</i> B-4164	–	+	–	–	+	+	+	–
6	<i>B. subtilis</i> ТНП-3	+	–	+	–	–	+	+	–
7	<i>B. subtilis</i> ВКПМ В-10641	–	+	+	–	+	+	+	–
8	<i>B. cereus</i> DPRK-17	+	+	+	–	+	+	+	–
9	<i>B. coagulans</i>	–	+	–	–	–	–	+	–
10	<i>B. subtilis</i>	+	–	–	–	+	+	+	–

+ Наличие фактора патогенности

– Отсутствие фактора патогенности

7920, проявили ярко-выраженную гиалуронидазную активность (рис.1). Гиалуронидаза способна расщеплять мукополисахариды и гиалуроновую кислоту, в результате чего повышается проницаемость тканей, и микроорганизмы свободно продвигаются вглубь лежащие ткани и органы животного организма.

Такие штаммы как *B. subtilis* SB-1, *B. subtilis* ТНП-3, *B. subtilis* ТНП-3, *B. subtilis* ВКПМ В-10641 и *B. cereus* DPRK-17 выделяли фермент лецитиназу, который лизирует лецитин, основной компонент мембран млекопитающих [6, 7, 8].

Изучение инвазивной способности исследуемых пробиотических штаммов про-

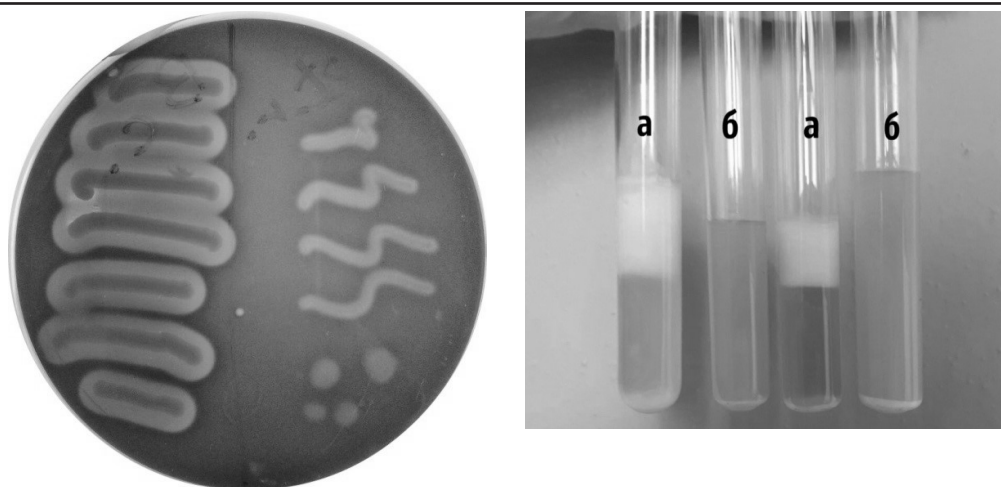


Рис.1 Наличие факторов патогенности у пробиотических штаммов микроорганизмов рода *Bacillus*: (1) – гемолитическая активность; (2) – наличие (а) и отсутствие (б) лецитиназной активности.

Таблица 2

Контаминация микроорганизмами рода *Bacillus* внутренних органов и тканей белых мышей

№	Исследуемый штамм	Контаминация тканей и органов, %			
		Сердце	Печень	Селезёнка	Грудная мышца
1	<i>B. subtilis</i> B-2335	100	60	100	100
2	<i>B. subtilis</i> SB-1	60	60	80	100
3	<i>B. licheniformis</i> SB	80	60	100	60
4	<i>B. subtilis</i> B-7920	60	0	100	80
5	<i>B. amiloliquefaciens</i> B-4164	100	60	80	100
Среднее:		80	48	92	88

водили путем постановки биопробы на белых мышах и цыплятах, разделенных по принципу аналогов на 10 групп по 5 особей, которым ежедневно в течение 10 дней вводили суточную культуру исследуемого микроорганизма по следующей схеме:

-белые мыши : 100 мкл орально (1 млрд КОЕ/мл);
-цыплята : 200 мкл орально (1 млрд КОЕ/мл) .

Анализ полученных результатов показывает, что оральное введение исследуемых пробиотических штаммов сопровождается высоким уровнем контаминации внутренних органов и тканей лабораторных животных (табл.2).

Так в опытах на белых мышах уровень контаминации мышц составил в среднем 88%, селезенки 92%, сердца и печени – 80 и 48% соответственно.

Похожие результаты были получены и в опытах на цыплятах: уровень контаминации

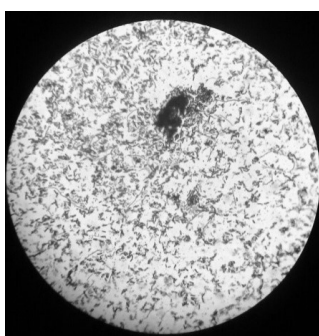
Таблица 3

Контаминация микроорганизмами рода *Bacillus* внутренних органов и тканей 10-суточных цыплят

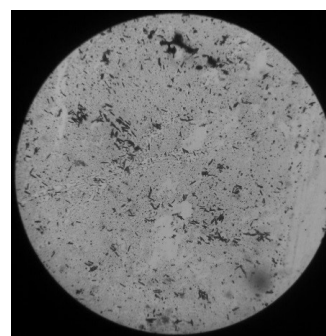
№	Исследуемый штамм	Контаминация тканей и органов, %			
		Сердце	Печень	Бедренная мышца	Грудная мышца
1	<i>B. subtilis</i> ТНП-3	80	80	100	100
2	<i>B. subtilis</i> ВКПМ В-10641	0	100	100	100
3	<i>B. cereus</i> DPRK-17	80	100	100	100
4	<i>B. coagulans</i>	60	100	100	100
5	<i>B. subtilis</i>	40	100	100	100
Среднее:		52	96	100	100



а



б



с

Рис.2 - Микроскопия культур, выделенных из внутренних органов лабораторных животных: (а) – грудная мышца белой мыши; (б) – бедренная мышца цыпленка; (с) – сердце цыпленка.

нации грудных и бедренных мышц составил 100%, а печени и сердца 96 и 52% соответственно (табл.3).

Полученные результаты о инвазивной способности пробиотических штаммов микроорганизмов рода *Bacillus* были подтверждены данными микроскопии выросших на питательных средах колоний (рис.2). В мазках видны грамположительные палочковидные бактерии, образующие внутриклеточные споры, что указывает на их принадлежность к роду *Bacillus*.

Данная работа частично поддержана интеграционным проектом КП ФНИ СО РАН «Микробиом человека и сельскохозяйственных животных. Изучение возможностей коррекции» (задание № 778-2018-0112 и №0309-2018-011).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты указывают на то, что изученные штаммы микроорганизмов рода *Bacillus* представляют экологическую и санитарную опасность при применении их как в ветеринарии в качестве пробиотиков, так и в гуманитарной медицине за счет выработки комплек-

са ферментов, являющихся факторами патогенности и выраженной инвазивной способности, приводящей к контаминации органов и тканей организма.

Применение данных штаммов способно ухудшить экологическую безопасность продуктов птицеводства за счет контаминации микроорганизмами рода *Bacillus* тушек птиц, которые в дальнейшем поступают на прилавки магазинов и употребляются людьми в пищу, а также ухудшения товарного вида птицы за счет образования слизистых колоний на поверхности тушки.

В соответствие с требованиями общей фармакопейной статьи ОФС.1.7.2.0012.15 – все исследуемые штаммы не могут быть использованы как пробиотические, т.к. представляют санитарную опасность при применении их как в ветеринарии, так и в гуманитарной медицине и способны нанести вред организму животного и человека.

THE VIRULENCE FACTORS AND INVASIVE PROPERTIES OF PROBIOTIC STRAINS OF MICROORGANISMS OF THE GENUS BACILLUS

V.Yu. Koptev - Senior researcher of the Siberian Institute of experimental veterinary science of Siberia and the Far East Siberian Federal scientific center of agrobiotechnology of the Russian Academy of Sciences, Candidate of Veterinary Sciences; E.E. Ladeyshikova – Laboratorian of the Siberian Institute of experimental veterinary science of Siberia and the Far East Siberian Federal scientific center of agrobiotechnology of the Russian Academy of Sciences, Candidate of Veterinary Sciences; V.S. Kozeneva - Laboratorian of the Siberian Institute of experimental veterinary science of Siberia and the Far East Siberian Federal scientific center of agrobiotechnology of the Russian Academy of Sciences, Candidate of Veterinary Sciences

ABSTRACT

Recently probiotic medicines based on microorganisms of the genus *Bacillus* have been increasingly used in wide veterinary practice. However, despite a large number of publications about positive effect of their

use, among practising veterinary experts opinions that these drugs worsen the health of animals, or reduce the quality of the products are heard more often. The article presents data on the results of a study of the presence of factors of pathogenicity and invasive properties of some probiotic strains of microorganisms of the genus *Bacillus*. The experiments were conducted as in vitro – using standard microbiological techniques set out in the General pharmacopoeia monograph 1.7.2.0012.15 and in vivo – on laboratory animals (white mice of the ISR line, chickens). The presence of the investigated strains of virulence factors, as well as their invasive properties, were estimated.

The data obtained in the work indicate that the studied strains represent an environmental and sanitary danger when are used both in veterinary medicine as probiotics and in humanitarian medicine due to the development of a complex of enzymes that are factors of pathogenicity and frank invasive ability, leading to contamination of organs and tissues of the body. Application of these strains is capable to worsen ecological safety of products of poultry farming due to contamination of carcasses of birds with microorganisms of the genus *Bacillus* and also deteriorations in a trade dress of a bird due to formation of mucous colonies on a carcass surface.

According to requirements of general pharmacopoeia monograph 1.7.2.0012.15 – all studied strains cannot be used as probiotic since constitute sanitary danger at application them both in a veterinary medicine, and in humanitarian medicine and are capable to do harm to an organism of an animal and the person.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакулина, Л.Ф. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии / Л.Ф. Бакулина, Н.Г. Перминова, И.В. Тимофеев // Биотехнология. – 2001. – № 2. – С. 76-84.
2. Бухарин, О.В. Персистенция патогенных бактерий. – Москва : Медицина, 1999. – С.88-109.

3. Похиленко, В.Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В.Д. Похиленко, В.В. Перелыгин // Хим. и биол. безопасность. – 2007. – № 2/3. – С.20-41.
4. Принципиально новый подход к лечению бактериальных и вирусных инфекций / И.Б. Сорокулова, С.Л. Рыбалко, А.А. Руденко, Т.Г. Берестовая, К.Н. Легеза, В.С. Подгорский, К.В. Куришук. – Киев, 2010. – С. 22-25.
5. Псахис, И. Б. Современные возможности и перспективы использования пробиотиков группы самоэлиминирующихся антагонистов в терапии инфекционных заболеваний / И.Б. Псахис, Т. Е. Маковская // Здоровье ребенка. – 2014. – № 4. – С. 91-94.
6. Характеристика условно-патогенных микроорганизмов при острых и хронических заболеваниях кишечника / Н.Ф. Брусникина, Н.В. Залесских, С.А. Быкова, М.А. Власнеко // Республикан. сб. науч. тр. / под ред. И.Н. Блохиной, К.Л. Соколовой. – 2005. – С. 234-238.
7. Edward, J.B. Bacillus cereus, a Volatile human pathogen / J.B. Edward // Clinical Microbiology. – 2010. – Vol. 23. – P. 382-398.
8. Fatal pneumonia among metalworkers due to inhalation exposure to Bacillus cereus containing Bacillus anthracis toxin genes / S. B. Avashia, W. S. Wiggins, C. Lindley [et al.] // Betz. Clin. Infect. – 2007. – № 44. – P.414-416.

УДК 619 DOI: 10.17238/issn2072-2419.2018.3.17

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ НОСИТЕЛЬСТВА U. DIVERSUM В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ваганова А. Н., мл. научный сотрудник, лаборатория молекулярно биологических технологий, Отдел новых технологий, Фрейлихман О. А., к. б. н., зав. лаб., лаборатория молекулярно-биологических технологий, отдел новых технологий, Борисенко С. В., к. вет.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммуно-химических технологий, отдел новых технологий, В.В. Рока, к. б. н., старший научный сотрудник, лаборатория биопрепаратов, Отдел новых технологий, Вербов В.Н., к. х.н., зав. отделом, Отдел новых технологий (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

Ключевые слова: Ureaplasma diversum, заболевания репродуктивной системы КРС, ПЦР, ПЦР в реальном времени. **Key words:** Ureaplasma diversum, diseases of the reproductive system of cattle, PCR, real-time PCR

РЕФЕРАТ

Ureaplasma diversum — оппортунистический патоген крупного рогатого скота, способный к колонизации репродуктивной и респираторной систем. В большинстве случаев носительство уреоплазм как в репродуктивном, так и в респираторном тракте протекает бессимптомно. Носительство в респираторном тракте более характерно для молодняка, в то время как дистальные отделы репродуктивного тракта уреоплазмы заселяют преимущественно взрослых животных. Целью данного исследования было сравнение распространённости U. diversum среди нетелей и коров различного возраста в рамках одного животноводческого предприятия. Для оценки частоты распространения носительства U. diversum среди коров и нетелей у животных были отобраны мазки с поверхности слизистых оболочек преддверия влагалища. Выявление U. diversum в полученном клиническом материале проводилось методом ПЦР в реальном времени. В результате исследования было установлено, что распространённость носительства значительно выше среди