Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.15421/nvlvet8713
<http://nvlvet.com.ua/>

UDC 619:576.8:616.34.008.89:615

Sensitivity of *L. casei* and *E. coli* to active substances of anti-parasitic preparations

R.A. Peleno

Stepan Gzhyskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Ukraine

Article info

Received 06.02.2018
Received in revised form
16.03.2018
Accepted 23.03.2018

Stepan Gzhyskyi National
University of Veterinary Medicine
and Biotechnologies Lviv,
Pekarska str., 50, Lviv,
79010, Ukraine.
Tel.: +38-097-440-98-37
E-mail: andriyovych30@ukr.net

Peleno, R.A. (2018). Sensitivity of *L. casei* and *E. coli* to active substances of anti-parasitic preparations. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. 20(87), 65–69. doi: 10.15421/nvlvet8713

The data of the influence of active substances of anthelmintic and antiprotozoal preparations on the growth of *L. casei* IMB B-7280 and *E. coli* 055K59 are provided in the article. Their minimal inhibitory concentrations were determined for these strains of microorganisms and the active substances with which possible simultaneous application of probiotic strain *L. casei* IMB B-7280 is established. With this aim, the effect on the growth of *L. casei* IMB B-7280 and *E. coli* 055K59 and the minimum inhibitory concentration of fenbendazole, levamisole and ivermectin, which are part of the anthelmintic preparations and amprolium, tylosin, sodium sulfadimexone and sodium sulfatiazole, which are active substances of antiprotozoal drugs, were investigated. The determination of the minimum inhibitory concentration of the active substances of antiparasitic agents against these strains of microorganisms was carried out in in vitro experiments by serial dilutions in a dense MRS environment and MPA, and a study of the effect on the growth by diffusion method, followed by measurement of growth retardation zones in millimeters. It is established that among active substances of anthelmintic preparations only phenbendazole caused growth retardation and only relative to *L. casei* IMB B-7280. Among the active substances of antiprotozoal drugs, sodium sulfatiazole was the most active, which inhibited growth as *L. casei* IMB-7280 and *E. coli* 055K59 № 3912/41. Tylosin was effective only in relation to *L. casei* IMB B-7280 and at the highest concentration of 0.03%, the growth retardation zone was 23.4 ± 0.92 mm. Sodium sulfadimetoxin caused the growth retardation of *L. casei* IMB B-7280 only at the highest concentration. The minimum inhibitory concentration of active substances of anti-parasitic drugs was different for strains *L. casei* IMB B-7280 and *E. coli* 055K59 № 3912/4. The strongest inhibitory effect was shown by tylosin, which stopped the growth of *L. casei* IMB B-7280 and *E. coli* 055K59 № 3912/41 respectively at concentrations of 0.00125 and 50.0 mg/ml. Active substances such as amprolium, levamisole and ivermectin did not significantly inhibit the growth of *L. casei*, IMB B-7280 and *E. coli* 055K59 № 3912/41, since their minimal inhibitory concentration was in the range of 4000 to 6000 mg ml.

Key words: *L. casei*, *E. coli*, sensitivity, active substances of antiparasitic drugs, mixed invasion, growth retardation zone, minimal inhibitory concentration.

Чутливість *L. casei* та *E. coli* до діючих речовин протипаразитарних препаратів

Р.А. Пеленьо

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького,
м. Львів, Україна

У статті наведені дані про вплив діючих речовин антгельмінтних і протипротозойних препаратів на ріст *L. casei* IMB B-7280 та *E. coli* 055K59, визначені їх мінімальні інгібувальні концентрації щодо вказаних штамів мікроорганізмів та встановлені діючі речовини, з якими можливе одночасне застосування пробіотичного штаму *L. casei* IMB B-7280. З цією метою досліджено вплив на ріст *L. casei* IMB B-7280 і *E. coli* 055K59 та мінімальні інгібувальні концентрації фенбендазолу, левамизолу та івермектину, що входять до складу антгельмінтних препаратів, крім того, ампроліуму, тилозину, сульфадиметоксину натрію та сульфатіазолу натрію – діючих речовин протипротозойних препаратів. Визначення мінімальної інгібувальної концентрації діючих речовин про-

типаразитарних препаратів щодо вказаних штамів мікроорганізмів проводили в експериментах *in vitro* методом серійних розведень у щільному MRS середовищі й МПА, а дослідження впливу на ріст – дифузійним методом із подальшим вимірюванням (в міліметрах) зон затримки росту. Встановлено, що серед діючих речовин антгельмінтних препаратів лише фенбендазол зумовлював затримку росту і лише відносно *L. casei* IMB B-7280. Серед діючих речовин протипротозойних препаратів найбільш активним був сульфатиазол натрію. Він затримував ріст як *L. casei* IMB B-7280, так і *E. coli* 055K59 № 3912/41. Тилозин проявляв свою дію лише відносно *L. casei* IMB B-7280 і за найвищої концентрації (0,03%) зона затримки росту становила $23,4 \pm 0,92$ мм. Сульфадиמתоксин натрію зумовив затримку росту *L. casei* IMB B-7280 лише за найвищої концентрації. Мінімальна інгібувальна концентрація діючих речовин протипаразитарних препаратів була різною для штамів *L. casei* IMB B-7280 та *E. coli* 055K59 №3912/41. Найсильнішу інгібувальну дію проявляв тилозин, який припиняв ріст *L. casei* IMB B-7280 та *E. coli* 055K59 № 3912/41 за концентрації відповідно 0,00125 та 50,0 мг/мл. Такі діючі речовини, як ампроліум, левамизол та івермектин, незначно пригнічували ріст *L. casei* IMB B-7280 та *E. coli* 055K59 №3912/41, оскільки їх мінімальна інгібувальна концентрація перебувала в межах від 4000 до 6000 мг/мл.

Ключові слова: *L. casei*, *E. coli*, чутливість, діючі речовини протипаразитарних препаратів, змішана інвазія, зона затримки росту, мінімальна інгібувальна концентрація.

Вступ

Відомо, що паразитарні хвороби завдають значних економічних збитків, знижують рентабельність виробництва і, як наслідок, є гальмівним чинником у розвитку тваринництва. Серед паразитарних хвороб свиней вагому частку становлять хвороби, зумовлені асоціаціями кишкових паразитів, зокрема нематодами та найпростішими (Stybel', 2004; Berezovs'kyj, 2006; Yevstafieva et al., 2017). Наявність паразитів у кишечнику є причиною наростання кількості патогенних та умовно-патогенних і зменшення індигенних бактерій, що зумовлює дисбаланс кишкової мікрофлори. Своєю чергою, дисбактеріоз, що виникає, ускладнює перебіг паразитарного захворювання і, нерідко, обумовлює тривалу дисфункцію кишечника (Vozianova, 2000; Avdjuhina et al., 2003; Dovgij et al., 2008; Peleno, 2017).

Не втрачають актуальності питання лікування та профілактики змішаних нематодозно-протозоозних інвазій поросят. Сучасні протипаразитарні препарати, впроваджені у ветеринарну практику, дають можливість ефективно боротися з моноінвазіями. Проте серед їх величезної кількості відсутні ті, що були б однаково ефективними як відносно до гельмінтів, так і до найпростіших. Саме тому для лікування свиней, уражених змішаною нематодозно-протозоозною інвазією окремо застосовують антгельмінтні та протипротозойні препарати, які відрізняються між собою, насамперед діючою речовиною (Timofeev et al., 1997; Malynin et al., 1998; Bisjuk, 2006; Yevstafieva et al., 2017).

При виборі лікарського засобу практики ветеринарної медицини зазвичай враховують лише його дію на паразита. Таким чином, маючи на меті знищення конкретного збудника, залишають поза увагою вплив препарату на мікрофлору кишечника. Особливо це стосується протипротозойних засобів, до складу яких входять речовини, що володіють бактеріостатичною чи навіть бактерицидною здатністю і можуть посилювати дисбіоз, зумовлений наявністю паразитів.

Перспективним напрямом профілактики дисбіозу і корекції мікробіоценозу кишечника після лікування свиней, уражених нематодозно-протозоозною інвазією, є використання пробіотичних препаратів на основі лактобацил. Мікроорганізми роду *Lactobacillus* добре виживають у кишечнику (Hardy et al., 2013), здатні змінювати травну мікрофлору, посилювати імунну систему (Jones and Versalovic, 2009). Крім

того, нещодавнє дослідження показало: пробіотик, що містить *Lactobacillus casei*, взаємодіє зі слизовою кишковою та може помітно знизити вивільнення нею фактора некрозу пухлини альфа та інтерлейкіну-8 (Dixit et al., 1990; Yoshida et al., 1997).

У зв'язку із цим, доцільним є проведення досліджень, спрямованих на вивчення впливу діючих речовин протипаразитарних препаратів на автохтонну мікрофлору кишечника поросят і на штами, які використовуються як пробіотики, з метою розробки схеми корекції ентеробіоценозу після дегельмінтизації.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити чутливість *L. casei* IMB B-7280 та *E. coli* 055K59 №3912/41 до діючих речовин протипаразитарних препаратів, що використовуються для лікування поросят, уражених змішаною нематодозно-протозоозною інвазією, і визначити можливість їх сумісного застосування із розробленим нами пробіотиком «Лактовет». Щоби досягти поставленої мети, треба було розв'язати такі завдання: дослідити вплив діючих речовин антгельмінтних і протипротозойних препаратів на ріст *L. casei* IMB B-7280 і *E. coli* 055K59 №3912/41; визначити мінімальну інгібувальну концентрацію діючих речовин протипаразитарних препаратів щодо *L. casei* IMB B-7280 та *E. coli* 055K59 №3912/41; встановити можливість одночасного застосування пробіотичного штаму *L. casei* IMB B-7280, що входить до складу пробіотика «Лактовет», із протипаразитарними препаратами.

Матеріал і методи досліджень

В експериментах *in vitro* використовували штами *L. casei* IMB B-7280 та *E. coli* 055K59 № 3912/41. Визначення мінімальної інгібувальної концентрації (МІК) діючих речовин протипаразитарних препаратів щодо вказаних штамів мікроорганізмів проводили методом серійних розведень у щільному MRS середовищі й МПА [Красильников]. Перед посівом чашки підсушували в термостаті протягом 30–40 хв. Посіви культивували в термостаті за температури 37 °С протягом 24 годин. Дослідження впливу діючих речовин протипаразитарних препаратів на ріст *L. casei* та *E. coli* проводили дифузійним методом із подальшим вимірюванням зон затримки росту в міліметрах. Для цього в середовищі розлитому чашки Петрі формували лунки, в які вносили досліджувані речовини у таких концентраціях: тилозин – 0,005, 0,01, 0,02 і 0,03%;

сульфадиметоксин натрію – 0,05, 0,1, 0,3 і 0,5%, сульфатиазол натрію – 0,3, 0,5, 0,7 і 1,0%, фенбендазол та івермектин – 0,5, 1,0 2,5 і 5,0%; левамизол – 2,0, 3,0 4,0 і 5,0%; ампроліум – 1,0, 2,0 3,0 і 4,0 %.

Одержані результати піддавали статистичній обробці, яку проводили методом варіаційної статистики з визначенням середніх значень величин і середньої похибки.

Результати та їх обговорення

У результаті дослідження впливу діючих речовин антгельмінтних препаратів на ріст *L. casei* і *E. coli* (табл. 1) встановлено, що лише фенбендазол зумовив затримку росту і лише стосовно до *L. casei* IMB B-7280. Діаметр зони затримки росту вказаного штаму мікроорганізму за концентрації фенбендазолу 0,5% становив $10,4 \pm 0,64$ мм.

Зростання концентрації фенбендазолу призвело до збільшення діаметра затримки росту. Так, за концентрації 1,0% діаметр затримки росту *L. casei* IMB B-7280 збільшився відносно до діаметра затримки росту за концентрації 0,5% на 11,5%, за концентрації 2,5% – на 26,9% і на 50,0% – за концентрації 5,0%.

Результати дослідження впливу діючих речовин протипротозойних препаратів на ріст *L. casei* та *E. coli* наведені у табл. 2. Встановлено, що серед діючих речовин протипротозойних препаратів найбільш активним був сульфатиазол натрію, який затримував ріст як *L. casei* IMB B-7280, так і *E. coli* 055K59 №3912/41. За його концентрації 0,3% діаметр зони затримки росту становив відповідно $15,1 \pm 0,68$ і $13,4 \pm 0,80$ мм, за концентрації 0,5% – $17,2 \pm 0,84$ і $15,2 \pm 0,84$ мм, за концентрації 0,7% – $19,3 \pm 0,95$ і $17,5 \pm 0,76$ мм і за концентрації 1,0% – $22,1 \pm 1,26$ і $19,4 \pm 0,99$ мм.

Таблиця 1

Результати дослідження впливу діючих речовин антгельмінтних препаратів на ріст *L. casei* і *E. coli*

Діюча речовина	Концентрація, %	Діаметр зони затримки росту, мм	
		<i>L. casei</i> IMB B-7280	<i>E. coli</i> 055K59 №3912/41
Фенбендазол	0,5	$10,4 \pm 0,64$	0
	1,0	$11,6 \pm 0,58$	0
	2,5	$13,2 \pm 0,77$	0
	5,0	$15,6 \pm 0,70$	0
	2,0	0	0
Левамізол	3,0	0	0
	4,0	0	0
	5,0	0	0
	0,5	0	0
Івермектин	1,0	0	0
	2,5	0	0
	5,0	0	0

Таблиця 2

Результати дослідження впливу діючих речовин протипротозойних препаратів на ріст *L. casei* та *E. coli*

Діюча речовина	Концентрація, %	Діаметр зони затримки росту, мм	
		<i>L. casei</i> IMB B-7280	<i>E. coli</i> 055K59 №3912/41
Тилозин	0,005	$17,3 \pm 0,98$	0
	0,01	$20,2 \pm 1,22$	0
	0,02	$21,1 \pm 1,16$	0
	0,03	$23,4 \pm 0,92$	0
	0,05	0	0
Сульфадиметоксин натрію	0,1	0	0
	0,3	0	0
	0,5	$12,0 \pm 0,82$	0
	0,3	$15,1 \pm 0,68$	$13,4 \pm 0,80$
Сульфатиазол натрію	0,5	$17,2 \pm 0,84$	$15,2 \pm 0,84$
	0,7	$19,3 \pm 0,95$	$17,5 \pm 0,76$
	1,0	$22,1 \pm 1,26$	$19,4 \pm 0,99$
	1,0	0	0
	2,0	0	0
Ампроліум	3,0	0	0
	4,0	0	0

Високоєфективним серед досліджуваних діючих речовин, виявився тилозин, проте він проявляв свою дію лише відносно *L. casei* IMB B-7280. Так, за концентрації діючої речовини 0,005% діаметр зони затримки росту був найменшим і становив $17,3 \pm$

$0,98$ мм. За концентрації тилозину 0,01% діаметр зони затримки росту збільшився на 2,9 мм, за концентрації 0,02% – на 3,8 мм і за концентрації 0,03% – на 6,4 мм порівняно із діаметром зони затримки росту, який був за найбільшого розведення (концентрації 0,005%).

Важливо відмітити також, що сульфадиметоксин натрію зумовив затримку росту *L. casei* лише за найвищої концентрації. Діаметр зони затримки росту при цьому становив $12,0 \pm 0,82$ мм, що свідчить про низьку чутливість мікроорганізму до вказаної діючої речовини.

Таблиця 3

Результати дослідження мінімальної інгібувальної концентрації діючих речовин протипаразитарних препаратів для *L. casei* та *E. coli*

Діюча речовина	Концентрація мг/мл поживного середовища	
	<i>L. casei</i> IMB B-7280	<i>E. coli</i> 055K59 №3912/41
Тилозин	0,00125	50
Сульфатиазол натрію	0,075	150
Сульфадиметоксин натрію	0,125	> 550
Ампроліум	> 6000	> 4000
Левамізол	> 6000	> 6000
Івермектин	> 6000	> 6000
Фенбендазол	0,25	> 6000

Встановлено, що мінімальна інгібувальна концентрація діючих речовин протипаразитарних препаратів була різною для штамів *L. casei* IMB B-7280 і *E. coli* 055K59 №3912/41. Найсильнішу інгібувальну дію проявляв тилозин, який припиняв ріст *L. casei* IMB B-7280 за концентрації 0,00125 мг/мл і *E. coli* 055K59 №3912/41, за концентрації 50,0 мг/мл. Вищою, порівняно з досліджуваними штамами мікроорганізмів, була МІК сульфатиазолу натрію, який призупиняв ріст *L. casei* IMB B-7280 за концентрації 0,075 мг/мл та *E. coli* 055K59 №3912/41 – за концентрації 150 мг/мл. Мінімальна інгібувальна концентрація сульфадиметоксину натрію і фенбендазолу відносно до *L. casei* IMB B-7280 становила, відповідно, 0,125 і 0,25 мг/мл, і була значно вищою щодо *E. coli* 055K59 №3912/41 на відповідно 550 і 6000 мг/мл більше. Такі діючі речовини, як ампроліум, левамізол та івермектин незначно впливали на ріст *L. casei* IMB B-7280 та *E. coli* 055K59 №3912/41, оскільки їхня мінімальна інгібувальна концентрація становила від 4000 до 6000 мг/мл.

Висновки

1. Діючі речовини, що входять до складу антгельмінтних препаратів, не викликали затримки росту *L. casei* IMB B-7280 та *E. coli* 055K59 №3912/41, за винятком фенбендазолу, який за концентрації від 0,5 до 5,0% зумовив низьку і середню затримку росту *L. casei* IMB B-7280.

2. Серед діючих речовин, що входять до складу протипротозойних препаратів, затримку росту досліджуваних мікроорганізмів зумовили сульфатиазол натрію, тилозин і сульфадиметоксин натрію. Сульфатиазол натрію затримував ріст як *L. casei* IMB B-7280, так і *E. coli* 055K59 №3912/41, тоді як тилозин проявляв затримку росту лише *L. casei* IMB B-7280.

3. Вищою інгібувальною дією щодо *L. casei* IMB B-7280 та *E. coli* 055K59 №3912/41 володіють діючі речовини, які входять до складу протипротозойних препаратів, за винятком ампроліуму, мінімальна інгібувальна концентрація якого була на рівні діючих

речовин антгельмінтних препаратів і становила більше ніж 6000 мг/мл відносно до *L. casei* IMB B-7280 та більше ніж 4000 мг/мл щодо *E. coli* 055K59 №3912/41.

4. Одночасне застосування пробіотичного штаму *L. casei* IMB B-7280 можливе із протипаразитарними препаратами, діючими речовинами яких є левамізол та івермектин, що проявляли низьку інгібувальну дію, і не рекомендовано застосовувати із фенбендазолом, МІК якого стосовно до досліджуваного штаму мікроорганізму становила 0,25 мг/мл.

References

- Avdjuhina, T.I., Konstantinova, T.N., & Kucherja, T.V. (2003). Ljamblioz: uchebnoe posobie. Moskva (in Russian).
- Berezovs'kyj, A.V. (2006). Osnovni parazytozy svynej, osoblyvosti himioterapii ta profilaktyky. Veterynarna medycyna. 86, 40–48 (in Ukrainian).
- Bisjuk, Sh.Ju. (2006). Katalog veterynarnyh likars'kyh zasobiv i kormovyh dobavok dlja tvaryn, zarejestrovanyh i dozvolenyh dlja vykorystannja v Ukraїni. Kyi'v: Osvita (in Ukrainian).
- Dixit, V.M., Green, S., Sarma, V., Holzman, L.B., Wolf, F.W., O'Rourke, K., Ward, P.A., Prochownik, E.V., & Marks, R.M. (1990). Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. The Journal of Biological Chemistry. 265(5), 2973–2978. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2406243>.
- Dovgij, Ju.Ju., Feshhenko, D.V., & Begas, V.L. (2008). Osobennosti jepizootologii nematodozov ohotnichej fauny na primere pogolov'ja dikih kabanov iz Gosudarstvennogo leso- ohotnichego hozjajstva «Dubenskoe» Rovenskoj oblasti. Parazitarnye bolezni cheloveka, zhivotnyh i rastenij: tr. IV Mezhdunar. nauchno-prakt. konf. Vitebsk, 328–330 (in Russian).
- Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal J., & Foey, A.D. (2013). Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and immunopathology. Nutrients. 5(6), 1869–1912. doi: 10.3390/nu5061869.

- Jones, S., & Versalovic, J. (2009). Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and antiinflammatory factors. *BMC Microbiology*. 9, 35. doi: 10.1186/1471-2180-9-35.
- Krasil'nikov, A.P. (1995). *Spravochnik po antiseptike: spravochnoe izdanie*. Mn.: Vysh. Shkola (in Russian).
- Malynin, O.A., Shuljak, V.D., & Voloshhenko, V.V. (1998). Dosjagnennja z farmakologii' i toksykologii' v IEKVM. *Veterynarna medycyna*. 75, 159–166 (in Ukrainian).
- Peleno, R.A. (2016). The indicators of anti lysozyme and anti complementary activity of microorganism of pigs intestine distal department for mixed – protoozic invasion. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*. 18, 3(71), 248–251 doi:10.15421/nvlvet7155.
- Peleno, R.A. (2017). Antiinterfearonic and antilactofearinic activity of microorganisms of distal part of the pigs intestine. *Scientific Messenger LNUVMBT*. 19(82), 56–60. doi: 10.15421/nvlvet8212.
- Pokrovs'kyj, V.I. (1997). Rol' infekcijnyh faktoriv u patologii' shlunkovo-kyshkovogo traktu. *Med. parazytol*. 3, 3–5 (in Ukrainian).
- Stybel', V.V. (2004). Analiz gel'mintologichnoi' sytuacii' sered svynej u gospodarstvah L'vivs'koi' oblasti. *Naukovyj visnyk LNAVIM im. S. Z. Gzhyc'kogo*. 6(2), 197–198 (in Ukrainian).
- Timofeev, B.A., Kirjutkin, G.V., & Bondarenko, V.O. (1997). Bioreks – novoe protivochesotochnoe sredstvo na osnove cipermetrina. *Veterinarija*. 3, 54–58 (in Russian).
- Vozianova, Zh.I. (2000). *Infekciji i parazytarni hворoby*. Kyi'v: Zdorov'ja. 1. – S. 890 – 903. <https://www.twirpx.com/file/1725716/> (in Ukrainian).
- Yevstafieva, V.O., Shendryk, I.N., & Gugosyan, Yu.A. (2017). Content of microorganisms larvae *Strongyloides westeri*. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*. 19(73), 3–6. doi:10.15421/nvlvet7301.
- Yoshida, S. Ono M., Shono T., Izumi H., Ishibashi T., Suzuki H., & Kuwano M. (1997). Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 17(7), 4015–4023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC232254>.