

ОСНОВНАЯ СТАТЬЯ

Лечение инфекционного мастита в период кормления грудью: Сравнение эффективности антибиотиков и перорального вводимых лактобацилл, выделенных из грудного молока

**Rebeca Arroyo, Virginia Martín, Antonio Maldonado, Esther Jiménez, Leónides Fernández, и Juan Miguel Rodríguez**

Отделение питания, броматологии и пищевых технологий Мадридского университета Комплутенсе, Мадрид, Испания

**Актуальность.** Мастит – распространённое заболевание в период кормления грудью, основными возбудителями которого являются стафилококки, стрептококки и (или) коринебактерии. Эффективность перорально вводимых *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 или *Lactobacillus salivarius* СЕСТ5713, двух видов лактобацилл, выделенных из грудного молока, в лечении лактационного мастита оценили и сравнили с эффективностью антибиотикотерапии.

**Методы.** В данном исследовании 352 женщины с инфекционным маститом рандомизированно распределили в 3 группы лечения. В группах А ( $n = 124$ ) и В ( $n = 127$ ) женщины ежедневно в течение 3 недель принимали внутрь  $9 \log_{10}$  колониестимулирующих единиц (КОЕ) *L. fermentum* СЕСТ5716 или *L. salivarius* СЕСТ5713 соответственно, а в группе С ( $n = 101$ ) женщины принимали антибиотики, которые им назначили в соответствующих центрах первичной медико-санитарной помощи.

**Результаты.** В день 0 в образцах грудного молока, собранных в трёх группах лечения, наблюдалось схожее среднее число бактерий ( $4,35 - 4,47 \log_{10}$  КОЕ/мл), и лактобациллы не обнаруживались. В день 21 в группах применения пробиотиков среднее число бактерий ( $2,61$  и  $2,33 \log_{10}$  КОЕ/мл) было ниже, чем в контрольной группе ( $3,28 \log_{10}$  КОЕ/мл). Из образцов грудного молока женщин в группах А и В были выделены бактерии *L. fermentum* СЕСТ5716 и *L. salivarius* СЕСТ5713 соответственно. У женщин, распределённых в группы применения пробиотиков, улучшение было более значительным и частота рецидивов мастита была ниже, чем у женщин, распределённых в группу применения антибиотикотерапии.

**Выводы.** Применение *L. fermentum* СЕСТ5716 или *L. salivarius* СЕСТ5713 представляется эффективной альтернативой антибиотикам, широко назначаемым для лечения инфекционного мастита в период кормления грудью.

**Идентификатор в базе данных ClinicalTrials.gov.** NCT00716183.

Мастит довольно часто развивается в период лактации, его распространённость среди матерей, кормящих грудью, составляет от 3 % до 33 % [1, 2]. Это воспаление не менее чем одной доли молочной железы обычно имеет инфекционное происхождение [3] и обусловлено такими возбудителями как стафилококки, стрептококки и (или) коринебактерии [2]. Традиционно читалось, что основным возбудителем острого мастита является *Staphylococcus aureus* («золотистый стафилококк»), хотя оказалось, что и у человека, и в ветеринарной медицине главной причиной хронического мастита является *Staphylococcus epidermidis* [4-7]. В клинических изолятах этих двух видов стафилококка очень часто наблюдается мультилекарственная резистентность и (или) образование биоплёнок. Это объясняет, почему мастит трудно поддаётся лечению антибиотиками и является одной из основных причин прекращения кормления грудью [2]. В данном контексте разработка новых стратегий лечения, основанных на пробиотиках, применяемых в качестве альтернативы или дополнения к антибиотикотерапии для лечения мастита, выглядит особенно привлекательной.

---

Получено 30 ноября 2009 г.; принято в печать 15 февраля 2010 г.; опубликовано в электронном виде 10 мая 2010 г.  
Адрес для направления корреспонденции и запросов о переиздании: Д-р Хуан Мигель Родригес, отделение питания, броматологии и пищевых технологий Мадридского университета Комплутенсе, 28040 Мадрид, Испания (jmrodrig@vet.ucm.es).

**Clinical Infectious Diseases 2010; 50(12):1551-1558**

© 2010 г., все права принадлежат Американскому обществу инфекционных болезней. Перепечатка воспрещается.  
1058-4838/2010/5012-0001\$15.00

DOI: 10.1086/652763

В предыдущих исследованиях мы выделили из грудного молока здоровых женщин штаммы пробиотических микроорганизмов, к которым относятся лактобациллы [8-10]. Пероральное введение одного из двух штаммов, *Lactobacillus salivarius* СЕСТ5713 и *Lactobacillus gasseri* СЕСТ5714, стало эффективной альтернативой в лечении стафилококкового мастита в тех случаях, когда предыдущие режимы антибиотикотерапии оказывались неэффективными [11]. Целью настоящего исследования была оценка эффективности перорального введения каждого из двух выделенных из грудного молока штаммов лактобацилл (*Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 и *L. salivarius* СЕСТ5713) в лечении лактационного мастита у большего числа женщин и сравнение этого подхода с антибиотикотерапией, которую обычно назначают для лечения данного заболевания.

**Таблица 1. Количество бактерий в грудном молоке и балльный показатель интенсивности боли в молочных железах в начале (день 0) и конце (день 21) исследования**

Переменная	День 0			День 21			<i>p</i> <sup>b</sup>							
	Группа А	Группа В	Группа С	Группа А	Группа В	Группа С <sup>a</sup>								
	<i>n</i>	Среднее значение ± СО	<i>n</i>	Среднее значение ± СО	<i>n</i>	Среднее значение ± СО	Среднее значение ± СО							
Число бактерий														
Всего	124	4,35 ± 0,57	±127	4,47 ± 0,53	±101	4,39 ± 0,41	±0,140	124	2,61 ± 0,64	±127	2,33 ± 0,90	±101	3,28 ± 1,10	±< 0,001
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	92	4,18 ± 0,70	±88	4,30 ± 0,59	±76	4,21 ± 0,52	±0,336	95	2,62 ± 0,49	±80	2,52 ± 0,42	±76	3,31 ± 0,82	±< 0,001
<i>Staphylococcus aureus</i>	67	3,83 ± 0,55	±55	4,06 ± 0,67	±30	3,95 ± 0,54	±0,108	45	2,21 ± 0,50	±40	2,26 ± 0,55	±25	2,97 ± 0,88	±< 0,001
<i>Streptococcus mitis</i>	36	3,96 ± 0,47	±36	4,07 ± 0,51	±35	4,12 ± 0,45	±0,162	32	2,35 ± 0,37	±28	2,29 ± 0,48	±31	3,14 ± 0,72	±< 0,001
<i>Streptococcus salivarius</i>	4	4,39 ± 0,56	±7	4,08 ± 0,59	±4	3,71 ± 0,33	±	3	2,23 ± 0,60	±5	2,09 ± 0,47	±3	3,12 ± 1,09	±
<i>Rothia</i> spp.	2	3,24 ± 0,08	±10	3,87 ± 0,58	±5	3,48 ± 0,42	±	0		7	2,04 ± 0,24	±5	2,42 ± 0,67	±
<i>Corynebacterium</i> spp.	5	3,65 ± 0,60	±2	4,64 ± 0,51	±6	3,86 ± 0,50	±	5	1,94 ± 0,25	±2	2,27 ± 0,04	±5	2,39 ± 0,99	±
Балльный показатель интенсивности боли в молочных железах	124	2,35 ± 1,28	±127	2,16 ± 1,28	±101	2,01 ± 1,09	±0,185	124	8,68 ± 1,06	±127	8,61 ± 1,25	±101	5,81 ± 2,50	±< 0,001

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Данные представлены как  $\log_{10}$  колониестимулирующих единиц/мл, если не указано иное. В группе А женщины принимали *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716; в группе В – *Lactobacillus salivarius* СЕСТ5713; и в группе С – антибиотик. Интенсивность боли в молочных железах оценивалась по балльной шкале от 0 («крайне сильная боль») до 10 («боль отсутствует»). *n* = кол-во женщин в группе или женщин, в грудном молоке которых были обнаружены перечисленные штаммы бактерий; СО = стандартное отклонение.

<sup>a</sup> В день 21 в группе С общее число бактерий (*S. epidermidis*, *S. aureus* и *S. mitis*) и балльный показатель интенсивности боли в молочных железах значительно отличались от таковых в группах А и В (непараметрический критерий множественных сравнений;  $p < 0,00$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

<sup>b</sup> Критерий Крускала-Уоллиса,  $\alpha = 0,05$ .

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

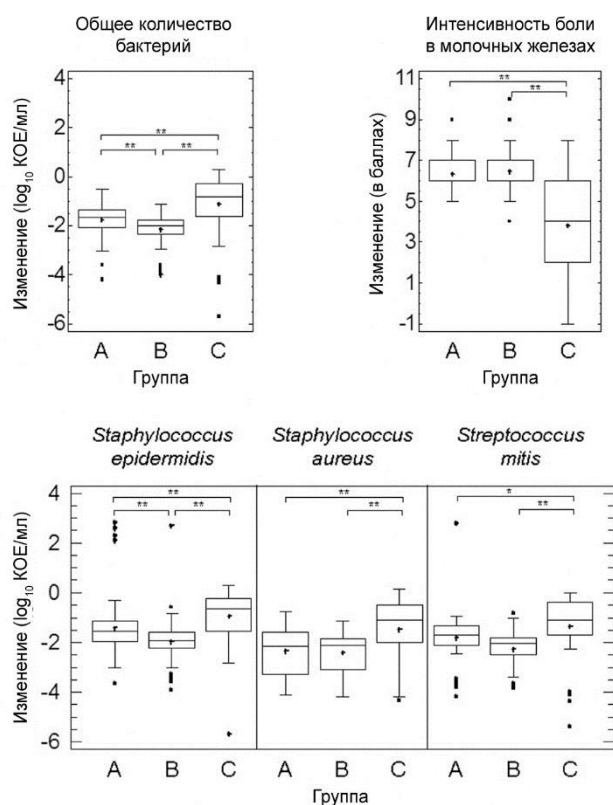
**Дизайн исследования и сбор образцов грудного молока.** В исследовании приняли участие в общей сложности 352 женщины с симптомами мастита. Все женщины отвечали следующим критериям: воспаление молочной железы, болезненные ощущения при кормлении грудью, число бактерий в грудном молоке превышает  $4 \log_{10}$  колониестимулирующих единиц (КОЕ)/мл и число лейкоцитов в грудном молоке превышает  $6 \log_{10}$  клеток/мл. У большинства из них ( $n = 74$ ) наблюдались трещины в области ареолы и (или) сосков. Никто из женщин в течение всего периода исследования не принимал имеющиеся в продаже продукты питания или пищевые добавки, содержащие пробиотики. Женщины с маммарным абсцессом, синдромом Рейно или любой другой патологией молочной железы были исключены из исследования. В соответствии с протоколом, все добровольцы дали письменное информированное согласие, форма которого

была одобрена этическим комитетом Мадридской клинической больницы (Испания). Исследование было зарегистрировано в базе данных ClinicalTrials.gov (NCT00716183). Добровольцы были рандомизированно распределены в 3 группы лечения (2 группы применения пробиотиков и 1 группа применения антибиотиков), при этом во время исследования никто из добровольцев и исследователей не имел сведений о схеме распределения.

Исследование длилось 21 день, и в течение этого периода в группах применения пробиотиков А ( $n = 124$ ) и В ( $n = 127$ ) женщины ежедневно принимали по одной капсуле с 200 мг лиофилизированного пробиотика, содержавшего примерно  $9 \log_{10}$  КОЕ *L. fermentum* СЕСТ5716 [8] или *L. salivarius* СЕСТ5713 [10]. Капсулы были изготовлены на заводе по производству пробиотиков «Пулева Биотек» (Puleva Biotech) (Гранада, Испания) и в течение всего периода исследования хранились при температуре 4 °С. В группе применения антибиотикотерапии (группа С,  $n = 101$ ) женщины принимали антибиотики, назначенные им в соответствующих центрах первичной медико-санитарной помощи. В соответствии с заранее описанной процедурой, образцы грудного молока собрали у добровольцев в начале (день 0) и конце исследования (день 21) [11]. Эволюцию симптомов оценили в день 0 и день 21 на основании описания, предоставленного акушерками соответствующих центров первичной медико-санитарной помощи. В указанных временных точках добровольцев просили оценить интенсивность боли в молочных железах по балльной шкале от 0 («крайне сильная боль») до 10 («боль отсутствует»).

**Подсчёт и идентификация бактерий в образцах грудного молока.** Образцы высевали на пластинки агара Байрда-Паркера, Колумбия, МакКонки и Сабуро с декстрозой и хлорамфениколом (фирмы «БиоМеррьё») для селективного выделения и количественного подсчёта основных возбудителей инфекционного мастита [12] и, параллельно, на пластинки агара для культивирования лактобацилл по Манну, Рогозе и Шарпу (МРШ) («Оксид») с добавлением L-цистеина (0,5 г/л) (МРС-цис) для выделения лактобацилл. Пластинки инкубировали в течение 48 часов при температуре 37 °С в аэробных условиях, за исключением пластинок МРШ-цис, которые инкубировали в анаэробных условиях (85 % азота, 10 % водорода и 5 % углекислого газа) в анаэробной рабочей станции («ДВ Сайентифик»).

Сначала бактерии, выделенные из грудного молока, идентифицировали на видовом уровне при помощи классических морфологических и биохимических исследований. Видовую идентификацию бактерий, принадлежащих к *S. epidermidis* или *S. aureus*, подтверждали с использованием метода мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанного на амплификации генов *dnaJ* с праймерами J-StGen (5'-TGGCCAAAAGAGACTATTATGA-3'), J-StAur (5'-GGATCTCTTTGTCTGCCG-3') и J-StEpi (5'-CCACCAAAGCCTTGACTT-3') в амплификаторе Icycler («Био-Рад Лабораториз»). Пара праймеров J-StGen и J-StAur позволяет выделить видоспецифический фрагмент 337 bp гена *S. aureus* species, а пара праймеров J-StGen и J-StEpi позволяет выделить видоспецифический фрагмент 249 bp гена *S. epidermidis* [11]. Стафилококки идентифицировали посредством частичной амплификации (488 bp) и секвенирования гена *tuf* с праймерами TufStrep-1 (5'-GAAGAATTGCTTGAATTGGTTGAA-3') и TufStrep-R (5'-GGACGGTAGTTGTTGAAGAATGG-3') [13]. Идентификацию потенциальных изолятов *Streptococcus mitis* подтверждали на основании оценки чувствительности к оптохину и растворимости в желчи [14] и проверки латексной агглютинации с использованием набора реактивов Slide Pnemo («БиоМеррьё»).



**Рисунок 1.** Ящичковые диаграммы с усами показывают изменения в числе бактерий (общее число *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus mitis*) в образцах грудного молока и изменения в бальных показателях интенсивности боли в молочных железах, сообщенные участницами исследования после курса лечения пробиотиком (*Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 в группе А и *Lactobacillus salivarius* СЕСТ5713 в группе В) или антибиотиком (в группе С). Различия в изменениях, наблюдавшихся в каждой из групп, были оценены с использованием непараметрического критерия множественных сравнений и показаны в виде горизонтальных линий внутри каждой диаграммы (\* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ). Горизонтальная линия в середине каждого ящика представляет собой медиану, верхняя и нижняя линии ящика представляют собой 75 % и 25 % процентиля соответственно. Средние значения представлены в виде креста, а резко отклоняющиеся значения представлены в виде отдельных точек за пределами ящиков. Интенсивность боли в молочных железах оценивалась по балльной шкале от 0 («крайне сильная боль») до 10 («боль отсутствует»).

Остальные изоляты идентифицировали на основании результатов секвенирования 16S рРНК с праймерами pbl16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и mlb16 (5'-GGCTGCTGGCAGTAGTTAG-3') [15]. Их идентификацию провели на основании самых высоких показателей ( $\geq 99$  %) среди последовательностей, хранящихся в базе данных Европейской лаборатории по молекулярной биологии, используя алгоритм программы Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, средство поиска основного локального выравнивания).

**Идентификация *L. salivarius* СЕСТ5713 и *L. fermentum* СЕСТ5716 в образцах грудного молока.** Метод идентификации, основанный на ДНК-ДНК гибридизации колоний, был разработан для того, чтобы выяснить, присутствуют ли лактобациллы в грудном молоке после их введения внутрь. С этой целью были разработаны 2 видоспецифических зонда на основе уникальных последовательностей 16S рРНК. Для идентификации *L. salivarius* фрагмент (210 bp) амплифицировали из геномной ДНК *L. salivarius* СЕСТ5713 с праймерами SAL91F (5'-ATTACCGTAAGAAGT-3') и SAL285R (5'-TATCATCACCTTGGTAG-3'). Параллельно, фрагмент (192 bp) амплифицировали из геномной ДНК *L. fermentum* СЕСТ5716 с праймерами Lfer-3 (5'-ACTAАCTTGACTGATCTACGA-3') и Lfer-4 (5'-TTCACTGCTCAAGTAATCATC-3') [16]. ПЦР была проведена при следующих условиях: 95 °C в течение 2 минут (1 цикл); 95 °C в течение 30 секунд, 46 °C (*L. salivarius*) или 55 °C (*L. fermentum*) в течение 30 секунд и 72 °C в течение 45 секунд (40 циклов); и заключительное удлинение при температуре 72 °C в течение 4

минут. Оба фрагмента для ПЦР очистили при помощи набора для очистки QIAquick PCR («Qiagen») и маркировали с использованием системы фирмы Amersham ECL для прямой маркировки и детектирования нуклеиновых кислот («ДжиИ Хэлскеа»).

Колонии, полученные на пластинках МРШ-цис из образцов грудного молока, собранных в день 21, точно правильными рядами нанесли на 2 набора пластинок МРШ-цис для переноса колоний бактерий методом отпечатков. Затем нейлоновые диски Hybond-N<sup>+</sup> («ДжиИ Хэлскеа») положили непосредственно на поверхность питательной среды и оставили на 1 минуту. Гибридизацию и детектирование провели согласно ранее приведённому описанию [11]. Идентификацию изолятов, дававших положительный сигнал после гибридизации колоний, подтвердили по результатам секвенирования 16S рРНК, как описано выше.

Изоляты *L. salivarius* и *L. fermentum* подвергли генотипированию методом гель-электрофореза в пульсирующем поле (ГЭПП) согласно ранее приведённому описанию [11]. Профили указанных изолятов сравнили с таковыми *L. salivarius* СЕСТ5713, *L. salivarius* СЕСТ4062, *L. salivarius* СЕСТ4063, *L. salivarius* DSM 20492, *L. fermentum* СЕСТ5716, *L. fermentum* СЕСТ285, *L. fermentum* СЕСТ4007 и (или) *L. fermentum*. В качестве стандарта молекулярного размера использовали маркер LMG 8900 Low Range PFG («Нью-Ингленд БайоЛабс»).

**Статистический анализ.** Перед расчётом средних значений и выполнением статистического анализа микробиологические данные, указанные в отчёте как количество КОЕ в 1 мл грудного молока, были преобразованы в логарифмические значения. Указанные в отчёте значения количества бактерий – это средние значения, рассчитанные по результатам двух или трёх определений. Непрерывные переменные «число бактерий» и «балльный показатель интенсивности боли в молочных железах» имели ненормальное распределение. Три вида бактерий обнаруживались в достаточно большом числе образцов грудного молока, что позволило выполнить статистическое сравнение между группами лечения. Для определения статистически значимых различий в числе бактерий (общее число всех видов и основного вида бактерий) и балльных показателях интенсивности боли в молочных железах в начале (день 0) и конце (день 21) исследования были рассчитаны критерии Крускала-Уоллиса. Тот же подход использовался для определения того, имелись ли межгрупповые различия в выраженности изменений указанных переменных. При обнаружении статистически значимых различий выполнялись непараметрические множественные сравнения для того, чтобы определить, пары групп, между которыми имелись эти различия. Взаимосвязь между частотой рецидивов мастита и лечением сравнили при помощи критерия согласия Пирсона  $\chi^2$  (хи-квадрат). Взаимосвязь между числом бактерий и балльным показателем интенсивности боли в молочных железах проанализировали при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена для непараметрических данных. Уровень значимости был установлен на 0,05. Все анализы были выполнены с использованием пакета программного обеспечения SAS, версия 9.1 («САС Институт»).

**Таблица 2. Снижение числа бактерий в грудном молоке и изменение в балльном показателе интенсивности боли в молочной железе со дня 0 до дня 21 в зависимости от антибиотиков, назначенных женщинам в группе С**

Переменная	Амоксициллин + Амоксициллин клавулановая кислота		Котримоксазол		Клоксациллин		Эритромицин		p <sup>a</sup>		
	n	Среднее значение ± СО	n	Среднее значение ± СО	n	Среднее значение ± СО	n	Среднее значение ± СО			
Снижение количества бактерий <sup>b</sup>											
Всего	39	-1,22 ± 0,84	23	-0,55 ± 0,56	19	-2,50 ± 1,21	18	-0,27 ± 0,41	2	0 ± 0,04	< 0,001
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	-1,15 ± 0,67	18	-0,50 ± 0,59	11	-2,21 ± 1,30	15	-0,17 ± 0,37	1	0,03 ± НП	< 0,001
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	-1,74 ± 1,28	12	-0,79 ± 0,59	6	-2,89 ± 1,53	2	-0,05 ± 0,25	0		0,006
<i>Streptococcus mitis</i>	15	-1,20 ± 0,94	4	-1,66 ± 1,67	6	-2,18 ± 1,00	9	-0,85 ± 1,39	1	-0,03 ± НП	0,018
Изменение в балльном показателе интенсивности боли в молочных железах <sup>c</sup>	39	4,67 ± 1,90	23	2,61 ± 2,52	19	6,05 ± 1,13	18	1,50 ± 2,15	2	0 ± 0	< 0,001

**ПРИМЕЧАНИЕ.** *n* = количество женщин в группе или женщин, у которых в грудном молоке были обнаружены перечисленные виды бактерий; НП = не применимо.

<sup>a</sup> Критерий Крускала-Уоллиса, за исключением данных по эритромицину.

<sup>b</sup> Снижение количества бактерий рассчитали согласно следующей формуле:  $\Delta \log_{10}$  колониестимулирующих единиц на мл.

<sup>c</sup> Интенсивность боли в молочных железах оценивалась по балльной шкале от 0 («крайне сильная боль») до 10 («боль отсутствует»), и в оценке изменения балльного показателя интенсивности боли нулевой показатель означал отсутствие изменения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Число бактерий в образцах грудного молока.** В день 0 средние значения общего числа бактерий в грудном молоке были очень схожими в трех группах и варьировали от 4,35 до 4,47  $\log_{10}$  КОЕ/мл (таблица 1). Преобладающими видами были бактерии *S. epidermidis* (выделенные у 73 % женщин), *S. aureus* (у 43 %) и *S. mitis* (у 30 %) (таблица 1). Другие виды бактерий были обнаружены менее чем в 5 % образцов, и лактобациллы не были обнаружены ни в одном из образцов. В день 21 между тремя группами наблюдались различия в общем числе бактерий (критерий Крускала-Уоллиса,  $p < 0,001$ ) (таблица 1). В группах применения пробиотика средние значения  $\log_{10}$  общего числа бактерий (2,61 и 2,33  $\log_{10}$  КОЕ/мл в группах А и В соответственно) были значительно ниже ( $p < 0,001$ ), чем соответствующее значение в группе применения антибиотика (3,28  $\log_{10}$  КОЕ/мл). В группах А и В общее число бактерий снизилось на 1,74 и 2,15  $\log_{10}$  цикла соответственно, тогда как в группе применения антибиотика снижение было значительно менее выраженным (1,10  $\log_{10}$  цикла) (рисунок 1). В день 21 распределение видов бактерий в образцах грудного молока было схожим с таковым, наблюдавшимся в день 0. В конце исследования между тремя группами наблюдались значительные различия в числе всех доминирующих видов бактерий (*S. epidermidis*, *S. aureus* и *S. mitis*) (критерий Крускала-Уоллиса,  $p < 0,001$ ), и в группах применения пробиотика число этих видов бактерий было неизменно ниже ( $p < 0,001$ ), чем в группе применения антибиотика (таблица 1).

**Таблица 3. Дополнительные исходы в исследовании лечения инфекционного мастита в период кормления грудью**

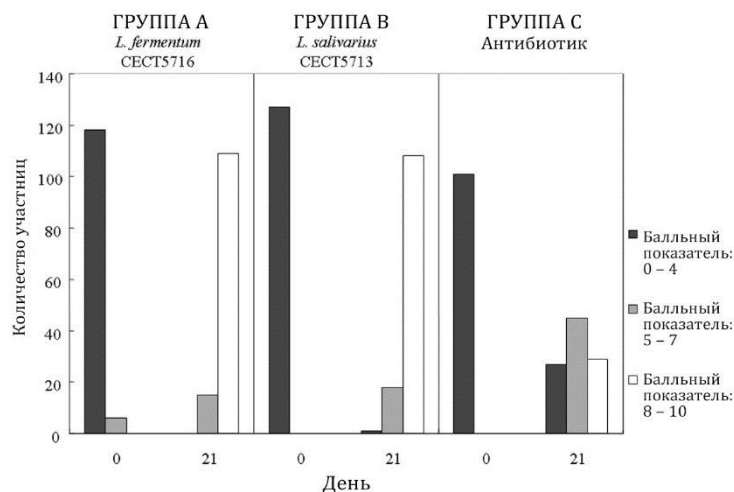
Переменная	Кол-во (%) женщин					
	Кол-во женщин	С лактобациллами	С рецидивом <sup>a</sup>	С вагинальным кандидозом <sup>b</sup>	С метеоризмом	Прекратившие кормление грудью
<b>Пробиотик</b>						
<i>Lactobacillus fermentum</i> СЕСТ5716	124	67 (54,0)	13 (10,5) <sup>c</sup>	0 (0)	9 (5,6)	0 (0)
<i>Lactobacillus salivarius</i> СЕСТ5713	127	68 (53,5)	9 (7,1) <sup>c</sup>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Всего	251	135 (53,8)	22 (8,8) <sup>d</sup>	0 (0)	9 (3,6)	0 (0)
<b>Антибиотик</b>						
Амоксициллин	+39	0 (0)	18 (46,1)	1 (2,56)	0 (0)	0 (0)
клавулановая кислота						
Амоксициллин	23	0 (0)	8 (34,8)	5 (21,7)	0 (0)	1 (4,3)
Котримоксазол	19	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Клоксациллин	18	0 (0)	5 (27,8)	3 (16,7)	0 (0)	8 (44,4)
Эритромицин	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Всего	101	0 (0)	31 (30,7) <sup>d</sup>	9 (8,9)	0 (0)	9 (8,9)

<sup>a</sup> Рецидив определялся как новый эпизод мастита (наличие клинических симптомов и концентрация бактерий  $> 4 \log_{10}$  колониестимулирующих единиц [КОЕ]/мл), зарегистрированный в периоде последующего наблюдения длительностью 3 месяца после того, как эти параметры достигли физиологических значений (отсутствие клинических симптомов и концентрация бактерий  $< 3 \log_{10}$  КОЕ/мл).

<sup>b</sup> Вагинальный кандидоз определялся как клинические симптомы, характерные для данного заболевания, сопровождающиеся высокой плотностью популяции бактерий *Candida albicans* в культуре вагинальных выделений в чашках с агаром Сабуро с декстрозой и хлорамфениколом (фирмы «БиоМервё»).

<sup>c</sup>  $\chi^2 = 0,91$ ,  $p = 0,340$ .

<sup>d</sup>  $\chi^2 = 27,08$ ,  $p < 0,001$ .

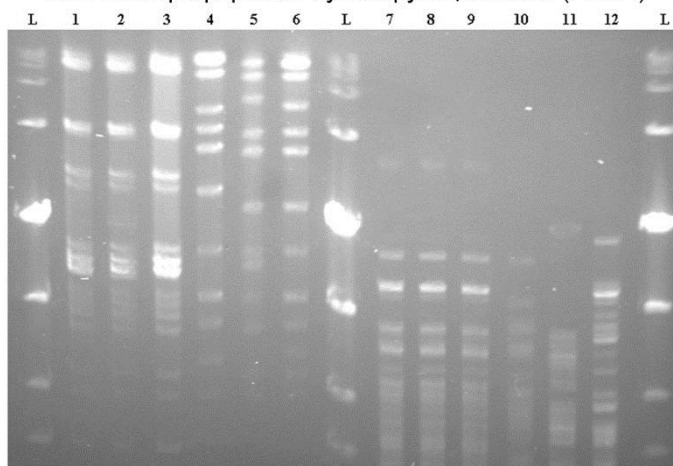


**Рисунок 2.** Распределение балльных показателей интенсивности боли в молочных железах, сообщённые участницами исследования в начале (день 0) и конце (день 21) исследования, в группах применения пробиотиков (группа А, *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716; и группа В, *Lactobacillus salivarius* СЕСТ5713) и группе применения антибиотиков (группа С). Балльные показатели интенсивности боли в молочных железах разделили на 3 категории: 0 – 4 («крайне сильная боль»); 5 – 7 («дискомфорт»); и 8 – 10 («боль отсутствует»).

Самое значительное снижение числа бактерий наблюдалось в группе В (*L. salivarius*) (рисунок 1). Между двумя группами применения пробиотиков имелись статистически значимые различия ( $p < 0,001$ ) в показателях снижения общего числа бактерий и числа бактерий *S. epidermidis*, хотя в обеих группах применения пробиотиков женщины сообщили об одинаковом изменении в балльных показателях интенсивности боли в молочных железах (рисунок 1). Больше всего снизилось число бактерий *S. aureus* (на 2,3 и 2,4  $\log_{10}$  КОЕ/мл в группах А и В и 1,5  $\log_{10}$  КОЕ/мл в группе применения антибиотиков) (рисунок 1).

В группе С женщины принимали следующие назначенные им антибиотики: амоксициллин + клавулановая кислота (38,6 %), амоксициллин (22,8 %), котримоксазол (18,8 %), клексациллин (17,8 %) и эритромицин (2 %) (таблица 2). Эффективность этих антибиотиков в отношении снижения числа бактерий значительно варьировала (критерий Крускала-Уоллиса,  $p < 0,001$  для общего числа бактерий и *S. epidermidis*,  $p = 0,005$  для *S. aureus* и  $p = 0,018$  для *S. mitis*). Котримоксазол снизил среднее число бактерий на 2,5  $\log_{10}$  цикла и был особенно эффективен против *S. aureus*. Амоксициллин + клавулановая кислота вызвал снижение среднего числа бактерий на 1,22  $\log_{10}$  цикла, а эффективность амоксициллина и клексациллина была низкой. У двух женщин, принимавших эритромицин, число бактерий не изменилось к концу исследования (таблица 2). В день 21 лактобациллы не обнаруживались в образцах, собранных в группе применения антибиотиков, но были выделены более чем из половины образцов, собранных у женщин в группах применения пробиотиков (таблица 3).

Характер электрофорограмм, полученных методом  
гель-электрофореза в пульсирующем поле (ГЭПП)



**Рисунок 3.** Паттерны связывания на электрофореграммах, полученных методом гель-электрофореза в пульсирующем поле (ГЭПП) расщеплённой рестриктазой *SmaI* геномной ДНК, выделенной из *Lactobacillus salivarius* СЕСТ5713 (дорожка 1), двух изолятов грудного молока, гибридизированных с зондом *L. salivarius* в рамках анализа методом гибридизации колоний (дорожки 2 и 3), *L. salivarius* СЕСТ4062 (дорожка 4), *L. salivarius* СЕСТ4063 (дорожка 5), *L. salivarius* DSM 20492 (дорожка 6), *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 (дорожка 7), двух изолятов грудного молока, гибридизированных с зондом *L. fermentum* в рамках анализа методом гибридизации колоний (дорожки 8 и 9), *L. fermentum* СЕСТ285 (дорожка 10), *L. fermentum* СЕСТ4007 (дорожка 11) и *L. fermentum* LMG 8900 (дорожка 12). Дорожка L. представляет собой стандарт низкого градиента пульсирующего поля (ГПП) («Нью-Ингленд БиоЛабс»).

**Эволюция клинических симптомов.** Во всех трёх группах лечения показатели интенсивности боли в молочных железах были схожими в день 0 и варьировали от 2,01 до 2,35 балла (таблица 1). В день 21 показатели интенсивности боли в молочных железах улучшились у большинства участниц, но 11 женщин (11 %) в группе применения антибиотиков, сообщили о том, что у них интенсивность боли не изменилась или даже несколько повысилась. Между группами применения пробиотиков (8,68 и 8,61) и группой применения антибиотиков (5,81) в день 21 наблюдались статистически значимые различия в балльных показателях интенсивности боли в молочных железах (критерий Крускала-Уоллиса,  $p < 0,001$ ) (таблица 1). У женщин, распределённых в группу применения антибиотиков, балльные показатели интенсивности боли в молочных железах варьировали в зависимости от назначенного антибиотика (таблица 2) и значительно отличались друг от друга в конце исследования: 27 женщин сообщили об интенсивной боли (0 – 4 балла), у 45 женщин показатели улучшились, но женщины всё ещё ощущали дискомфорт во время кормления грудью (5 – 7 баллов), и только 29 женщин полностью выздоровели (8 – 10 баллов) (рисунок 2). В группах применения пробиотиков, напротив, большинство женщин (88 % в группе А и 85 % в группе В) полностью выздоровели к концу исследования, а остальные женщины (12 % в группе А и 14 % в группе В) сообщили о незначительном дискомфорте во время кормления грудью. Балльные показатели интенсивности боли в молочных железах в высокой мере зависели от общей бактериальной нагрузки в грудном молоке, как в день 0 (критерий Спирмена,  $\rho = -0,750$ ), так и в день 21 ( $\rho = -0,764$ ) ( $p < 0,001$ ). У большинства женщин, распределённых в любую из двух групп применения пробиотиков, клинические симптомы исчезли или заметно улучшились (таблица 1), тогда как у женщин, распределённых в группу применения антибиотиков, эволюция симптомов варьировала (таблица 2; рисунок 2). Фактически, все женщины ( $n = 9$ ), которые во время исследования приняли решение прекратить кормление грудью, относились к группе применения антибиотиков. В группе применения антибиотиков частота рецидивов мастита (30,7 %) была значительно выше, чем в группах применения пробиотиков ( $\chi^2 = 27,08$ ,  $p < 0,001$ ), но между двумя группами применения пробиотиков не наблюдалось значительных различий в данном параметре оценки (частота в группе А: 10,5 %, и частота в группе В: 7,1 %;  $\chi^2 = 0,91$ ,  $p = 0,340$ ) (таблица 3). У нескольких женщин, принимавших антибиотики (9 [8,9 %]), развился вагинальный кандидоз, тогда как в группах применения пробиотиков этого эффекта не наблюдалось. В большинстве



случаев вагинальный кандидоз был связан с применением амоксициллина ( $n = 5$ ), в остальных случаях – с применением клоксациллина ( $n = 3$ ) или препарата на основе комбинации амоксициллина и клавулановой кислоты ( $n = 1$ ). Наконец, 9 женщин (5,6 %) в группе А сообщили о метеоризме, связанном с приёмом пробиотика *L. fermentum*, хотя следует отметить, что все эти участницы завершили период исследования в соответствии с протоколом.

**Детектирование *L. salivarius* СЕСТ5713 и *L. fermentum* СЕСТ5716.** Типирование лактобацилл провели методом ГЭПП. Полученные профили указывали на то, что все изоляты *L. salivarius* и *L. fermentum*, выявленные методом гибридизации колоний, относились к штаммам СЕСТ5713 и СЕСТ5716 соответственно (рисунок 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе предыдущих исследований мы выделили несколько штаммов лактобацилл из грудного молока, включая *L. salivarius* СЕСТ5713 и *L. fermentum* СЕСТ5716 [8, 10]. Эти штаммы представлялись особенно привлекательными в качестве пробиотиковой альтернативы в лечении мастита из-за их происхождения, безопасности [17] и противоинфекционных [18] и иммуномодулирующих [19] свойств. Ранее было доказано, что молочнокислые бактерии, выделенные из грудного молока, могут предотвращать инфекции молочных желёз, вызванные *S. aureus* [20]. Не так давно в ходе базового исследования был описан потенциал штаммов *L. salivarius* СЕСТ5713 и *L. gasseri* СЕСТ5714, 2, выделенных из грудного молока, в лечении стафилококкового мастита [11]. В сравнении со значением, достигнутым в группе применения антибиотиков, через 30 дней после начала лечения пробиотиками снизили среднее число стафилококков примерно на  $2 \log_{10}$  цикла. На 14-й день у женщин, распределённых в группу применения пробиотиков, клинических признаков мастита не наблюдалось, тогда как в контрольной группе клинические признаки сохранялись на протяжении всего периода исследования.

В данном исследовании лечение пробиотиками привело к снижению числа бактерий в грудном молоке на  $1,7 - 2,1 \log_{10}$  цикла и быстрому улучшению состояния женщин. Итоговое число бактерий составило примерно  $2,5 \log_{10}$  КОЕ/мл, что являлось приемлемой бактериальной нагрузкой в грудном молоке здоровых женщин [2, 20]. После лечения пробиотиками *L. salivarius* СЕСТ5713 и *L. fermentum* СЕСТ5716 обнаруживались в грудном молоке, но требуется провести дополнительные исследования для выяснения путей колонизации молочной железы лактобактериями после их введения внутрь.

Эффективность антибиотиков, назначенных женщинам в группе С, значительно варьировала как в отношении снижения числа бактерий, так и в отношении улучшения балльных показателей интенсивности боли. Хотя гипотетически, всё же имеется вероятность того, что замена антибиотика улучшала результаты терапии в тех случаях, когда лечение оказывалось неэффективным после первых нескольких дней. На самом деле, оценка культуры образцов грудного молока (включая антибиограммы), собранных у женщин с симптомами мастита, по всей видимости, имеет определяющее значение для более целесообразного и эффективного лечения данного заболевания. Например, частота стафилококков, устойчивых к  $\beta$ -лактамам, быстро увеличивается в обществе [21-24], но такие штаммы остаются чувствительными к терапии несколькими антибиотиками, не относящимися к  $\beta$ -лактамам антибиотикам [25]. Однако широко распространённая антибиотикотерапия связана с возрастающей частотой бактериальной резистентности, молекулярными изменениями, которые могут повысить вирулентность разных микроорганизмов и их способность к образованию биоплёнки [26], и (или) различными нежелательными эффектами, включая диарею и вагинальный кандидоз, вызванные приёмом антибиотиков [27]. Поэтому, судя по результатам данного исследования, использование пробиотиков представляется привлекательным подходом к лечению мастита.

Также недавно в ходе двух полевых исследований протестировали использование молочнокислых бактерий в лечении мастита у коров и сравнили этот подход с традиционной антибиотикотерапией [28, 29]. Результаты обоих исследований указывают на то, что лечение интрамаммарного мастита пробиотиком *Lactococcus lactis* DPC3147 обладает, по меньшей мере, такой же эффективностью, как и широко применяемые режимы антибиотикотерапии. Результаты анализов, проведённых методом проточной цитометрии, свидетельствуют о том, что пять штаммов *L. lactis* могут специфически запускать иммунный ответ молочной железы для того, чтобы вызвать накопление полиморфно-ядерных лейкоцитов [29]. Эти результаты указывают на

то, что механизм, лежащий в основе лечения мастита пробиотиками, связан со стимуляцией внутримаммарной иммунной системы организма-хозяина.

Стафилококки являются основным возбудителем инфекционного мастита в период кормления грудью. На видовом уровне самыми распространёнными возбудителями традиционно считались бактерии *S. aureus*; однако в ходе последних исследований была выявлена возрастающая значимость *S. epidermidis* в этиологии мастита у коров и человека [4-7]. Действительно, инокуляция штаммов *S. epidermidis*, выделенных у женщин, страдающих маститом, в молочные железы лактирующих мышей ведёт к появлению у животных клинических и гистологических признаков мастита [30]. В ходе данного исследования из грудного молока женщин с маститом также часто выделялись виды стрептококка (*S. mitis*). Группа *S. mitis* включает 11 видов бактерий, которые, наряду с одним из лидирующих патогенов человека (*Streptococcus pneumoniae*), традиционно считались прототипами комменсалов желудочно-кишечного тракта и верхних дыхательных путей. Однако в последние годы стало очевидно, что патогенный потенциал *S. mitis* недооценивался [14, 31].

Таким образом, результаты данного исследования указывают на то, что *L. salivarius* СЕСТ 5713 и *L. fermentum* СЕСТ5716 можно использовать в качестве эффективной альтернативы антибиотикам в лечении мастита. В настоящее время продолжается работа по выяснению механизмов, лежащих в основе этих эффектов.

## Благодарность

**Финансовая поддержка.** Министерство образования и науки, Испания (FUN-C-FOOD [Consolider-Ingenio 2010] и проекты AGL2007-62042).

**Потенциальные конфликты интересов.** Все авторы: конфликт интересов отсутствует.

## Список литературы

1. Foxman B, D'Arcy H, Gillespie B, Bobo JK, Schwartz K. Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *Am J Epidemiol* **2002**; 155:103-114.
2. World Health Organization (WHO). Mastitis: causes and management. Geneva, Switzerland: WHO, **2000**.
3. Lawrence RA, Lawrence RM. Breastfeeding: a guide for the medical profession. 6th ed. St. Louis: Elsevier Mosby, **2005**.
4. Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, et al. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiol* **2009**; 9:82.
5. dos Santos Nascimento J, Fagundes PC, de Paiva Brito MA, dos Santos KR, do Carmo de Freire Bastos M. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol* **2005**; 106:61-71.
6. Thorberg BM, Kuhn I, Aarestrup FM, Brandstrom B, Jonsson P, Danielsson-Tham ML. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet Microbiol* **2006**; 115:163-172.
7. Zhang S, Maddox CW. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infect Immun* **2000**; 68:1102-1108.
8. Martín R, Langa S, Reviriego C, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* **2003**; 143:754-758.
9. Martín R, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J Hum Lact* **2005**; 21:8-17.
10. Martín R, Jiménez E, Olivares M, et al. *Lactobacillus salivarius* СЕСТ 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int J Food Microbiol* **2006**; 112:35-43.
11. Jiménez E, Fernández L, Maldonado A, et al. Oral administration of lactobacilli strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol* **2008**; 74:4650-4655.
12. Delgado S, Arroyo R, Martín R, Rodríguez JM. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infect Dis* **2008**; 8:51.

13. Collado MC, Delgado S, Maldonado A, Rodríguez JM. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* **2009**; 48:523-528.
14. Whatmore AM, Efstratiou A, Pickerill AP, et al. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of “atypical” pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect Immun* **2000**; 68:1374-1382.
15. Kullen MJ, Sanozky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J Appl Microbiol* **2000**; 89:511-516.
16. Song Y, Kato N, Liu C, Matsumiya Y, Kato H, Watanabe K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* **2000**; 187:167-173.
17. Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero MP, Rodríguez JM, Xaus J, Olivares M. Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk. *J Dairy Res* **2009**; 76: 216-221.
18. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* **2006**; 101:72-79.
19. Díaz-Ropero MP, Martín R, Sierra S, et al. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol* **2007**; 102:337-343.
20. Heikkilä MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* **2003**; 95:471-4178.
21. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposed risk. *JAMA* **1998**; 279:593-598.
22. Saiman L, O’Keefe M, Graham PL III, et al. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. *Clin Infect Dis* **2003**; 37:1313-1319.
23. Jones TF, Creech CB, Erwin P, Baird SG, Woron AM, Schaffner W. Family outbreaks of invasive community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* **2006**; 42:e76-e78.
24. Reddy P, Qi C, Zembower T, Noskin GA, Bolon M. Postpartum mastitis and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* **2007**; 13:298-301.
25. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* **2003**; 290:2976-2984.
26. Dancer SJ. How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *Lancet Infect Dis* **2004**; 4:611-619.
27. Pirotta MV, Garland SM. Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. *J Clin Microbiol* **2006**; 44:3213-3217.
28. Klostermann K, Crispie F, Flynn J, Ross RP, Hill C, Meaney W. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *J Dairy Res* **2008**; 75:365-373.
29. Crispie F, Alonso-Gómez M, O’Loughlin C, et al. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *J Dairy Res* **2008**; 75:374-384.
30. Thomsen AC, Mogensen SC, Love Jepsen F. Experimental mastitis in mice induced by coagulase-negative staphylococci isolated from cases of mastitis in nursing women. *Acta Obstet Gynecol Scand* **1985**; 64:163-166.
31. Kilian M, Poulsen K, Blomqvist T, et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its dose commensal relatives. *PLoS ONE* **2008**; 3:e2683.