

© А.Н.Мустанов, Л.Г.Баженов, А.С.Неъматов, Е.В.Артемова, 2008

## А.Н.Мустанов, Л.Г.Баженов, А.С.Неъматов, Е.В.Артемова ПРОТИВОХОЛЕРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛАКТОБАКТЕРИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ХОЛЕРЫ

Центр профилактики карантинных и особо опасных инфекций МЗ РУз.,  
Республиканский специализированный центр хирургии им. ак. В.Вахидова,  
Ташкент, Республика Узбекистан

### Аннотация:

Из кисломолочных продуктов выделена культура лактобактерий *L.bulgaricus* 3б, характеризующаяся выраженной антагонистической активностью против широкого спектра холерных вибрионов (протестирован 21 штамм *Vibrio cholerae*) и стабильностью биологических свойств. Противохолерная активность данного штамма лактобактерий существенно превышала таковую других лабораторных и коммерческих культур лактобактерий. В эксперименте установлена высокая лечебная и профилактическая эффективность культуры *L. bulgaricus* 3б и приготовленного на их основе кисломолочного продукта при заражении кроликов-сосунков вирулентными штаммами *V. cholerae*, что делает штамм *L. bulgaricus* 3б весьма перспективным для дальнейшего изучения в целях терапии и профилактики холеры.

### Ключевые слова:

холера, холерный вибрион, *Lactobacillus* spp., *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, противохолерная активность, лечение, профилактика

Холера продолжает оставаться одной из актуальных и социально-значимых опасных инфекционных болезней [4, 6]. При этом проблема выбора средств для экстренной профилактики и этиотропной терапии холеры осложняется не только широким распространением штаммов возбудителя с множественной устойчивостью к антимикробным препаратам, но и возможностью изменения маркеров резистентности в пределах одного региона и даже в течение одной эпидемической вспышки [2, 7]. В этой связи перспективным представляется разработка и внедрение в практику здравоохранения эффективных биотерапевтических препаратов-пробиотиков, на основе физиологичных для человека микроорганизмов – антагонистов холерных вибрионов [3].

Целью настоящей работы явилось изучение противохолерных свойств лабораторных штаммов лактобацилл, выделенных из кисломолочных продуктов, в исследованиях “in vitro” и “in vivo”.

### Материалы и методы исследования

Культуры лактобактерий выделяли из различных источников на специальной питательной среде [1] и на среде Rogosa SL Agar (“HiMedia”, India) в микроаэрофильных условиях. Для дальнейших исследований отобрали 3 штамма лактобактерий: *Lactobacillus bulgaricus* 3б, *L. acidophilus* 311, *L. acidophilus* 320. В качестве контроля использовали коммерческие препараты лактобактерий: Лактобактерин (ЛБ1) (Уфа, РФ) и Лактобактерин (ЛБ2) (“Нихол”, Ташкент, РУз.)

Тест-культуры *Vibrio cholerae* (21 штамм) были изолированы от больных с помощью традиционных методов [5] и хранились в лаборатории Национальной коллекции бактерий возбудителей I-II групп инфекций Центра профилактики карантинных и особо опасных инфекций МЗ РУз. Определение антагонистической активности выполняли методом отсроченного антагонизма, для чего в центре пластинки щелочного агара проделывали лунку, в которую закапывали свежесквашенное культурами лактобактерий обезжиренное молоко (108 КОЕ/мл). В течение суток чашки с лактобактериями выдерживали в термостате при 37°С для осуществления диффузии в агар антибиотических веществ, после чего радиально к лунке штрихом подседали суточные культуры *V. cholerae*. Посевы инкубировали при 37°С в течение 24 ч. Об антагонизме и его степени судили по величине зоны отсутствия роста от края лунки до начала мик-

робного роста.

Экспериментальные исследования выполнены на 16-ти крольчатах-сосунках 9-дневного возраста, массой 130-160 г. В качестве возбудителя использовали вирулентный штамм № 1502, выделенный от больного холерой и имеющий эпидемическую значимость. Для заражения кроликов-сосунков готовили суточную культуру *V. cholerae* штамма № 1502, из нее делали высеив на щелочной агар, который инкубировали при температуре 37°С. Из подросшей 4-х часовой агаровой культуры готовили 1 млрд. микробную взвесь на физиологическом растворе. Затем методом титрования готовили необходимое для заражения экспериментальных животных разведение 105 КОЕ/мл. 8 животных заражали культурой *V. cholerae* в дозе 105 микробных тел внутрикишечно по методу Дата и Хабу (1957). На следующий день, когда у крольчат-сосунков обнаруживалась диарея, пяти из них (1-я группа, лечение) вводили через рот 1 мл свежесквашенного лактобактериями (*L. bulgaricus* 3б) обезжиренного молока (108 КОЕ/мл), а оставшимся 3-м животным (3-я группа, контрольная), молоко не вводили. Пяти крольчатам-сосункам (2-я группа, профилактическое действие) после 6-ти часового голодания вводили через рот 1 мл свежесквашенного лактобактериями обезжиренного молока (108 КОЕ /мл) и на следующий день их заражали культурой *V. cholerae* 1502 в дозе 105 микробных тел внутрикишечно. Животные 4-й контрольной группы (3 шт.) получали аналогичным образом только физиологический раствор. Крольчат-сосунков кормили теплым молоком. Наблюдение за зараженными крольчатами осуществляли в течение 5-ти суток ежедневно, отмечая наличие диареи. Выжившими считали животных, оставшихся живыми через 5 суток наблюдения.

### Результаты исследования и обсуждение

Установлено, что у двух культур лактобактерий (320 и ЛБ1) полностью отсутствовали антагонистические свойства в отношении холерных вибрионов. Другие культуры лактобактерий (3б, 311, ЛБ2) в той или иной степени подавляли рост этих патогенов. Из них наименее активным оказался коммерческий штамм ЛБ2. Он незначительно угнетал рост 7 культур *V. cholerae* из 21 испытанного штамма (33,3%). Оставшиеся культуры лактобактерий, выделенные нами из кисломолочных продуктов (3б, 311), ингибировали рост всех изученных штаммов холерных вибрионов, причем культура 3б была значительно активнее штамма 311.

Анализируя природу антагонистической активности культуры лактобактерий 3б, можно сделать вывод, что эта активность не связана с ее кислотопродуцирующей активностью, так как она гораздо ниже таковой штамма 311,

### Contact Information:

Д-р Мустанов Абдусамат Норсаатович  
E-Mail: leobaj@tps.uz

характеризующего гораздо более высокой кислородопродуцирующей активностью. Видимо эти микроорганизмы продуцируют другие антимикробные субстанции. Дополнительные исследования показали, что культура 3b характеризуется стабильными биологическими свойствами и высокой воспроизводимостью своего противохолерного действия.

Следующий этап исследований был направлен на изучение лечебного и профилактического действия *L. bulgaricus* 3b на модели холерной инфекции у крольчат-сосунков, зараженных вирулентным штаммом *V. cholerae* 1502.

Установлено, что у 8-ми крольчат-сосунков, зараженных культурой *V. cholerae* 1502, на следующий день развилась диарея. У 5-ти из них после введения через рот 1 мл свежесквашенного лактобактериями *L. bulgaricus* 3b молока на следующий день обнаружена незначительная диарея, а в последующие дни диарея вовсе не отмечалась, но один из них на пятый день наблюдения пал. При его вскрытии, внутренние органы оказались без видимых изменений, толстый кишечник был слегка вздут. При исследовании внутренних органов холерный вибрион не был обнаружен.

Забой 4-х не павших животных произвели через 5 суток после заражения. У забитых животных внутренние органы были без видимых изменений, при их бактериологическом исследовании *V. cholerae* не выделен.

У троих крольчат-сосунков (группа 3, контрольная), которым не вводилось сквашенное лактобактериями молоко, диарея усиливалась, они были малоподвижными и на третий день пали, при вскрытии: тонкий кишечник гиперемирован, толстый кишечник растянут, наполнен прозрачной жидкостью, характер жидкости серозный. При бактериологическом исследовании внутренних органов выделен холерный вибрион.

В контрольной группе (4-я группа) у животных диарея не обнаружена, забой их произведен на 6-ой день, внутренние органы без видимых изменений, при бактериологическом исследовании *V. cholerae* не выделен.

Таким образом, экспериментальные исследования показали, что после заражения крольчат-сосунков культурой *V. cholerae*, у животных появились клинические признаки заболевания холерой, то есть, диарея и малоподвижность. Но после введения через рот свежесквашенного лактобактериями *L. bulgaricus* 3b обезжиренного молока у животных клинические признаки заболевания холерой исчезли, то есть диарея уменьшилась, животные начали поправляться. При вскрытии на 6-й день после заражения во внутренних органах животных патологические изменения не выявлены. При бактериологическом исследовании внутренних органов холерный вибрион не выделен. Вышеизложенное доказывает лечебную эффективность культуры лактобактерий *L. bulgaricus* 3b в отношении экспериментальной холеры.

Кроме того, результаты данного эксперимента свидетельствуют о том, что у животных с предварительно введенным через рот свежесквашенным лактобактериями *L. bulgaricus* 3b молоком, последующее их заражение культу-

рой *V. cholerae* не сопровождалось развитием холеры и отсутствием соответствующих клинических признаков. При вскрытии этих крольчат-сосунков на 6-й день после заражения во внутренних органах патологические изменения не были обнаружены. При бактериологическом исследовании внутренних органов холерный вибрион не выделен.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали высокую терапевтическую и профилактическую эффективность культуры лактобактерий *L. bulgaricus* 3b и приготовленного на их основе кисломолочного продукта при заражении экспериментальных животных вирулентными штаммами *V. cholerae*.

#### Выводы:

1. Выделена культура лактобактерий *L. bulgaricus* 3b, характеризующаяся выраженной антагонистической активностью против широкого спектра холерных вибрионов и стабильностью биологических свойств. Противохолерная активность данного штамма лактобактерий существенно превышает таковую других лабораторных и коммерческих культур лактобактерий.

2. Штамм лактобактерий *L. bulgaricus* 3b и приготовленный на его основе кисломолочный продукт характеризуются высокой терапевтической и профилактической эффективностью при заражении экспериментальных животных вирулентными культурами *V. cholerae*, что делает этот штамм лактобактерий весьма перспективным для дальнейшего изучения в целях применения при холере и угрозе ее развития у людей.

#### Литература

1. Баженов Л.Г., Артемова Е.В. Питательная среда для культивирования лактобацилл. Патент РУз., 2001, Бюл.2001. - №2.
2. Викторов Д.В., Алексеев В.В., Савченко С.Т., Липницкий А.В. Множественная лекарственная резистентность *Vibrio cholerae*: генетический анализ и молекулярное типирование штаммов возбудителя. // Холера и патогенные для человека вибрионы. Ростов-на-Дону, 2006. - Вып. №19. - С.71-73.
3. Кругликов В.Д., Мазрухо Б.Л., Бардых И.Д. и др. Итоги разработки нового бактериального препарата для профилактики и лечения холеры, других кишечных инфекций и для коррекции дисбиотических состояний. // Холера. Материалы VIII Российской научно-практической конференции по проблеме «Холера». Ростов-на-Дону, 2003. - С.213-216.
4. Ломов Ю.М. Эволюция возбудителя холеры и прогноз по этой инфекции на ближайшее будущее. // Эпидемиол. и инфек. бол. - 2004. - №1. - С. 7-12.
5. Методические указания по лабораторной диагностике холеры. МЗ РУз., Ташкент, 2006, 59 с.
6. Нейматов А.С., Иногамова И.А., Мустанов А.Н. и др. Характеристика культур холерных вибрионов Эльтор 01 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Республики Узбекистан в 2005 году. // Холера и патогенные для человека вибрионы. Ростов-на-Дону, 2004. - Вып. №17. - С.44-46.
7. Campos L.C., Zahner V., Avelar K.E. et al. Genetic diversity and antibiotic resistance of clinical and environmental *Vibrio cholerae* suggests that serogroups are reservoirs of resistance. // Epidemiol. Infect. - 2004. - Vol.132. - P.985-992.

#### A.N.Mustanov, L.G.Bajenov, A.S.Nematov, E.B.Artyomova ANTICHOLERAIC ACTIVITY OF LACTOBACTERIA AND PROSPECTS OF THEIR APPLICATION FOR PREVENTION AND TREATMENT OF THE CHOLERA

Centre of quarantine and special danger infections prevention of Ministry of Health Care of Republic of Uzbekistan;  
Republican specialised centre of surgery named after Academician V. Vahidov, Tashkent, Republic of Uzbekistan

#### Abstract:

The lactobacteria culture *L.bulgaricus* 3b was isolated from cultured milk foods. This culture had expressed antagonistic activity against a wide spectrum of *Vibrio cholerae* and stability of biological properties (21 *Vibrio cholerae* strains were tested). Anticholeraic activity of the given lactobacteria strain essentially exceeded the activity of other laboratory and commercial cultures of lactobacteria. The high-level therapeutic and preventive effectiveness of *L. bulgaricus* 3b culture and the cultured milk food prepared on their basis was established in experiment at infection of rabbits-suckers by virulent *V. cholerae* strains. This made *L. bulgaricus* 3b strain rather perspective for the further study for purposes of application at cholera treatment and prevention.

#### Key words:

cholera, *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus* spp., *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, anticholeraic activity, treatment, prevention