

---

## **АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СПОРОВЫХ ПРОБИОТИКОВ И ВЛИЯНИЕ НА ЛЕКАРСТВЕННУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА**

**А.Л. Лазовская, З.Г. Воробьева, К.Н. Слинниа**

ГНУ Научно-исследовательский ветеринарный институт  
Нечерноземной зоны РФ  
*ул. Ветеринарная, 3, Нижний Новгород, Россия, 603950*

**Н.В. Гришина**

ГУЗ НО Противотуберкулезный диспансер  
Канавинского р-на Н. Новгорода

**М.А. Кульчицкая**

Филиал ФГУП НПО «Микроген» «ИмБио»  
*ул. Грузинская, 44, Н. Новгород, Россия, 603600*

**Е.А. Васильева**

Кафедра микробиологии  
Медицинский факультет  
Российский университет дружбы народов  
*ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198*

Пробиотики Споробактерин и Бактисубтил обладают антагонистической активностью в отношении клинических штаммов микобактерий туберкулеза. Степень антагонистической активности, или индекс блокирования роста, зависит от типа пробиотика и исследуемого клинического изолята. Из 20 штаммов лекарственно-устойчивых микобактерий, подвергшихся действию споровых пробиотиков *in vitro*, у 16 восстановилась чувствительность к 1, 2, 3, 4 или к 5 лекарственным препаратам.

**Ключевые слова:** споровые пробиотики, микобактерии, антагонистическая активность, лекарственная устойчивость, индекс блокирования роста.

В медицинской практике разных стран уже несколько десятилетий успешно применяются биопрепараты на основе апатогенных бактерий рода *Bacillus* для лечения и профилактики дисбиозов и инфекционных заболеваний. Споровые пробиотики обладают набором свойств, позволяющих конкурировать с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. К таким свойствам относятся: антагонистическая активность, способность к адгезии на эпителиоцитах кишечника, определенный уровень резистентности к соляной кислоте, желчи и др. Однако до сих пор не изучалось действие этих препаратов на возбудителей туберкулезной инфекции.

**Целью настоящей работы** явилось изучение антагонистической активности споровых пробиотиков по отношению к туберкулезным микобактериям. Выбран-

ные нами для опытов биопрепараты (Бактисубтил, Споробактерин, Ирилис) согласно техническим условиям удовлетворяют вышеперечисленным требованиям, но разработчики и производители препаратов не изучали их взаимодействие с кислотоустойчивыми микобактериями.

В начале исследования проводилось изучение антагонизма трех споровых пробиотиков по отношению к туберкулезным референс-штаммам, к клиническим штаммам микобактерий туберкулеза, и к микобактериям, выделенным от сельскохозяйственных животных. Туберкулез и другие микобактериозы с.-х. животных являются значительной проблемой животноводства России. Новорожденные животные инфицируются, в основном, алиментарным путем в первые дни жизни, поэтому применение пробиотиков у новорожденных животных в хозяйствах, где выявляются положительно реагирующие на туберкулин взрослые животные, могло бы явиться одним из немногих методов профилактики туберкулеза и других микобактериозов.

На втором этапе исследования проводилось изучение взаимодействия споровых пробиотиков и лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий, выделенных от больных туберкулезом людей. В последние годы наряду с ростом показателей заболеваемости и смертности от туберкулеза отмечается увеличение количества полирезистентных штаммов микобактерий туберкулеза. Клиническая картина лекарственно-устойчивого туберкулеза проявляется у больного, когда популяция полирезистентных микобактерий значительно превосходит популяцию бацилл, чувствительных к противотуберкулезным препаратам. Селекция лекарственно-устойчивых мутантов происходит при неадекватной терапии и монотерапии. При лечении туберкулезного очага одним эффективным препаратом происходит подавление микобактерий, чувствительных к данному препарату. В то же время отдельные резистентные микобактерии продолжают делиться и накапливаться, что и приводит к развитию картины лекарственно-устойчивого туберкулеза в результате длительной антибиотикотерапии. При смене препарата происходит селекция бактерий, устойчивых как к первому, так и ко второму препарату. Накопление мутаций, приводящих к лекарственной устойчивости к отдельным противотуберкулезным препаратам, является основной причиной развития множественной лекарственной устойчивости. На основании вышеизложенного целью настоящего исследования явилось изучение влияния пробиотиков на полирезистентные штаммы микобактерий туберкулеза.

**Материалы и методы.** Были исследованы три биопрепарата: Бактисубтил (штамм *Bacillus cereus* IP5832; Франция), Споробактерин (штамм *Bacillus subtilis* 534; Россия), Ирилис (штаммы *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8611 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-8610; Россия).

При изучении антагонистической активности пробиотиков использовали референс-штаммы Academia (*M. tuberculosis*), Vallee (*M. bovis*), Ravenal (*M. bovis*), ГИСК (*M. avium*), полученные из ГИСК им. Л.А. Тарасевича. В качестве индикаторных штаммов также применяли выделенные от крупного рогатого скота (КРС) и идентифицированные нами культурально-биохимическими и хемотаксономи-

ческими методами (4) штаммы № 2, 3 *M. bovis*. Кроме того, от 20 пациентов, больных туберкулезом, были выделены и идентифицированы 20 лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*. Видовая принадлежность штаммов определена культурально-биохимическими, хемотаксономическими методами [4]. Посевным материалом от больных служила мокрота деконтаминированная NALC-NaOH. Посевы образцов мокроты производили на среды Левенштейна—Иенсена и Финн-2.

В работе применяли два метода изучения антагонистической активности пробиотических штаммов против микобактерий туберкулеза [6]. Первый метод предусматривал применение автоклавированных культур пробиотика, а второй метод был основан на использовании фильтратов культуральных жидкостей, полученных с помощью стерилизующих фильтров типа GSO 0,20 мкм. Учет результатов проводили в течение 25 и 30 дней инкубации при температуре 37 °С по индексу блокирования роста (ИБР) микобактерий. Индекс блокирования роста определяли путем вычисления отношения числа колоний, выросших на контрольной среде без пробиотика, к числу колоний, выросших на среде с пробиотиком. Максимумом ИБР считали число 10. Влияние споровых пробиотиков на лекарственную чувствительность микобактерий изучали на 20 клинических штаммах, выделенных от больных туберкулезом людей. Применяли указанные выше способы обработки споровых пробиотиков (6). Чувствительность к лекарственным препаратам определяли в соответствии с Приказом № 109 от 21.09.03. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в РФ». Были использованы в разных концентрациях стрептомицин (10 и 25 мкг/мл), изониазид (1 и 10 мг/мл), канамицин (30 мкг/мл), этамбутол (2 мкг/мл), рифампицин (40 мкг/мл), этионамид (30 мкг/мл), офлоксацин (2 мкг/мл), капреомицин (30 мкг/мл), ПАСК, парааминосалициловая кислота (1 мкг/мл).

**Результаты исследований.** По результатам видовой идентификации штаммы № 1 и 2, выделенные от КРС, определены как *M. bovis*. Выделенные от больных туберкулезом 20 клинических штаммов принадлежали к *M. tuberculosis*. Антагонизм трех споровых биопрепаратов (Бактисубтил, Споробактерин, Ирилис) при взаимодействии с возбудителями туберкулеза выражен неоднозначно и зависит непосредственно от типа пробиотика (от входящих в него штаммов), от штамма микобактерий и от способа обработки препарата-пробиотика (т.е. стерильный фильтрат живой культуры или гретая культура).

Ко всем референс-штаммам исследуемые пробиотики проявляли антагонистическую активность: Бактисубтил — от 2 до 6 ИБР; Споробактерин — от 3 до 9 ИБР; Ирилис — от 3 до 10 ИБР. Исключением в эксперименте с референс-штаммами было отсутствие действия Ирилиса на *M. bovis* (Vallee), но к *M. bovis* (Ravenal) определялся антагонизм, более выраженный у фильтрата живой культуры (10 ИБР)

Выявлена антагонистическая активность против штаммов *M. bovis* (КРС), с колебаниями у Бактисубтила — 5—4 ИБР, у Споробактерина — 7—10 ИБР.

У Ирилиса фильтрат живой культуры оказался более эффективным (8 ИБР) в отношении *M. bovis* (КРС), чем гретая культура (1,5 ИБР).

Как представлено в табл. 1, споровые пробиотики тормозили рост *M. tuberculosis*. Индекс блокирования роста (ИБР) у 20 штаммов микобактерий туберкулеза колебался от 1 до 10, причем все клинические изоляты по среднему значению ИБР можно было условно разделить на три группы: ИБР от 5 до 7 (6 штаммов), ИБР от 3 до 4 (9 штаммов), ИБР от 1 до 2 (5 штаммов). Другим интересным фактом является пролонгирование сроков роста культур на средах с пробиотиками по сравнению с контролем (разница сроков роста в днях — РСР). Показатель РСР колебался от 1 до 13 дней. Отставание роста микобактерий под влиянием пробиотиков также можно оценить, как результат антагонизма.

Таблица 1

**Антагонизм споровых пробиотиков (стерильных фильтратов и гретых суспензий культур) в отношении клинических штаммов *M. tuberculosis***

№ клин. штамма	Бактисубтил (стер. фильтрат)		Бактисубтил (гретая культура)		Споробактерин (стер. фильтрат)		Споробактерин (гретая культура)	
	РСР	ИБР	РСР	ИБР	РСР	ИБР	РСР	ИБР
1	9	4,2	2	1	11	2,2	2	1,9
2	13	4,3	3	3	13	4,3	0	3
3	3	1,1	0	1	—	—	3	1,5
4	3	6	0	1,5	7	3	3	2
5	10	7,5	7	7,5	7	4,3	4	3
6	7	3	7	1	10	1	4	3
7	0	1	0	1	0	4	0	1,3
8	0	2,6	0	1	0	3,8	0	1
9	0	3	3	6	0	5	0	10
10	2	7,5	2	3	0	5	0	2,5
11	4	4,3	4	1,7	7	6	2	6
12	2	10	2	7,5	7	2	2	10
13	7	6	5	1,2	2	1	5	7,5
14	2	3	4	6	2	3	0	1
15	0	5	0	3,8	0	7,5	0	7,5
16	2	2,4	0	3	0	3	0	1,5
17	5	10	3	4,3	5	6	3	3,3
18	3	10	0	5	0	3,3	0	6,7
19	0	6	0	1,5	0	2	0	7,5
20	0	6,7	0	1	0	5	0	6,7

Примечание: ИБР — индекс блокирования роста; РСР — разница сроков роста; (—) — исследование не проводили.

Следует подчеркнуть, что, в отличие от Споробактерина и Бактисубтила, Ирилис состоит из двух штаммов: *B. subtilis* и *B. licheniformis*. В связи с этим представляло интерес изучить в сравнительном аспекте антагонистическую активность пробиотических штаммов Ирилиса по отдельности и в комбинации. Исследование провели на 7 клинических штаммах микобактерий; параллельно оце-

нивали взаимодействие с референс-штаммами и штаммами, выделенными от КРС, как описано выше. Все исследуемые индикаторные штаммы микобактерии были чувствительны к Ирилису. Как уже было отмечено, исключение составлял лишь один референс-штамм *M. bovis* (Vallee).

Изучение Ирилиса в отдельном исследовании штаммов показало, что *B. subtilis* и *B. licheniformis*, входящие в препарат, практически не отличаются по интенсивности антагонистической активности, а комбинация штаммов, представляющая собственно препарат Ирилис, оказывает на микобактерии не суммарное действие, а в пределах ИБР его отдельных штаммов. Оказалось, что стерильный фильтрат Ирилиса более эффективен, чем гретая взвесь культур, что, очевидно, связано с более высокой активностью экстрацеллюлярных продуктов жизнедеятельности пробиотических штаммов, по сравнению с термостабильными клеточными компонентами.

Таким образом, все исследуемые патогенные микобактерии были чувствительны к Ирилису. Действие пробиотика на клинические изоляты неоднозначно зависит от штаммов, возможно, от однородности культур. Отмечались высокие и средние значения ИБР. Антагонистическая активность Ирилиса проявлялась максимально (9—10 ИБР) по отношению к 51% культур микобактерий туберкулеза. У остальных изолятов (49%) показатели антагонизма составляли 3—6 ИБР.

Таким образом можно заключить, что споровые пробиотики Споробактерин, Бактисубтил, Ирилис проявляют антагонистическое действие на микобактерии туберкулеза, однако в разной степени. В проведенных экспериментах была отработана в рабочем режиме методика определения антагонистической активности споровых пробиотиков в отношении микобактерий туберкулеза. В каждом конкретном клиническом случае эта методика позволит провести исследование антагонизма, оценить показатели ИБР и выбрать наиболее эффективный пробиотик для индивидуальной схемы лечения.

Изучение лекарственной чувствительности изолятов, выращенных на средах со стерильным фильтратом и гретой культурой споровых пробиотиков, показало, что восстановление лекарственной чувствительности происходило в 80% случаев, причем 95% исходных культур были полирезистентными. Из 20 штаммов микобактерий у 16 восстановилась чувствительность к одному, двум, трем, четырем или пяти лекарственным препаратам.

В состав фильтратов пробиотических препаратов входит большое количество различных бактериоцинов и протеолитических ферментов, в частности лизоцим. Считается, что *B. subtilis* и другие пробиотические штаммы содержат до 200 антибиотических веществ, влияющих на окружающую микрофлору. Каждая популяция микроорганизмов, подвергаясь действию антибиотиков, содержит определенный процент клеток, сохранивших или восстановивших лекарственную чувствительность. Как правило, лекарственно-устойчивые штаммы имеют какие-то дефекты в структуре клетки, в составе ферментов, в синтезе белка, и потому, возможно, более уязвимы для действия антибиотических веществ и протеолитических

ферментов пробиотиков. По-видимому, биологически активные продукты жизнедеятельности пробиотиков, как экстрацеллюлярного происхождения (фильтрат живой культуры), так и связанные с пробиотической клеткой термостабильные компоненты (гретая культура), подавляют полирезистентные штаммы, нарушая механизмы, обеспечивающие резистентность микобактерий туберкулеза.

Полученные данные открывают перспективу изучения противотуберкулезного действия споровых пробиотиков в клинических условиях *in vivo*, являются обоснованием для включения этих биопрепаратов в схемы комплексного лечения и профилактики туберкулеза.

#### **Выводы.**

1. Пробиотики Споробактерин, Бактисубтил, Ирилис на основе апатогенных споровых культур обладают антагонистической активностью в отношении клинических штаммов *M. tuberculosis*, полученных от больных туберкулезом, и *M. bovis*, выделенных от сельскохозяйственных животных.

2. Степень антагонистической активности пробиотиков (индекс блокирования роста) зависит от типа биопрепарата и исследуемого клинического изолята. Отработана рабочая методика, позволяющая определять степень антагонизма пробиотиков к *M. tuberculosis* в каждом клиническом случае.

3. У лекарственно-устойчивых клинических штаммов микобактерий туберкулеза, подвергшихся действию споровых пробиотиков *in vitro*, в 80% случаев восстанавливалась чувствительность к одному, двум, трем, четырем или пяти антибиотикам.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

- [1] Лазовская А.Л., Воробьева З.Г., Слинина К.Н. Действие пробиотиков на патогенные микобактерии // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2007. — № 7. — С. 25—27.
- [2] Лазовская А.Л., Воробьева З.Г., Слинина К.Н., Кульчицкая М.А. Среда для культивирования микобактерий и нокардиоформных актиномицетов / В сб. «Профилактика, диагностика и лечение болезней, общих для людей и животных» — Ульяновск, 2007. — С. 42—46.
- [3] Воробьева З.Г., Кульчицкая М.А., Слинина К.Н. Методы изучения антагонистической активности бифидобактерий по отношению к микобактериям и нокардиоформным актиномицетам // Биопрепараты. — 2008. — № 1. — С. 6—8.
- [4] Газохроматографический метод идентификации микроорганизмов — возбудителей болезней животных. Методические рекомендации. — Н. Новгород, 1993.
- [5] Оситова И.Г. и др. Споровые пробиотики // Микробиол. — 2003. — № 3. — С. 113—119.
- [6] Воробьева З.Г., Лазовская А.Л., Кульчицкая М.А., Слинина К.Н. Способ определения антагонистической активности бифидобактерий по отношению к микобактериям и родококкам. Патент на изобретение № 2345140 от 27.01.09.

**ANTAGONISTIC ACTIVITY  
OF BACTERIAL SPORE FORMER PROBIOTICS  
IN RESPECT TO MYCOBACTERIA SPECIES  
AND SUSCEPTIBILITY CHANGING TO ANTIBIOTICS**

**A.L. Lazovskaya, Z.G. Vorobyeva,  
K.N. Slinina**

Scientific research veterinary institute of on-black soil zone of RF  
*Veterinarnaya str., blg. 3, Nygni Novgorod city, Russia, 603950*

**N.B. Grishina**

Antituberculous clinic of Kanavin district N. Novgorod city

**M.A. Kulchidskaya**

Department of probiotics, «MICROGEN» ImBio  
*Gruzinskaya str., 44, Nygni Novgorod, Russia, 603600*

**Vasilieva E.A.**

Microbiology Chair  
Medical faculty  
Peoples' Friendship University of Russia  
*Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198*

Studies on antagonistic activity of three bacterial spore former probiotics in respect to mycobacteria species were conducted. The influence of spore probiotics on a susceptibility to antibiotics were examined. Cell suspensions or sterile filtrates of bacilli were put on the medium of Levenstein-Yjensen, on which the indicator strains were seeded.

**Key words:** antagonistic activity, spore former probiotics, mycobacteria, susceptibility to antibiotics.