

СОЗДАНИЕ СИНЕРГИЧЕСКОГО СИНБИОТИКА НА ОСНОВЕ КОНСОРЦИУМА ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ *LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM* 3872, *LIGILACTOBACILLUS SALIVARIUS* 7247 И ПРЕБИОТИКА АКТИГЕН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЁЗА У ЧЕЛОВЕКА И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

А.М. Маноян^{1,*}, А.В. Мачулин², Т.Т. Папазян³, О.Е. Иванова¹, А.Н. Панин¹

¹ ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов»
123022, Российская Федерация, Москва, Звенигородское ш., 5

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
ФГБУН ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований» РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 5

³ ООО «Оллтек»
105062, Российская Федерация, Москва, Подсосенский пер., 26, стр. 3

Salmonella enteritidis (SE) относится к нозокомиальным инфекциям, колонизирует кишечник кур и свиней, что приводит к загрязнению пищевых продуктов и увеличивает риск передачи возбудителя человеку по пищевой цепочке. Штаммы SE с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) особенно опасны для новорождённых детей и молодняка сельскохозяйственных животных. Разработка и практическое использование синергических синбиотиков является новым профилактическим направлением, ограничивающим распространение сальмонеллёзной инфекции. В составе синергического синбиотика сочетаются пробиотики и пребиотики, которые функционируют оптимально. Роль синбиотиков в профилактике SE не изучена. Целью исследования явилось создание синергического синбиотика, обладающего бактерицидной активностью и антиадгезивными свойствами в отношении сальмонелл. В результате проведённых исследований создан инновационный синергический синбиотик, в состав которого входит консорциум пробиотических штаммов лактобацилл *L. fermentum* 3872 и *L. salivarius* 7247, а также пребиотик Актиген, представляющий собой фрагмент клеточной стенки *S. cerevisiae*. В опытах *in vitro* впервые установлено, что консорциум обладает выраженным бактерицидным действием на МЛУ SE. Культуральная жидкость консорциума совместно с пребиотиком Актиген проявляет синергизм антиадгезивной активности в отношении МЛУ SE. Полученные результаты будут использованы для разработки протокола доклинических испытаний эффективности создаваемого синбиотика в опытах *in vivo* на экспериментальных животных.

Ключевые слова: пробиотики, пребиотики, синбиотики, *Salmonella*, адгезия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Маноян А.М., Мачулин А.В., Папазян Т.Т., Иванова О.Е., Панин А.Н. Создание синергического синбиотика на основе консорциума штаммов лактобацилл *Limosilactobacillus fermentum* 3872, *Ligilactobacillus salivarius* 7247 и пребиотика Актиген для профилактики сальмонеллёза у человека и сельскохозяйственных животных. *Биомедицина*. 2024;20(3E):59–64. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-59-64>

Поступила 10.04.2024

Принята после доработки 22.05.2024

Опубликована 01.11.2024

CREATION OF A SYNERGISTIC SYMBIOTIC BASED ON THE CONSORTIUM OF LACTOBACILLI *LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM* 3872, *LIGILACTOBACILLUS SALIVARIUS* 7247, AND THE ACTIGEN PREBIOTIC FOR SALMONELLOSIS PREVENTION IN HUMANS AND FARM ANIMALS

Ashot M. Manoyan^{1,*}, Andrey V. Machulin², Tigran T. Papazyan³, Olga E. Ivanova¹,
Alexander N. Panin¹

¹ All-Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality
123022, Russian Federation, Moscow, Zwenigorodskoe Highway, 5

² Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Pushchino Scientific Center
for Biological Research of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 5

³ ООО "Alltech"
105062, Russian Federation, Moscow, Podsosensky Lane, 26, Building 3

Salmonella enteritidis (SE), referred to nosocomial infections, colonizes the intestines of chickens and pigs. This leads to food contamination and increased risk of pathogen transmission to humans along the food chain. Multidrug-resistant (MDR) SE strains are particularly dangerous for newborn children and young farm animals. The antibiotics traditionally used for the treatment of salmonellosis disturb the balance of the intestinal microbiota. The development and use of synergistic synbiotics is a promising preventive direction in limiting the spread of salmonella infection. Synergistic synbiotics combine prebiotics and probiotics, which thus function optimally. The role of synbiotics in the prevention of SE remains to be elucidated. The aim of this study was to create a synergistic synbiotic with bactericidal activity and anti-adhesive properties against salmonella. As a result of the conducted research, an innovative synergistic synbiotic was created. This preparation comprises a consortium of probiotic strains of lactobacilli *L. fermentum* 3872 + *L. salivarius* 7247 and the Actigen prebiotic (a fragment of the cell wall of *S. cerevisiae*). *In vitro* experiments revealed that the consortium has a pronounced bactericidal effect on MDR SE. The culture fluid of the consortium, together with the Actigen prebiotic, is active and exhibits synergistic anti-adhesive properties against MDR SE. Further studies will apply the results obtained for developing a protocol for preclinical studies of the created symbiotic *in vivo* on experimental animals.

Keywords: probiotics, prebiotics, synbiotics, *Salmonella*, adhesion

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Manoyan A.M., Machulin A.V., Papazyan T.T., Ivanova O.E., Panin A.N. Creation of a Synergistic Symbiotic Based on the Consortium of Lactobacilli *Limosilactobacillus fermentum* 3872, *Ligilactobacillus salivarius* 7247, and the Actigen Prebiotic for Salmonellosis Prevention in Humans and Farm Animals. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):59–64. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-59-64>

Submitted 10.04.2024

Revised 22.05.2024

Published 01.11.2024

Введение

Salmonella enterica — вид грамотрицательных бактерий, содержащий более 2600 различных сероваров, дифференцированных по антигенной презентации [3]. Серовары *S. enteritidis* (SE) и *S. typhimurium* (ST) являются наиболее распространёнными патогенами пищевого происхождения и считаются социально значимыми зооантропонозными инфекциями [1]. Сальмонеллёз, вызываемый сероварами SE и ST, относят к ведущим бактериальным инфекциям в мире [8], от которых страдают более 93 млн людей ежегодно [7]. К концу 20-го века SE занял экологическую нишу, в которой ранее обитал *S. enterica* серовар *Gallinarum* у домашней птицы. Это привело к существенному увеличению в мире числа крупных вспышек сальмонеллёза, а также к росту смертности у домашней птицы и людей [6]. SE относится к нозокомиальным инфекциям. У цыплят-бройлеров и новорождённых детей в возрасте 2–6 недель SE вызывает некротизирующий энтероколит [4].

Традиционно в качестве стратегии борьбы с сальмонеллёзными инфекциями используются антибиотики. Однако применение антибиотиков не только способствовало развитию множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) к антибиотикам среди сероваров сальмонелл, но и нарушало баланс нормальной кишечной микробиоты [5]. Новой альтернативой антибиотикам являются синергические синбиотики, однако их роль в профилактике сальмонеллёза не изучена.

Целью исследования явилось создание синергического синбиотика, обладающего бактерицидной активностью и антиадгезивными свойствами, для профилактики сальмонеллёза у человека и сельскохозяйственных животных.

Материалы и методы

Антагонистическую активность консорциума штаммов лактобацилл *Limosilacto-*

bacillus fermentum 3872 (LF3872) + *Ligilactobacillus salivarius* 7247 (LS7247) в отношении SE патогена определяли методом совместного культивирования [2]. Для изучения способности синбиотика ингибировать адгезию SE к энтероцитам использовали иммортализованную линию эпителиальных клеток Caco-2 тонкого кишечника человека в качестве модельной системы *in vitro*.

Результаты и их обсуждение

Бактерицидная активность консорциума штаммов лактобацилл (LF3872 + LS7247)

Результаты совместного культивирования SE с консорциумом штаммов лактобацилл (LF3872 + LS7247) и отдельными штаммами, входящими в его состав, показаны на рисунке. При совместном культивировании SE с консорциумом лактобацилл в течение 4 ч количество живых клеток патогена снизилось с 3,0 до 2,4±0,2 log КОЕ/мл. Общее количество живых клеток консорциума лактобацилл в течение 4-часового совместного культивирования с SE увеличилось

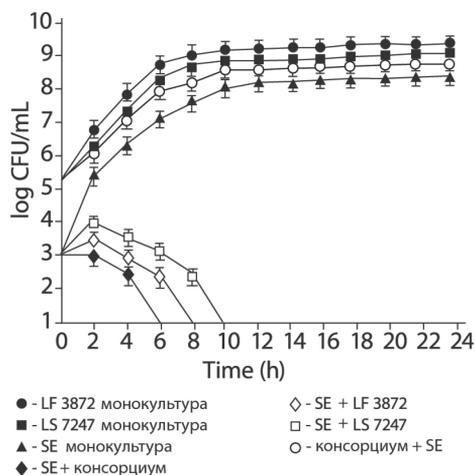


Рис. Бактерицидное действие консорциума штаммов лактобацилл (LF3872 + LS7247) к SE патогену.

Fig. Bactericidal effect of a consortium of lactobacilli strains (LF3872 + LS7247) against the SE pathogen.

Таблица. Синергизм действия ЛКЖ консорциума штаммов лактобацилл (LF3872+ LS7247) и пребиотика Актиген в ингибировании адгезии МЛЮ SE к Сасо-2 энтероцитам
Table. Synergism of the action of LCL of consortium of lactobacilli strains (LF3872+ LS7247) and the prebiotic Actigen in inhibiting the adhesion of MDR SE to Сасо-2 enterocytes

Тест-культура, штамм	ЗФР, Контроль	ЛЮЖ ¹	Актиген ²	ЛЮЖ + Актиген ³
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	31,4±1,6	6,2±0,7**	4,8±0,5**	0,54±0,03***
<i>S. enteritidis</i> ATCC 4931	33,5±1,8	7,5±0,9**	5,3±0,6**	0,69±0,04***
<i>S. enteritidis</i> IIE Egg 6215	30,7±1,3	6,4±0,5**	5,7±0,4**	0,81±0,05***
<i>S. enteritidis</i> IIE Egg 6218	32,5±1,7	6,9±0,7**	4,6±0,5**	0,57±0,03***
<i>S. enteritidis</i> IIE Egg 6219	34,3±1,9	6,8±0,4**	5,9±0,8**	0,62±0,05***
<i>S. enteritidis</i> IIE Egg 6235	30,8±1,4	7,3±1,0**	6,1±0,4**	0,58±0,04***

Примечание: контроль — штаммы SE, предварительно инкубированные в ЗФР (забуференном физ. р-ре).¹ — лиофилизированная культуральная жидкость (ЛКЖ) консорциума штаммов (LF3872 + LS7247) (40 мкг/мл);² — пребиотик Актиген (40 мкг/мл);³ — смесь ЛКЖ (лиофилизированной культуральной жидкости) (20 мкг/мл) и пребиотика (20 мкг/мл). ** — снижение адгезии на Сасо-2 энтероцитах штаммов SE, предварительно инкубированных с ЛКЖ (40 мкг/мл), а также предварительно инкубированных с пребиотиком Актиген (40 мкг/мл), по отношению к контролю ($p < 0,01$); *** — снижение адгезии на Сасо-2 энтероцитах штаммов SE, предварительно инкубированных со смесью, содержащей ЛКЖ консорциума штаммов (20 мкг/мл) и пребиотик Актиген (20 мкг/мл), по отношению к контролю ($p < 0,001$).

Note: контроль — SE strains pre-incubated in physiologic buffered saline. ¹ — lyophilized culture fluid (LCF) of the strain consortium (LF3872 + LS7247) (40 µg/ml); ² — prebiotic Actigen (40 µg/ml); ³ — mixture of LCF (20 µg/ml) and prebiotic (20 µg/ml). ** — decreased adhesion to Сасо-2 enterocytes of SE strains pre-incubated with LCF (40 µg/ml), as well as pre-incubated with prebiotic Actigen (40 µg/ml), relative to the control ($p < 0.01$); *** — decreased adhesion to Сасо-2 enterocytes of SE strains pre-incubated with a mixture containing the LCL of the consortium of strains (20 µg/ml) and the prebiotic Actigen (20 µg/ml), relative to the control ($p < 0.001$).

с 5,4 до 7,2±0,2 log КОЕ/мл. Через 6 ч совместного культивирования с SE количество живых клеток консорциума лактобацилл увеличилось до 7,9±0,2 log КОЕ/мл. Число живых SE, при совместном культивировании с консорциумом лактобацилл в течение 6 ч, резко сократилось (<10 КОЕ/мл), в то время как в монокультуре число живых SE клеток выросло до 6,8±0,4 log КОЕ/мл. Подобное ингибирование роста SE клеток наблюдалось при совместном культивировании со штаммом лактобацилл LF3872 через 8 ч и при совместном культивировании патогена со штаммом лактобацилл LS7247 через 10 ч. Таким образом, консорциумом штаммов лактобацилл (LF3872 + LS7247) обладает высокой бактерицидной активностью к МЛЮ SE.

Синергизм антиадгезивных свойств пребиотика Актиген и КЖ консорциума (LF3872 + LS7247)

Лيوфилизированная культуральная жидкость (ЛКЖ) консорциума штаммов лак-

тобацилл (LF3872 + LS7247) и пребиотик Актиген проявляли синергизм в ингибировании адгезии МЛЮ SE к Сасо-2 энтероцитам (табл.). Таким образом, создаваемый препарат относится к синергическим синбиотикам.

Выводы

Консорциум пробиотических штаммов лактобацилл (LF3872 + LS7247) обладает высокой антагонистической активностью к МЛЮ SE. Смесь КЖ консорциума штаммов лактобацилл и пребиотика Актиген проявляет синергизм антиадгезивных свойств в отношении МЛЮ SE. Исследования *in vitro* показали, что на основе консорциума штаммов (LF3872 + LS7247) и пребиотика Актиген целесообразно создание инновационного синергического синбиотика для человека и кормовой добавки для сельскохозяйственных животных с целью профилактики кишечных заболеваний, вызываемых МЛЮ SE.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ceysens P.-J., Mattheus W., Vanhoof R., Bertrand S. Trends in serotype distribution and antimicrobial susceptibility in *Salmonella enterica* isolates from humans in Belgium, 2009 to 2013. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59(1):544–552. DOI: 10.1128/AAC.04203-14
2. Coman M.M., Verdenelli M.C., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Boyko N., Cresci A. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and SYN BIO® against pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 2014;117(2):518–527. DOI: 10.1111/jam.12544
3. Gal-Mor O., Boyle E.C., Grassl G.A. Same species, different diseases: How and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front. Microbiol.* 2014;5:391. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00391
4. Hackam D.J., Sodhi C.P., Good M. New insights into necrotizing enterocolitis: From laboratory observation to personalized prevention and treatment. *J. Pediatr. Surg.* 2019;54(3):398–404. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2018.06.012
5. Hammad A.M., Shimamoto T. Towards a compatible probiotic-antibiotic combination therapy: Assessment of antimicrobial resistance in the Japanese probiotics. *J. Appl. Microbiol.* 2010;109(4):1349–1360. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04762.x
6. Rabsch W., Hargis B.M., Tsois R.M., Kingsley R.A., Hinz K.H., Tschäpe H., Bäuml A.J. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in poultry. *Emerg. Infect. Dis.* 2000;6:443–448. DOI: 10.3201/eid0605.000501
7. Torgerson P.R., Devleeschauwer B., Praet N., Speybroeck N., Willingham A.L., Kasuga F., Rokni M.B., Zhou X.N., Fèvre E.M., Sripa B., Gargouri N., Fürst T., Budke C.M., Carabin H., Kirk M.D., Angulo F.J., Havelaar A., de Silva N. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 11 foodborne parasitic diseases, 2010: A data synthesis. *PLoS Med.* 2015;12(12):e1001920. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001920
8. Verbrugge E., Dhaenens M., Leyman B., Boyen F., Shearer N., Van Parys A., Haesendonck R., Bert W., Favoreel H., Deforce D., Thompson A., Haesebrouck F., Pasmans F. Host stress drives *Salmonella* recrudescence. *Sci. Rep.* 2016;6:20849. DOI: 10.1038/srep20849

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Маноян Ашот Месропович*, ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»;
e-mail: a.manoyan@vgnki.ru

Мачулин Андрей Валериевич, к.б.н., Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;
e-mail: and.machul@gmail.com

Папазян Тигран Тагворович, к.в.н., ООО «Оллтек»;
e-mail: tpapazyan@alltech.com

Иванова Ольга Евгеньевна, к.б.н., ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»;
e-mail: o.ivanova@vgnki.ru

Ashot M. Manoyan*, All-Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality;
e-mail: a.manoyan@vgnki.ru

Andrey V. Machulin, Cand. Sci. (Biol.), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: and.machul@gmail.com

Tigran T. Papazyan, Cand. Sci. (Vet.), Alltech;
e-mail: tpapazyan@alltech.com

Olga E. Ivanova, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality;
e-mail: o.ivanova@vgnki.ru

Панин Александр Николаевич, акад. РАН, д.в.н., проф., ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»;
e-mail: a.panin@vgnki.ru

Alexander N. Panin, Acad. of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Vet.), Prof., All-Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality;
e-mail: a.panin@vgnki.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author