



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107404** (13) **C2**  
(51) МПК  
**G01N 33/48** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2013 05108**  
(22) Дата подання заявки: **19.04.2013**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.12.2014**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **11.11.2013, Бюл.№ 21**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.12.2014, Бюл.№ 24**  
(72) Винахідник(и):  
**Лісяна Тамара Олександрівна (UA),  
Пономарьова Інна Георгіївна (UA),  
Матяшова Ольга Іванівна (UA),  
Доброчинська Лариса Іванівна (UA)**  
(73) Власник(и):  
**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ  
ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА ТА ГІНЕКОЛОГІЇ  
НАМН УКРАЇНИ",**  
вул. Платона Майбороди, 8, м. Київ, 04050  
(UA)

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
UA 69929 U; 25.05.2012  
Lactobacillus Species Identification, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production, and Antibiotic Resistance and Correlation with Human Clinical Status /Annie Felten, Claude Barreau, Alain Philippon // J Clin Microbiol. - Mar 1999. - 37(3)/ - P. 729–733  
Genetic transformation of novel isolates of chicken Lactobacillus bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines / Rodrigo M Mota, Joao Luiz S Moreira, Marcelo R Souza, M Fatima Horta, Santuza MR Teixeira, Elisabeth Neumann, Jacques R Nicoli, Alvaro C Nunes // BMC Biotechnol. - 2006, 6: 2. - p. 11  
Identification of and Hydrogen Peroxide Production by Fecal and Vaginal Lactobacilli Isolated from Japanese Women and Newborn Infants /Yu-Li Song, Naoki Kato, Yoshiko Matsumiya, Cheng-Xu Liu, Haru Kato, Kunitomo Watanabe // J Clin Microbiol. - Sep 1999. - 37(9). - P. 3062–3064  
The in vitro activity of vaginal Lactobacillus with probiotic properties against Candida / Strus S., Kucharska A., Kukla G., Brzychczy-Wtoch S., Maresz K., Heczko PB // Infect Dis Obstet Gynecol. - 2005 Jun/ - 13(2). - P. 69-75  
Relationship between lactobacilli and opportunistic bacterial pathogens associated with vaginitis / Mohammad Sabri A. Razzak, Alaa H. Al-Charrakh, et al // North American Journal of Medical Sciences 2011. - №4. vol. 3. - 185-192  
ГОСТ 24067-80 от 4.04.1980 г. № 1536.  
Молоко. Метод определения перекиси водовода

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ЛАКТОВАЦИЛЛУС ДО ПРОДУКЦІЇ ПЕРЕКИСУ ВОДНЮ З ВИКОРИСТАННЯМ ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ

### (57) Реферат:

Винахід стосується клінічної мікробіології. Спосіб визначення здатності *Lactobacillus* до продукції перекису водню з використанням еритроцитів крові.

UA 107404 C2



Винахід належить до області медицини, зокрема до клінічної мікробіології, і може бути використаний для визначення фізіологічної активності лактобактерій за їх здатністю продукувати перекис водню.

Продукція перекису водню є одним з важливих факторів антагонізму по відношенню до транзитних мікроорганізмів, за допомогою якого лактобацили здатні регулювати баланс між індигенною та умовно-патогенною мікрофлорою в піхві жінки. Але не всі лактобацили продукують перекис водню. Крім того, наявність статевих інфекцій може призводити до зниження кількості лактобацил, які продукують перекис водню та підвищення колонізації піхви лактобацилами, які не продукують перекис водню. Відсутність перекис-продукуючих видів лактобацил є первинним чинником, який сприяє розростанню умовно-патогенних мікроорганізмів, особливо анаеробів у генітальних органах жінки.

В літературних джерелах описані декілька способів визначення перекису водню. Один з них це перманганатометричний спосіб. Визначення проводять титруванням підкисленого розчину перекису водню розчином перманганату калію до моменту, коли розчин стає блідо-рожевим. (Торосян В.Ф. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа. Практическое руководство. - 2010.)

Недоліками способу є те, що він потребує тривалої підготовки та є титриметричним.

Йодометричний метод визначення перекису водню оснований на взаємодії його з йодистим калієм в кислому середовищі, виділенням йоду, який дає з крохмалем синє забарвлення. (ГОСТ 24067-80\* от 4.04.1980 г. № 1536. Молоко. Метод определения перекиси водорода).

Даний спосіб є біохімічним та дозволяє визначати перекис водню молочнокислих бактерій титриметричним методом.

Найбільш близьким до об'єкта, що заявляється, є спосіб визначення здатності лактобацил продукувати перекис водню методом розкладання перекису водню ферментом пероксидазою з окисленням тетраметилбензидину, який міститься в поживному середовищі, що передбачає посів лактобацил на поживне середовище MRS, яке містить 5 мг тетраметилбензидина (ТМБ) і 0,20 мг пероксидази хрому. Після Інкубації при температурі 37 °C в анаеробних умовах протягом 48-72 годин оцінюють результати: колонії лактобацил, які виробляють перекис водню забарвлюються в блакитний колір, а колонії лактобацил, що не виробляють перекис водню - безбарвні. (Черкасов С.В. Автореферат д. мед. н., Оренбург - 2011.; Глушанова Н.А. Автореферат д. мед. н., Москва - 2006; Strus M., Kucharska A., Kukla G., Brzychczy-Wtoch M., Maresz K., Heczko PB. The in vitro activity of vaginal Lactobacillus with probiotic properties against Candida Infect Dis Obstet Gynecol. 2005 Jun; 13(2):69-75.; Mohammad Sabri A. Razzak, Alaa H. Al-Charrakh, et al. Relationship between lactobacilli and opportunistic bacterial pathogens associated with vaginitis. North American Journal of Medical Sciences 2011, No. 4. vol. 3.: 185-192).

Недоліками способу є те, що для отримання результатів потрібен тривалий час. Це обумовлено тим, що для росту лактобацил потрібно від 48 до 72 годин. Ще одним недоліком способу є те, що для дослідження потрібні складні реактиви та спеціальне обладнання для постановки дослідження.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу визначення здатності Lactobacillus до продукції перекису водню з використанням еритроцитів крові шляхом виявлення у жінок з дисбіозом піхви штамів Lactobacillus, здатних продукувати перекис водню, що дасть можливість застосовувати спосіб як експрес-метод та оперативно призначати лікування.

Поставлена задача способу визначення здатності Lactobacillus до продукції перекису водню з використанням еритроцитів крові вирішується шляхом виявлення лактобацил, здатних продукувати перекис водню, згідно винаходу, додатково в пробірці з суспензією лактобацил, виділених з піхви жінок, або інших біотопів, вносяться еритроцити крові барана в різних розведеннях та візуально оцінюється мінімальне розведення еритроцитів крові, які в суміші з лактобацилами утворюють пухирці газу. Результати оцінюють відповідно наступним критеріям:

- якщо в пробірці з лактобацилами та еритроцитами крові барана в розведенні  $10^6$  відбувається сильне газоутворення - даний штам лактобацил є активним продуцентом перекису водню.

- якщо в пробірці з лактобацилами та еритроцитами крові барана в розведенні  $10^4$  відбувається слабе газоутворення - даний штам лактобацил є слабким продуцентом перекису водню.

- якщо в пробірці з лактобацилами та еритроцитами крові барана в розведенні  $10^2$  газоутворення не відбувається - даний штам лактобацил не проявляє здатність до продукції перекису водню.

При контакті перекису водню, що продукують лактобацили з еритроцитами крові, за рахунок ферменту каталази, який містять еритроцити, перекис водню швидко розкладається з виділенням кисню.

Одержані дані можуть бути використані для визначення фізіологічної активності лактобацил за їх здатністю продукувати перекис водню, а також в якості критерію до призначення належної терапії, що забезпечує підвищення ефективності лікування дисбіотичних порушень статевих шляхів у жінок.

Спосіб визначення здатності лактобацил до продукції перекису водню з використанням еритроцитів крові здійснюється наступним чином: з чистої культури виділених з статевих шляхів жінки штамів *Lactobacillus* spp. готують на фізіологічному розчині суспензію бактерій концентрацією  $1,5 \times 10^8$  КУО/мл, що візуально відповідає стандарту мутності 0,5 за Мак Фарландом. По 0,5 мл суспензії лактобацил розливаемо у ряд пробірок.

Для дослідження змішують 0,9 мл крові барана з 0,1 мл 3,8 % розчином цитрату натрію (співвідношення 9:1) та центрифугують 10 хвилин на швидкості 3000 об./хв. Еритроцити барана тричі відмивають охолодженим фізіологічним розчином. Далі проводять підрахунок кількості еритроцитів в камері Гаряєва. З робочої суспензії еритроцитів з концентрацією  $4,2 \times 10^6$  кл./мл готують ряд серійних розведень:  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ . З кожного розведення еритроцитів беруть по 0,5 мл суспензії та додають до 0,5 мл суспензії *Lactobacillus*. З метою контролю паралельно ставлять дослід з *Lactobacillus*, які не продукують перекис водню. Результати оцінюють протягом 5 хвилин за наявністю пухирців газу (кисню), що виділяються при розкладанні перекису водню при взаємодії з еритроцитами та враховують найменше розведення еритроцитів, що при взаємодії з перекис-продукуючими лактобацилами виділяють кисень. Оцінка результатів: якщо в пробірці з лактобацилами та еритроцитами крові барана в розведенні  $10^6$  відбувається сильне газоутворення - даний штам лактобацил є активним продуцентом перекису водню, якщо в пробірці з лактобацилами та еритроцитами крові барана в розведенні  $10^4$  відбувається слабе газоутворення - даний штам лактобацил є слабким продуцентом перекису водню, якщо в пробірці з лактобацилами та еритроцитами крові барана в розведенні  $10^2$  газоутворення не відбувається - даний штам лактобацил не проявляє здатність до продукції перекису водню.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб визначення здатності *Lactobacillus* до продукції перекису водню з використанням еритроцитів крові, що вирішується шляхом виявлення лактобацил, здатних продукувати перекис водню, який **відрізняється** тим, що в пробірці з суспензією лактобацил, виділених з піхви жінок, або інших біотопів, вносять еритроцити крові барана в різних розведеннях та візуально оцінюють мінімальне розведення еритроцитів крові, які в суміші з лактобацилами утворюють пухирці газу, результати оцінюють відповідно наступним критеріям:

- якщо в пробірці з лактобацилами та еритроцитами крові барана в розведенні  $10^6$  відбувається сильне газоутворення - даний штам лактобацил є активним продуцентом перекису водню;
- якщо в пробірці з лактобацилами та еритроцитами крові барана в розведенні  $10^4$  відбувається слабе газоутворення - даний штам лактобацил є слабким продуцентом перекису водню;
- якщо в пробірці з лактобацилами та еритроцитами крові барана в розведенні  $10^2$  газоутворення не відбувається - даний штам лактобацил не проявляє здатність до продукції перекису водню.

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601