



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102334** (13) **U**
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 03979	(72) Винахідник(и): Макаренко Олександр Миколайович (UA), Шестунов Аскольд Едуардович (UA), Петров Пилип Ігорович (UA)
(22) Дата подання заявки: 27.04.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.10.2015	(73) Власник(и): Макаренко Олександр Миколайович, вул. Червоноармійська, 45, кв. 68, м. Київ, 03150 (UA), Шестунов Аскольд Едуардович, вул. Анрі Барбюса, 5-в, кв. 138, м. Київ, 03150 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.10.2015, Бюл.№ 20	

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ АУТОБІОТИКІВ

(57) Реферат:

Спосіб отримання аутобіотиків, який має відбір індивідуального матеріалу, готування проб, посів проб на поживне середовище, вирощування колоній бактерій, проведення каталазної реакції, відбір каталазнегативних бактерій та їх фарбування за Грамом, відбір грампозитивних бактерій та їх посів на поживне середовище, вирощування суспензії колоній, центрифугування суспензії, готування препарату, фасування, зберігання, використання, причому готують низку проб з індивідуального матеріалу зі ступенем розведення $1:10^{1+n}$, вирощують колонії бактерій (96 ± 2) годин за температури $(37\pm 2)^\circ\text{C}$, відбирають каталазнегативні бактерії, з них відбирають грампозитивні бактерії роду *Lactobacillus*, вирощують колонії бактерій (96 ± 2) годин за температури $(37\pm 2)^\circ\text{C}$, утворюється суспензія, із суспензії колоній готують препарат індивідуального призначення, використовують для організму-донора.

UA 102334 U

Корисна модель належить до галузі мікробіології, а саме до виробництва бактеріальних препаратів.

Дисбактеріоз (дисбіоз) кишечника - це патологічний стан організму, що має у своїй основі зміни конкурентних відносин мікроорганізмів, їх чисельності та складу, а також метаболічної активності, що стає причиною розладів травлення на тлі розвитку патогенної мікрофлори. Такий стан часто характерний у випадках прийому антибіотиків, інфекційних захворюваннях шлунково-кишкового тракту, а також при неправильному харчуванні. За даними вітчизняної та світової статистики, з даною проблемою постійно стикається 80-90 % людей різних вікових і соціальних груп щорічно.

Як правило, лікування дисбактеріозів у хворих полягає у призначенні пробіотиків, пребіотиків, в окремих випадках - антибіотиків, і дотриманні дієти.

Незважаючи на те, що пробіотикам традиційно приділяється найбільша увага при лікуванні дисбактеріозів, останнім часом з'явилися дані про можливість виникнення і розвитку патологічного процесу внаслідок вживання пробіотичних препаратів. Зафіксовано випадки, коли пробіотичні лактобацили викликали бактеремії у хворих з вираженими імунodefіцитними станами, що вимагало призначення антибіотикотерапії (Е.А. Корниенко. Современные принципы выбора пробиотиков //Детские инфекции. -2007, № 3 -С. 64-69). Крім того, із застосуванням пробіотиків пов'язана проблема, що стосується походження штамів, які використовуються у складі мікробних препаратів. Штами, що мають нехарактерне походження часто не можуть виконувати повноцінно свої лікувальні функції і не завжди здатні виживати в умовах кишечника.

Також, гостро стоїть проблема бінесумісності резидентних фармакопейних штамів пробіотиків (Н.А. Глушановая, А.И. Клиновaя. Стандарты и перспективы фармакотерапии кандидоза органов пищеварения // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга, 2006. -№ 1-2. С. 17-20). Ефективність лікувальної дії пребіотиків залежить від ступеня його специфічності відносно мікробіоти та індивідуальних особливостей конкретних біоценозів пацієнтів.

Відомо спосіб одержання пробіотика для тваринництва, переважно птахівництва (патент UA № 21951 С1, 30.04.1998 бюл. № 2).

Відомо спосіб лікування кишкового дисбактеріозу активованими формами пробіотиків (патент UA № 50267 А, 15.10.2002, бюл. № 10, 2002).

Недоліками наведених способів є складність виконання і неможливість використання препаратів для організмів людей з певним несприйняттям деяких штамів бактерій і речовин, застосованих у цих препаратах.

Задачею цієї корисної моделі є розробка нового способу отримання і використання аутобіотиків. Аутобіотик - пробіотик, отриманий від власного здорового організму та використаний для цього ж організму.

Поставлена задача вирішується тим, що з індивідуального матеріалу здорового організму-донора отримують його власні мікроорганізми - бактерії роду *Lactobacillus*, які культивують в необхідних умовах на поживному середовищі і на їх основі готують високоефективний препарат індивідуального призначення, який використовується для профілактики та лікування дисбактеріозу саме цього організму.

Спосіб отримання аутобіотиків, який має відбір індивідуального матеріалу від організму-донора, готування проб, посів проб на поживне середовище, вирощування колоній бактерій, проведення каталазної реакції, відбір каталазнегативних бактерій та їх фарбування за Грамом, відбір грампозитивних бактерій та їх посів на поживне середовище, вирощування суспензії колоній, центрифугування суспензії, готування препарату, фасування і зберігання, використання, у якому у відповідності до корисної моделі готують низку проб з індивідуального матеріалу зі ступенем розведення $1:10^{1+n}$, вирощують колонії бактерій (96 ± 2) годин за температури (37 ± 2) °С, відбирають каталазнегативні бактерії, з них відбирають грампозитивні бактерії роду *Lactobacillus*, вирощують колонії бактерій (96 ± 2) годин за температури (37 ± 2) °С, утворюється суспензія, із суспензії колоній готують препарат індивідуального призначення, використовують для організму-донора.

Виконують спосіб отримання аутобіотиків, тобто отримують препарат індивідуального призначення для організму-донора, наступним чином.

Відбирають індивідуальний матеріал - зразок фекалій здорового організму. Готують низку проб зі ступенем розведення $1:10^{1+n}$. До ($1 \pm 0,1$) г фекалій додають ($9 \pm 0,1$) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є початковим розведенням 1:10 - проба 1. Після осадження нерозчинних часток, від проби 1 відбирають ($1 \pm 0,1$) мл, додають ($9 \pm 0,1$) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:100 - проба 2. Від проби 2 відбирають ($1 \pm 0,1$) мл, додають ($9 \pm 0,1$) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:1000 - проба 3. Від проби 3 відбирають

(1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:10000 - проба 4. Від проби 4 відбирають (1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:100000 - проба 5. Від проби 5 відбирають (1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:1000000 - проба 6. Від проби 6 відбирають (1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:10000000 - проба 7. Від проби 7 відбирають (1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:100000000 - проба (1+n).

Готують проби у кількості (1+n), початкове розведенням 1:10 - проба 1 у подальшому не використовується.

Посів проб 2, 3, 4, 5, 6, 7, (1+n), здійснюють у чашки Петрі з відповідними номерами - 2, 3, 4, 5, 6, 7, (1+n), на поживне середовище.

Залишають на (96±2) годин за температури (37±2) °С, для вирощування колоній бактерій.

Надалі використовують чашки Петрі, у яких була кількість колоній від 20 до 100 колоній. З чашок Петрі 2, 3, 4, 5, 6, 7, (1+n), за умови наявності у кожній 20-100 колоній, стерильним інструментарієм відбирають колонії у окрему чашку Петрі.

Проводять каталазну реакцію відібраних колоній, що вирости на поживному середовищі. На відібрані колонії аутобіотиків, у окремій чашці Петрі, капають 3 % розчином перексиду водню.

У окрему чашку Петрі відбирають тільки каталазнегативні бактерії. Відбір виконують стерильним інструментарієм.

Каталазнегативні бактерії фарбують за Грамом. У окрему чашку Петрі відбирають тільки грампозитивні бактерії. Відбір виконують стерильним інструментарієм.

Проводять посів грампозитивних бактерій на поживне середовище. Залишають на (96±2) годин за температури (37±2) °С, для вирощування колоній бактерій. Після вирощування утворюється суспензія колоній бактерій роду *Lactobacillus*.

Центрифугують суспензію бактерій роду *Lactobacillus*, передають на фасування і зберігання. Використовують отриманий аутобіотик - культуру бактерій роду *Lactobacillus* для індивідуального застосування для організму-донора у різних формах - безпосереднє застосування біомаси, ліофілізована та інкапсульована форми, розведення у фізіологічній, заквашування молока.

Приклад 1.

Відбирають індивідуальний матеріал - зразок фекалій здорового організму. Готують низку проб зі ступенем розведення 1:10¹⁺ⁿ. До (1±0,1) г фекалій додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є початковим розведенням 1:10 - проба 1. Після осадження нерозчинних часток, від проби 1 відбирають (1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:100 - проба 2. Від проби 2 відбирають (1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:1000 - проба 3. Від проби 3 відбирають (1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:10000 - проба 4. Від проби 4 відбирають (1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:100000 - проба 5. Від проби 5 відбирають (1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:1000000 - проба 6. Від проби 6 відбирають (1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:10000000 - проба 7. Від проби 7 відбирають (1±0,1) мл, додають (9±0,1) мл 0,85 % розчину хлориду натрію, що є розведенням 1:100000000 - проба (1+n).

Готують проби у кількості (1+n), початкове розведенням 1:10 - проба 1 у подальшому не використовується.

Посів проб 2, 3, 4, 5, 6, 7, (1+n), здійснюють у чашки Петрі з відповідними номерами - 2, 3, 4, 5, 6, 7, (1+n), на поживне середовище МРС. Склад середовища МРС (г/л): пептон 10 г; м'ясна вода 50 мл; дріжджовий автолізат 100 мл; твін 80 - 1 мл; глюкоза - 20 г; K₂HPO₄-2 г; CH₃COCNa - 5 г; NH₄ лимоннокислий - 2 г; MgSO₄ - 0,2 г; MnSO₄ - 0,05 г; Агар - 17 г; pH 6,6-7,0 (Дисбактериоз кишечника (диагностика, коррекция): (инструкция по применению): утв. М-вом здравоохранения Республики Беларусь 04.07.02 № 12-4-1001 / авт.: В.С. Васильев, О.С. Волосач, В.С. Маланова, С.Б. Позняк, В.М. Цыркунов; Учреждение-разработчик Гродн. гос. мед. ун-т. - Гродно, 2002. - 28 с.).

Залишають на (96±2) годин за температури (37±2) °С, для вирощування колоній бактерій.

Надалі використовують чашки Петрі, у яких була кількість колоній від 20 до 100 колоній. З чашок Петрі 2, 3, 4, 5, 6, 7, (1+n), за умови наявності у кожній 20-100 колоній, стерильним інструментарієм відбирають колонії у окрему чашку Петрі.

Проводять каталазну реакцію відібраних колоній, що вирости на середовищі МРС. На відібрані колонії аутобіотиків, у окремій чашці Петрі, капають 3 % розчином перексиду водню.

У окрему чашку Петрі відбирають тільки каталазнегативні бактерії. Відбір виконують стерильним інструментарієм.

Каталазнегативні бактерії фарбують за Грамом. У окрему чашку Петрі відбирають тільки Грам-позитивні бактерії. Відбір виконують стерильним інструментарієм.

5 Проводять посів Грам-позитивних бактерій на середовище МРС. Залишають на (96 ± 2) годин за температури $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$, для вирощування колоній бактерій. Після вирощування утворюється суспензія колоній бактерій роду *Lactobacillus*.

10 Центрифугують суспензію бактерій роду *Lactobacillus*, ліофілізують, передають на фасування і зберігання. Використовують отриманий аутобіотик - ліофілізований порошок культури бактерій роду *Lactobacillus* для індивідуального застосування для організму-донора з метою профілактики дисбактеріозу.

Приклад 2.

15 Приклад 2 виконується аналогічно прикладу 1 за відмінності, суспензію бактерій роду *Lactobacillus*, розводять на молоці у співвідношенні 0,5 мл:1000 мл, за умови концентрації бактерій $(8-12) \times 10^3$, сквашують протягом (7 ± 2) годин за температури $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$, утворюється закваска, яку передають на фасування і вживання. Використовують отриманий аутобіотик - закваску культури бактерій роду *Lactobacillus* для індивідуального застосування для організму-донора з метою профілактики дисбактеріозу.

Висновки

20 Спосіб отримання аутобіотиків - це готування вискоєфективного препарату індивідуального призначення з суспензії бактерій роду *Lactobacillus*, отриманих з організму здорового донора, який використовується для профілактики та лікування дисбактеріозу саме цього організму.

25 Головною перевагою даного способу є отримання повністю біосумісного бактеріального препарату, що унеможливорює занесення сторонніх мікроорганізмів. Окремо слід виділити його дешевизну, простоту у готуванні препарату аутобіотика, універсальність та загальнодоступність.

Спосіб отримання аутобіотиків може бути застосований для будь-якого організму людини, тварини, птиці. Рекомендовано застосування аутобіотика в умовах обмежених просторів для тварин - ферма, зоопарк тощо.

30 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання аутобіотиків, який має відбір індивідуального матеріалу, готування проб, посів проб на поживне середовище, вирощування колоній бактерій, проведення каталазної реакції, відбір каталазнегативних бактерій та їх фарбування за Грамом, відбір грампозитивних бактерій та їх посів на поживне середовище, вирощування суспензії колоній, центрифугування суспензії, готування препарату, фасування, зберігання, використання, який **відрізняється** тим, що готують низку проб з індивідуального матеріалу зі ступенем розведення $1:10^{1+n}$, вирощують колонії бактерій (96 ± 2) годин за температури $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$, відбирають каталазнегативні бактерії, з них відбирають грампозитивні бактерії роду *Lactobacillus*, вирощують колонії бактерій (96 ± 2) годин за температури $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$, утворюється суспензія, із суспензії колоній готують препарат індивідуального призначення, використовують для організму-донора.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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

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