



УКРАЇНА

(19) UA (11) 40901 (13) A

(51) 7 A61K35/78, G01N33/541

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТИСУБТІЛА

(21) 2000105838

(22) 16.10.2000

(24) 15.08.2001

(46) 15.08.2001, Бюл. № 7, 2001 р.

(72) Коваль Галина Дмитрівна, Сидорчук Ігор  
Йосипович, Магальяс Віктор Миколайович,  
Кшемінська Марта Вікторівна, Міхеев Андрій  
Олександрович, Ляшук Руслана Петрівна(73) БУКОВИНСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКА-  
ДЕМІЯ(57) 1. Спосіб визначення антимікробної активності  
бактисубтіла за умов сумісного культивування  
мікроорганізмів в живильному середовищі, який  
відрізняється тим, що сумісно культивують па-тогенні та умовно патогенні ентеробактерії,  
стафілококи у м'ясопептонному бульйоні та з  
дріжджоподібними грибами роду *Candida* у сере-  
довищі Сабуро.2. Спосіб по п.1, який відрізняється тим, що па-  
тогенними та умовно патогенними ентеробакте-  
ріями є штами *Escherichia coli* K 12, *Escherichia coli*  
Hly+, *Escherichia coli* O55:K59, *Klebsiella freundii*.3. Спосіб по п.1, який відрізняється тим, що  
стафілококами є штам *Stafilococcus aureus*  
ATCE25923 та антибіотикорезистентний штам  
*Stafilococcus aureus*.4. Спосіб по п.1, який відрізняється тим, що дрі-  
жджоподібними грибами є штами *Candida albicans*  
7 та *Candida albicans*.

Винахід відноситься до галузі медицини, а са-  
ме до мікробіології, і може бути використаним в ек-  
спериментах та клініці для вивчення та лікування киш-  
кових дисбактеріозів, які виникають у результаті ін-  
фекційних та неінфекційних захворювань.

Однією із проблем сучасної клінічної гаст-  
роентерології, а також терапії інфекційних зах-  
ворювань є порушення кишкового біоценозу,  
частота якого досягає у дітей 70-90%, а у дорос-  
лих - від 42 до 88%. У більшості випадків по-  
рушення біоценозу кишечника є ускладнення ін-  
фекційних та неінфекційних захворювань. Дис-  
бактеріози у всіх випадках погіршують перебіг як  
інфекційного, так і соматичного захворювання,  
порушують стан здоров'я, знижують як неспе-  
цифічну, так і специфічну імунну протиінфекцій-  
ну резистентність організму людини.

Одним із загальноприйнятих методів по-  
передження та лікування порушень мікроекології  
кишечнику є використання пробіотиків - лікарських  
препаратів, що містять бактерії, які входять до скла-  
ду автохтонних облигатних мікроорганізмів. В ок-  
ремих випадках використовують транзиторні бак-  
терії (бактисубтіл та інші). Саме останні привер-  
тають до себе на сьогодні увагу лікарів, оскільки  
бактисубтіл містить *B.cereus*, що продукують ре-  
комбінантний інтерферон.

Задачею запропонованого винаходу є спосіб  
визначення антимікробної активності бактисубтілу

(бактерійний препарат фірми Hoest Marion Rassel  
(США).

Поставлена задача досягається тим, що ан-  
тимікробну активність *Bacillus cereus* IP5832 (мік-  
роорганізм, що складає активний лікувальний фак-  
тор бактисубтіла) стосовно до клінічних тест-шта-  
мів ентеробактерій, стафілококів та кандид, ви-  
ділених від хворих на неспецифічні захворювання  
легень (хронічні бронхіти, бронхіальна астма)  
м.Чернівці, вивчали методом сумісного культи-  
вування в м'ясопептонному бульйоні (МПБ) окре-  
мо з ентеробактеріями, стафілококами та в рідко-  
му середовищі Сабуро - з кандидами. В роботі ви-  
користовували одностодові культури мікроба-анта-  
гоніста, ентеробактерій та стафілококів. Бактеріо-  
логічним методом визначали кількість життєздат-  
них (колонійутворюючих) клітин мікроба-антагоні-  
ста та тест-штамів у живильному середовищі.

В пробірці (4,5 мл) засівали 1,2 мільярда  
мікробних клітин в 1 мл (1,2 млрд/мл -  $11,3 \pm 0,07$   
lg КУО/мл) *B.cereus* і таку ж кількість тест-штаму.  
Через 24 години (добу) сумісної інкубації із про-  
бірок відбирали по 0,1 мл інкубаційної суміші і го-  
тували 10-кратні розведення у стерильному фіз-  
розчині. Із всіх пробірок титраційного ряду висіва-  
ли по 1 мл на тверде живильне середовище (МПА  
і Сабуро) і інкубували впродовж доби, а на сере-  
довищі Сабуро - 2 доби. По закінченню цього періоду

інкубації підраховували колонії тест-штамів, що виросли на відповідному середовищі.

Вихідний популяційний рівень життєздатних (колоніютворючих) еталонних музейних (*S.aureus* ATCE 25923, *C.albicans* 7, *E.coli* K 12) та клінічних тест-штамів мікроорганізмів в дослідних пробірках не відрізнявся від популяційного рівня в контрольних пробірках, куди не вносився мікроб-антагоніст ( $p>0,05$ ) (таблиця 1).

Через 24 години сумісного інкубування мікроба-антагоніста і тест-штамів різних видів музейних та клінічних штамів мікроорганізмів визначено, що мікроб-антагоніст (*B.cereus*) призводить до зниження популяційного рівня як музейного штаму золотистого стафілокока. Найбільш виражена інгібуюча активність бактисубтіла через 24 години встановлена стосовно музейного штаму ешерихій, а також гемолітичних та ентеропатогенних клінічних варіантів кишкових паличок та умовно патогенних ентеробактерій (цитробактера і клебсієл), які найчастіше виявляються у хворих на кишковий дисбактеріоз. Бактисубтіл через 24 години практично не впливає на популяційний рівень дріжджеподібних грибів роду *Candida*.

Сумісне культивування мікроба-антагоніста з тест-штамами впродовж 2-х діб визначило посилення антагоністичної дії мікроба-антагоніста (бактисубтіла) на стафілококи та ентеробактерії. Більш інтенсивна інгібуюча дія бактисубтіла на популяційний рівень патогенних та умовно патогенних ентеробактерій встановлена через 48 годин. Сумісне культивування впродовж 2 діб бактерійного препарату і дріжджеподібних грибів стимулює розвиток останніх, і їх популяційний рівень при цьому зростає.

При сумісному культивуванні бактисубтіла з клінічними та музейними тест-штамами впродовж 3 діб продовжував зменшуватися популяційний рівень клінічних та музейних штамів стафілокока.

Популяційний рівень контрольних культур клінічного та музейного штамів ентеробактерій залишається на рівні 3-х добового періоду. Популяційний рівень цих же тест-ентеробактерій продовжує знижуватися. Популяційний рівень кандид, що культивуються впродовж 72 годин разом із бактисубтілом, ідентичний такому ж показнику контрольних дослідів.

Продовження сумісного культивування бактисубтіла з музейними та клінічними штамами стафілококів, ентеробактерій та кандид впродовж 96 годин (4 доби) показало, що *B.cereus* продовжує значно знижувати популяційний рівень музейних та клінічних антибіотикорезистентних штамів стафілококів, особливо патогенних та умовно патогенних ентеробактерій. В цей період спостерігається незначне зниження популяційного рівня кандид.

Через 7 днів бактисубтіл не впливає на популяційний рівень стафілококів, особливо на клінічні штами, але продовжується значне (майже в 2 рази) зниження популяційного рівня патогенних та умовно патогенних ентеробактерій (гемолітичних та ентеропатогенних ешерихій, цитробактера і клебсієл). При цьому значно підсилюється вплив бактисубтіла на популяційний рівень кандид ( $8,85\pm 0,08$  lg КУО/мл проти  $11,89\pm 0,06$  lg КУО/мл в контролі).

Тобто, бактисубтіл за сумісного культивування починає знижувати популяційний рівень умовно патогенних стафілококів вже через 24 години і такий вплив зберігається до 4-х діб. Після цього інгібуюча дія на популяційний рівень поступово знижується і через 7 діб її дія призупиняється, тобто бактисубтіл ефективний тільки впродовж перших 4-х діб.

Таким чином, застосування даної методики дозволяє встановити антимікробну активність бактисубтілу стосовно патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів та дріжджеподібних грибів роду *Candida*. Це вказує на відповідність даного винаходу критерію "позитивний ефект".

#### Вплив бактисубтіла на популяційний рівень патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів

Мікроорганізми	К-ть штамів	Популяційний рівень (в lg КУО/мл)		
		Контроль	Дослід	p
Вихідний популяційний рівень				
S.aurerus ATCE25923	1	11,17±0,02	11,10±0,03	>0,05
S.aurerus (антибіотико-резистентні)	7	11,17±0,02	11,08±0,04	>0,05
E.coli K12	1	10,13±0,05	10,08±0,04	>0,05
E.coli Hly <sup>+</sup>	3	10,16±0,08	10,03±0,02	>0,05
E.coli O55:K59	3	10,12±0,05	10,05±0,02	>0,05
C.freundii	2	10,09±0,03	10,03±0,02	>0,05
K.pneumoniae	3	9,98±0,03	9,85±0,05	>0,05
C.albicans 7	1	6,93±0,07	7,14±0,05	>0,05
C.albicans	5	6,95±0,06	7,14±0,07	>0,05
Через 24 години інкубації				
S.aurerus ATCE25923	1	13,15±0,09	12,14±0,04	<0,05
S.aurerus (антибіотико-резистентні)	7	13,18±0,09	12,17±0,02	<0,05
E.coli K12	1	14,11±0,04	11,12±0,03	<0,001
E.coli Hly <sup>+</sup>	3	14,09±0,04	11,10±0,04	<0,001
E.coli O55:K59	3	14,13±0,04	11,13±0,01	<0,001
C.freundii	2	14,11±0,04	11,10±0,05	<0,001

Продовження таблиці

Мікроорганізми	К-ть штамів	Популяційний рівень (в Іg КУО/мл)		
		Контроль	Дослід	p
K.pneumoniae	3	14,09±0,04	11,17±0,03	<0,001
C.albicans 7	1	8,10±0,06	8,03±0,14	>0,05
C.albicans	5	8,11±0,06	8,07±0,07	>0,05
Через 48 годин інкубації				
S.aureus ATCE25923	1	14,14±0,04	10,95±0,07	<0,001
S.aureus (антибіотико-резистентні)	7	14,15±0,04	10,82±0,05	<0,001
E.coli K12	1	15,23±0,03	10,21±0,03	<0,001
E.coli Hly <sup>+</sup>	3	15,27±0,03	10,18±0,02	<0,001
E.coli O55:K59	3	15,21±0,03	10,17±0,04	<0,001
C.freundii	2	15,26±0,03	10,18±0,03	<0,001
K.pneumoniae	3	15,29±0,03	10,22±0,02	<0,001
C.albicans 7	1	8,95±0,06	10,18±0,06	<0,01
C.albicans	5	8,97±0,06	10,12±0,07	<0,01
Через 72 години				
S.aureus ATCE25923	1	13,20±0,07	10,19±0,08	<0,001
S.aureus (антибіотико-резистентні)	7	13,21±0,07	10,13±0,08	<0,001
E.coli K12	1	15,23±0,03	10,14±0,03	<0,001
E.coli Hly <sup>+</sup>	3	15,19±0,04	10,13±0,03	<0,001
E.coli O55:K59	3	15,21±0,03	10,14±0,04	<0,001
C.freundii	2	15,18±0,05	10,13±0,02	<0,001
K.pneumoniae	3	15,16±0,03	10,24±0,02	<0,001
C.albicans 7	1	10,24±0,02	10,12±0,07	>0,05
C.albicans	5	10,17±0,03	10,07±0,02	>0,05
Через 96 годин (4 доби)				
S.aureus ATCE25923	1	12,13±0,03	9,14±0,05	<0,001
S.aureus (антибіотико-резистентні)	7	12,15±0,07	9,08±0,06	<0,001
E.coli K12	1	14,18±0,02	9,10±0,02	<0,001
E.coli Hly <sup>+</sup>	3	14,15±0,03	9,07±0,03	<0,001
E.coli O55:K59	3	14,21±0,04	9,13±0,05	<0,001
C.freundii	2	14,17±0,03	9,19±0,05	<0,001
K.pneumoniae	3	14,14±0,04	9,28±0,03	<0,001
C.albicans 7	1	11,02±0,08	10,18±0,05	<0,05
C.albicans	5	11,03±0,09	10,11±0,02	<0,05
Через 7 діб				
S.aureus ATCE25923	1	11,89±0,07	11,17±0,04	<0,05
S.aureus (антибіотико-резистентні)	7	11,87±0,06	11,81±0,07	>0,05
E.coli K12	1	16,08±0,04	7,89±0,05	<0,001
E.coli Hly <sup>+</sup>	3	16,09±0,05	8,03±0,03	<0,001
E.coli O55:K59	3	16,08±0,05	8,10±0,04	<0,001
C.freundii	2	16,03±0,04	8,13±0,02	<0,001
K.pneumoniae	3	16,05±0,05	8,20±0,04	<0,001
C.albicans 7	1	11,89±0,06	8,89±0,06	<0,001
C.albicans	5	11,97±0,08	8,85±0,08	<0,001

---

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»  
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101  
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03

---

