



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **69929** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
C12Q 1/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 08235	(72) Винахідник(и): Лісяна Тамара Олександрівна (UA), Пономарьова Інна Георгіївна (UA), Кулікова Тетяна Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 01.07.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.05.2012	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА ТА ГІНЕКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. П. Майбороди, 8, м. Київ, 04050 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.05.2012, Бюл.№ 10	

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ АНТИМІКОТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ LACTOBACILLUS У ЖІНОК З КАНДИДОЗНИМ ВУЛЬВОВАГІНІТОМ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки антимікотичної активності Lactobacillus у жінок з кандидозним вульвовагінітом вирішується шляхом дослідження кількості колоній тест-культури грибів роду Candida, що виростили на щільному поживному середовищі після сумісного культивування з Lactobacillus, які виділили від хворої жінки, і оцінюється в порівнянні з контролем.

U
69929
UA

Корисна модель належить до області медицини, зокрема до гінекології та клінічної мікробіології, і може бути використана для визначення порушень мікробіоценозу статевих органів у жінок.

В останні роки спостерігається значне зростання частоти кандидозу статевих органів у жінок репродуктивного віку та у вагітних жінок. Гриби роду *Candida* продукують фактори агресії (ендотоксини, глюкопротеїди, протеолітичні та ліполітичні ферменти), що викликають значні патологічні зміни в тканинах. Підвищена секреція грибами аспартатпротеази та гідролази сприяє їх масивній колонізації на слизових оболонках.

Гриби роду *Candida* конкурують з піхвовими лактобацилами за ділянки зв'язування на клітинах епітелію. При цьому порушується метаболізм глікогену на шляху до його перетворення у молочну кислоту. Поступово вміст лактобацилл знижується, що призводить до змін внутрішньопіхвової рН з кислої на лужну та до формування порушень мікроекології.

При призначенні антибіотиків широкого спектра дії потрібно враховувати, що антибіотики пригнічують не тільки патогенні бактерії, а і лактобацили, які контамінують піхву. Крім того, гриби роду *Candida* здатні використовувати антибіотики як джерело харчування. При цьому створюються сприятливі умови для активного розмноження грибів роду *Candida* в статевих органах жінок.

Відомо, що лактобацили є фізіологічними антагоністами дріжджоподібних грибів, пригнічують прикріплення грибів роду *Candida* до клітин епітелію слизових оболонок та їх розмноження.

Лактобацили в нормі пригнічують екзогенну флору, підтримують низькі значення рН, а також синтезують антимікробні субстанції (бактеріоцини). Всі види лактобацилл продукують органічні кислоти, також у вагінальній екосистемі здорових жінок від 79 до 96 % лактобацилл продукують H_2O_2 , тоді як у жінок з кандидозним вульвовагінітом лише 6 % штамів є H_2O_2 - продукуєчими.

Серед опублікованих матеріалів є багато даних про вивчення антагоністичної дії *Lactobacillus* на різні умовно-патогенні мікроорганізми (Исаков В.А., Ждан-Пушкина С.Х., Тец В.В. Количественная оценка антагонистической активности лактобацилл // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. - №5. - 2005; Ермоленко Е.И., Рыбальченко О.В. Антимикробное действие лактобацилл // Медицина XXI век. 2007 - №5 [6]. Але в патентних та науково-технічних джерелах не виявлено матеріалів, які належать до способу оцінки антимікотичної активності *Lactobacillus* у жінок з кандидозним вульвовагінітом.

В основу корисної моделі оцінки антимікотичної активності *Lactobacillus* у жінок з кандидозним вульвовагінітом, що заявляється, поставлена задача своєчасного виявлення у жінок з кандидозним вульвовагінітом штамів *Lactobacillus* зі зниженою антимікотичною активністю. Одержані дані можуть бути використані як критерій до призначення комерційних препаратів, що містять *Lactobacillus*.

Поставлена задача способу оцінки антимікотичної активності *Lactobacillus* у жінок з кандидозним вульвовагінітом вирішується шляхом дослідження кількості колоній тест-культури грибів роду *Candida*, що вирости на щільному поживному середовищі після сумісного культивування з *Lactobacillus*, що виділили від хворої жінки, і оцінюється в порівнянні з контролем; критеріями високої антимікотичної активності *Lactobacillus* виділених від жінок з кандидозним вульвовагінітом є зменшення показників росту, а саме концентрації тест-культури грибів роду *Candida* з 10^6 КУО/мл до 10^2 КУО/мл, критеріями помірної антимікотичної активності *Lactobacillus* є зменшення концентрації тест-культури грибів роду *Candida* з 10^6 КУО/мл до 10^4 КУО/мл, відсутність антимікотичної активності *Lactobacillus* реєструють при концентрації грибів роду *Candida* 10^6 КУО/мл, що відповідає показникам контролю.

При кандидозному вагініті в слизовій оболонці порушується обмін білків, вуглеводів, а також вміст кінцевих продуктів обміну. Відомо про участь сироваткових білків та протеїназ в стимуляції розмноження грибів роду *Candida*. В результаті активації протеолізу відбувається утворення великої кількості продуктів деградації білків, а саме середньомолекулярних пептидів з молекулярною масою 300-5000 Д, які, як відомо, є одним з поживних субстратів для розмноження грибів роду *Candida*.

Спосіб реалізується наступним чином. Спосіб оцінки антимікотичної активності *Lactobacillus* у жінок з кандидозним вульвовагінітом полягає, насамперед, в тому, що виділення з піхви жінки, взяті тампоном, заливають 1 мл фізіологічного розчину та висівають 0,1 мл на щільне поживне середовище MRS 4 для культивування молочнокислих бактерій та грибів р. *Candida*.

Для подальшого дослідження з чистої культури *Lactobacillus*, виділених через 48 годин від жінок з кандидозним вульвовагінітом готують суспензію мікроорганізмів за стандартом мутності 5 ОД (ГІСКу ім. Л.О. Тарасевича). З робочої зависі готують серію десятикратних розведень на фізіологічному розчині. При дослідженні використовують розведення 10^6 для створення на

поверхні агаризованого середовища ізольованих колоній. З даного розведення лактобацил 1 мл зависі висівають на щільне поживне середовище MRS 4. Паралельно з тест-культури грибів роду *Candida* також готують суспензію мікроорганізмів за стандартом мутності 5 ОД (ГІСКу ім. Л.О. Тарасевича). При дослідженні також використовують розведення 10^6 для створення на поверхні агаризованого середовища ізольованих колоній. З даного розведення тест-культури грибів 1 мл зависі висівають на щільне поживне середовище MRS 4, а 1 мл вносять в пробірку з 1 мл суспензії *Lactobacillus*, виділених від жінок з кандидозним вульвовагінітом з подальшим сумісним культивуванням протягом 4 годин при температурі 37°C і висівом 1 мл суміші на щільне поживне середовище MRS 4. Контролем служать тест-культура грибів роду *Candida*, які вирости на середовищі MRS 4 без сумісного культивування з *Lactobacillus*, а також показники росту чистої культури лактобацил. Чашки інкубують в термостаті при $t\ 37^\circ\text{C}$ протягом 48 годин. Облік результатів проводять за кількістю колоній, що вирости на щільному середовищі після сумісної інкубації, а також в контролях. Кількість мікроорганізмів виражають в колонієутворюючих одиницях в 1 мл (КУО/мл) біологічного матеріалу. В результаті підрахунку колоній критеріями високої антимікотичної активності *Lactobacillus*, виділених від жінок з кандидозним вульвовагінітом, є зменшення показників росту, а саме концентрації тест-культури грибів роду *Candida* з 10^6 КУО/мл до 10^2 КУО/мл, критеріями помірної антимікотичної активності *Lactobacillus* є зменшення концентрації тест-культури грибів роду *Candida* з 10^6 КУО/мл до 10^4 КУО/мл, відсутність антимікотичної активності *Lactobacillus* реєструють при концентрації грибів роду *Candida* 10^6 КУО/мл, що відповідає показникам контролю.

Приклад 1

Хвора Д., 26 років, знаходилась на лікуванні у відділенні планування сім'ї ДУ "ІПАГ НАМН України".

Клінічний діагноз: кандидозний вульвовагініт.

При мікробіологічному дослідженні виділень із статевих органів рівень висіву лактобацил відповідав нормі - *Lactobacillus* 10^4 КУО/мл. Вивчення кількісного рівня умовно-патогенної флори свідчило про активну контамінацію піхви грибами роду *Candida* - 10^6 КУО/г.

Для оцінки антимікотичної активності *Lactobacillus* у жінок з кандидозним вульвовагінітом, виділення з піхви жінки, взяті тампоном, заливають 1 мл фізіологічного розчину та висівають 0,1 мл на щільне поживне середовище MRS 4 для культивування молочнокислих бактерій та грибів р. *Candida*. Для подальшого дослідження з чистої культури *Lactobacillus*, виділених через 48 годин від жінок з кандидозним вульвовагінітом, готують суспензію мікроорганізмів за стандартом мутності 5 ОД (ГІСКу ім. Л.О. Тарасевича). З робочої зависі готують серію десятикратних розведень на фізіологічному розчині. При дослідженні використовують розведення 10^6 для створення на поверхні агаризованого середовища ізольованих колоній. З даного розведення лактобацил 1 мл зависі висівають на щільне поживне середовище MRS 4. Паралельно з тест-культури грибів роду *Candida* також готують суспензію мікроорганізмів за стандартом мутності 5 ОД (ГІСКу ім. Л.О. Тарасевича). При дослідженні також використовують розведення 10^6 для створення на поверхні агаризованого середовища ізольованих колоній. З даного розведення тест-культури грибів 1 мл зависі висівають на щільне поживне середовище MRS 4, а 1 мл вносять в пробірку з 1 мл суспензії *Lactobacillus*, виділених від жінок з кандидозним вульвовагінітом, з подальшим сумісним культивуванням протягом 4 годин при температурі 37°C і висівом 1 мл суміші на щільне поживне середовище MRS 4. Контролем служать тест-культура грибів роду *Candida*, які вирости на середовищі MRS 4 без сумісного культивування з *Lactobacillus*, а також показники росту чистої культури лактобацил. Чашки інкубують в термостаті при $t\ 37^\circ\text{C}$ протягом 48 годин. Облік результатів проводять за кількістю колоній, що вирости на щільному середовищі після сумісної інкубації, а також в контролях. Кількість мікроорганізмів виражають в колонієутворюючих одиницях в 1 мл (КУО/мл) біологічного матеріалу. В результаті підрахунку колоній критеріями високої антимікотичної активності *Lactobacillus* виділених від жінок з кандидозним вульвовагінітом є зменшення показників росту, а саме концентрації тест-культури грибів роду *Candida* з 10^6 КУО/мл до 10^2 КУО/мл, критеріями помірної антимікотичної активності *Lactobacillus* є зменшення концентрації тест-культури грибів роду *Candida* з 10^6 КУО/мл до 10^4 КУО/мл, відсутність антимікотичної активності *Lactobacillus* реєструють при концентрації грибів роду *Candida* 10^6 КУО/мл, що відповідає показникам контролю.

Концентрація грибів роду *Candida* після сумісного культивування з *Lactobacillus* складала 10^2 КУО/мл (контроль 10^6 КУО/мл), що свідчить про високу антимікотичну активність *Lactobacillus*, виділених від хворої Д. з кандидозним вульвовагінітом.

Приклад 2

Хвора І., 32 роки, знаходилась на лікуванні у відділенні планування сім'ї ДУ "ІПАГ НАМН України". Клінічний діагноз: кандидозний вульвовагініт.

При мікробіологічному дослідженні виділень виявлено суттєве зниження концентрації *Lactobacillus* - до 10^2 КУО/мл. Концентрація *S.saprophyticus* становила 10^2 КУО/мл. На цьому фоні відмічено збільшення кількості грибів роду *Candida* - 10^6 КУО/мл.

Для оцінки антимікотичної активності *Lactobacillus* у жінок з кандидозним вульвовагінітом, виділення з піхви жінки, взяті тампоном, заливають 1 мл фізіологічного розчину та висівають 0,1 мл на щільне поживне середовище MRS 4 для культивування молочнокислих бактерій та грибів р. *Candida*.

Для подальшого дослідження з чистої культури *Lactobacillus*, виділених через 48 годин від жінок з кандидозним вульвовагінітом готують суспензію мікроорганізмів за стандартом мутності 5 ОД (ГІСКу ім. Л.О. Тарасевича). З робочої зависі готують серію десятикратних розведень на фізіологічному розчині. При дослідженні використовують розведення 10^6 для створення на поверхні агаризованого середовища ізолюваних колоній. З даного розведення лактобацил 1 мл зависі висівають на щільне поживне середовище MRS 4. Паралельно з тест-культури грибів роду *Candida* також готують суспензію мікроорганізмів за стандартом мутності 5 ОД (ГІСКу ім. Л.О. Тарасевича). При дослідженні також використовують розведення 10^6 для створення на поверхні агаризованого середовища ізолюваних колоній. З даного розведення тест-культури грибів 1 мл зависі висівають на щільне поживне середовище MRS 4, а 1 мл вносять в пробірку з 1 мл суспензії *Lactobacillus*, виділених від жінок з кандидозним вульвовагінітом, з подальшим сумісним культивуванням протягом 4 годин при температурі 37°C і висівом 1 мл суміші на щільне поживне середовище MRS 4. Контролем служать тест-культура грибів роду *Candida*, які вирости на середовищі MRS 4 без сумісного культивування з *Lactobacillus*, а також показники росту чистої культури лактобацил. Чашки інкубують в термостаті при $t\ 37^\circ\text{C}$ протягом 48 годин. Облік результатів проводять за кількістю колоній, що вирости на щільному середовищі після сумісної інкубації, а також в контролях. Кількість мікроорганізмів виражають в колонієутворюючих одиницях в 1 мл (КУО/мл) біологічного матеріалу. В результаті підрахунку колоній критеріями високої антимікотичної активності *Lactobacillus*, виділених від жінок з кандидозним вульвовагінітом, є зменшення показників росту, а саме концентрації тест-культури грибів роду *Candida* з 10^6 КУО/мл до 10^2 КУО/мл, критеріями помірної антимікотичної активності *Lactobacillus* є зменшення концентрації тест-культури грибів роду *Candida* з 10^6 КУО/мл до 10^4 КУО/мл, відсутність антимікотичної активності *Lactobacillus* реєструють при концентрації грибів роду *Candida* 10^6 КУО/мл, що відповідає показникам контролю.

Концентрація грибів роду *Candida* після сумісного культивування з *Lactobacillus* складала 10^6 КУО/мл (контроль 10^6 КУО/мл), що свідчить про відсутність антимікотичної активності *Lactobacillus*, виділених від хворої І. з кандидозним вульвовагінітом.

Таким чином, спосіб оцінки антимікотичної активності *Lactobacillus* у жінок з кандидозним вульвовагінітом сприяє вияву штамів *Lactobacillus* зі зниженою антимікотичною активністю та може бути використаний як критерій до призначення комерційних препаратів, що містять *Lactobacillus*.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки антимікотичної активності *Lactobacillus* у жінок з кандидозним вульвовагінітом, що вирішується шляхом дослідження кількості колоній тест-культури грибів роду *Candida*, які вирости на щільному поживному середовищі після сумісного культивування з *Lactobacillus*, що виділили від хворої жінки, і оцінюється в порівнянні з контролем; критеріями високої антимікотичної активності *Lactobacillus*, виділених від жінок з кандидозним вульвовагінітом, є зменшення показників росту, а саме концентрації тест-культури грибів роду *Candida* з 10^6 КУО/мл до 10^2 КУО/мл, критеріями помірної антимікотичної активності *Lactobacillus* є зменшення концентрації тест-культури грибів роду *Candida* з 10^6 КУО/мл до 10^4 КУО/мл, відсутність антимікотичної активності *Lactobacillus* реєструють при концентрації грибів роду *Candida* 10^6 КУО/мл, що відповідає показникам контролю.

Комп'ютерна верстка А. Рябко

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