Descriere:

Invenţia se referă la domeniul microbiologiei tehnice şi medicale, în special, la producerea preparatelor curativ-profilactice destinate pentru profilaxia şi tratamentul disbacteriozelor de diversă provenienţă.

Pentru normalizarea microbiocenozei oricărui biotop al organismului omenesc, se utilizează pe larg preparatele eubiotice care conţin bacili acidolactici L. acidophilus [1,2]. Includerea bacililor L. acidophilus în componenţa preparatelor microbiene şi curativ-profilactice este fundamentată de facultatea lor de a inhiba dezvoltarea microflorei patogene şi condiţionat-patogene. Spectrul larg de acţiune antimicrobiană şi valorile pH joase ale soluţiilor culturale ale bacililor acidolactici au permis presupunerea precum că la baza antagonismului lor se află acumularea în mediul de cultivare a acizilor organici (lactic, formic, acetic ş.a.) [3].

În legătură cu aceasta, s-a efectuat selectarea tulpinilor L. acidophilus conform indicilor: viteza acidogenezei şi limita acidogenezei.

În calitate de iniţială, s-a utilizat tulpina L. acidophilus 43°C obţinută sub forma bacconcentratului "Lactocidină" cu viteza acidogenezei de 3,6-8,3°T/oră, limita acidogenezei de 340°T.

În calitate de analogul cel mai apropiat s-a ales tulpina L. acidophilus $K_3Ř_{24}$ utilizată în practica clinică la tratarea disbacteriozelor, posedând o înaltă activitate antagonistă şi antibioticorezistenţă [4]. Neajunsul de bază al acestei tulpini constă în viteza joasă a acidogenezei 6-7° T/oră.

Tulpina bacteriilor Lactobacillus acidophilus obţinută ca rezultat al unei selectări bine orientate, este depozitată în Colecţia Naţională de microorganisme a Republicii Moldova, cu numărul CNM-LB-01.

Caractere cultural-morfologice. Celule în formă de bacili, lungi şi subţiri, de mărimea 3-14 x 1,0-1,5 μm, nesporogene, grampozitive, localizate sub formă de celule separate sau dispuse în lanţ câte 2-3 segmente. În mediul MRS dens formează colonii circulare, albe, omogene, uşor se separă cu anse de pe suprafaţa gelozei, profil bombat, margini corecte, netransparente, fără luciu, pigment nu formează.

Semne fiziologice. Temperatura optimă de dezvoltare este de 36-38°C. Aciditatea după 16 ore de cultivare în lapte degresat - 240-260° T. Aciditatea limită - 400°T. Viteza acidogenezei de 12±2°T/oră (tab. 1,2). Asimilează zaharoza, glucoza, lactoza, fructoza, maltoza, trehaloza. Nu asimilează manitul, ramnoza, rafinoza, sorbitolul, xiloza, gluconatul. Nu reproduce nitraţii. Nu lichefiază gelatina.

Posedă activitate antagonistă faţă de microorganismele patogene şi condiţionat-patogene (tab. 3).

Tulpina brevetată este rezistentă faţă de antibiotice din diverse grupuri de compuşi chimici (tab. 4).

Se reproduce cu uşurinţă în lapte degresat cu mai puţin de 8% de substanţe uscate; la adăugarea a nu mai puţin de 2% de covăseală laptele fermentează formând, peste 3,0-3,5 ore, un cheag neted şi dens. Reduce pH-ul laptelui până la 3,6-3,8, în timp de 10-14 ore.

Exemplul 1. Se pregăteşte lapte degresat steril cu nu mai puţin de 8% de substanţe uscate, se adaugă 2-4% de covăseală a tulpinii L. acidophilus R I care constituie o cultură de 18-24 de ore a bacteriilor acidofile în lapte degresat steril.

Laptele şi covăseala termostatează timp de 18-24 de ore la temperatura de 36-38°C. Se obţine un preparat de lapte acidulat cu miros şi gust specific de lapte acidulat având un cheag neted şi dens şi o consistenţă puţin vâscoasă. Aciditatea produsului este de 240-260°T, aciditatea activă pH = 3,4-3,6.

Tabelul 1

Modificarea acidităţii laptelui degresat la adăugarea covăselii de 2%, temperatura cultivării 37,0 ± 0,5°C

Timpul cultivării, ora	Valoarea acidităţii laptelui la dezvoltare, °T		
	L. acidophilus R I	L. acidophilus 43 C	L. acidophilus K_3 $Ř_{24}$
0	60	60	60
2	84	76	74
4	108	92	88
6	127	110	102
8	153	126	116
10	177	142	130
12	200	158	144
16	240	180	172
24	268	220	210

Tabelul 2

Însuşirile tehnologice generalizate ale culturilor L. acidophilus

Indicii	tulpina R I	tulpina 43 C	tulpina K_3 $Ř_{24}$
1. Viteza acidogenezei, °T/oră	10-13	8-9	6-7
2. Activitatea (fermentarea laptelui degresat), ore	3,0-3,5	4,0-5,0	5,0-6,0
3. Aciditatea peste 6 ore, °T	120-130	100-110	95-105
4. pH-ul laptelui peste 16 ore de cultivare	3,6±0,2	3,9±0,2	4,0±0,2
5. Cantitatea bacililor vitali, în I g lg.	10,5±0,5	9,2±0,3	8,9±0,4
6. Limita acidogenezei, °T	400	340	400
7. Timpul necesar pentru atingerea limitei acidogenezei, ore	48-56	56-72	72-80

Tabelul 3

Activitatea antagonistă a culturilor L. acidophilus faţă de microflora patogenă şi condiţionat-patogenă

Testul-microorganism	Mărimea zonei cu creştere întârziată a test-microorganismului, mm		
	tulpina R I	tulpina 43 C	tulpina K_3 Ř $_{24}$
1. K. pneumoniae 134	16,4±0,7	16,0±0,4	15,0±0,3
2. E. coli 2405	23,1±1,2	22,5±0,6	18,2±0,9
3. S. aureus 1733	19,0±0,8	18,3±0,6	17,0±0,3
4. S. epidermides 1501	23,8±2,1	23,6±1,8	15,4±0,5
5. P. aeruginosa 183	21,7±1,9	22,0±2,6	18,2±0,8
6. Proteus vulgaris 185	18,8±0,6	18,5±0,4	11,7±0,9
7. Streptococcus faecalis 842	16,5±0,3	16,7±0,7	16,6±0,5
8. Candida albicans 78	18,3±1,1	17,6±0,7	9,6±1,3

Tabelul 4
Sensibilitatea tulpinilor L. acidophilus la acţiunea antibioticelor (după procedeul discurilor de hârtie)

Antibiotice	tulpina R I	tulpina 43 C	tulpina K_3 Ř $_{24}$
1. Benzilpenicilină	+	+	-
2. Ampicilină	++	++	++
3. Oxacilină	-	-	++
4. Cefazolină	++	++	++
5. Cefamandol	++	++	++
6. Tetraciclină	+	+	-
7. Oxitetraciclină	+	+	+
8. Eritromicină	-	-	+
9. Oleandomicină	-	-	+
10. Streptomicină	-	-	-
11. Gentamicină	-	-	-
12. Canamicină	-	-	-
13. Lincomicină	-	-	+

NOTĂ: (-) - tulpină stabilă; (+) - de sensibilitate moderată; (++) - sensibilă la acţiunea antibioticelor.

Preparatul se păstrează la temperatura de +4 - +6°C timp de 5-10 zile. Un gram de preparat conţine nu mai puţin de 100 mln de celule vii ale bacililor acidolactici.

Preparatul se poate aplica *per vaginum* cu ajutorul tampoanelor sau instilării, *per rectum* sub forma irigării cu sondă a intestinului gros.

Exemplul 2. Studierea modului de influenţă a lactobacililor asupra normalizării microflorei vaginale la femei.

Au fost examinate 57 de femei din grupa de risc în al III-lea trimestru de graviditate, grupa de bază cu disbacterioză vaginală. Grupa de control consta din 30 de gravide sănătoase. S-a analizat procesul de colonizare a vaginului cu lactobacili ca microfloră normală, cu microorganisme condiţionat-patogene şi anaerobi. S-a stabilit că până la aplicarea preparatului L. acidophilus, nivelul bacililor acidolactici se modifică, în grupa de bază, de la 10^4 până la 10^5, cantitatea stafilococului epidermal, colibacilului şi blastomicetelor variază de la 10^2 la 10^4, iar a bacililor anaerobi - de la 10^5 la 10^6 kl/g de material cercetat. Indicii depistaţi ai colonizării vaginului demonstrează prezenţa disbacteriozei vaginale la femeile din grupa de risc. Semnele ei se înlătură pe calea asanării vaginului cu preparatul L. acidophilus R I (tab. 5). Zece sau douăsprezece proceduri normalizează nivelul bacililor acidolactici 10^7-10^8 kl/g şi reduc autentic numărul microorganismelor uropatogene de 100 de ori, iar cantitatea microorganismelor anaerobe - de 10 ori, ceea ce corespunde nivelului colonizării microbiene a vaginului gravidelor sănătoase din trimestrul III de graviditate.

Exemplul 3. Studierea modului de influenţă a lactobacililor asupra normalizării microflorei intestinale la copii.

S-au examinat 60 de nou-născuţi de la 6 până la 10 zile de viaţă.

Preparatul L. acidophilus R I se aplica *per rectum* sub forma irigării cu sondă a intestinului gros. Până la folosirea preparatului, la 63,3% din copii s-a atestat un înalt grad de disbacterioză.

Tabelul 5
Influența preparatului L. acidophilus asupra gradului de colonizare microbiană a vaginului

Microorganismele	Grupa de bază		Grupa de control	Autenticitatea (p)
	până la tratament	după tratament		
1. Lactobacili	5,74±0,26	7,41±0,13	7,55±0,17	<0,001
2. Colibacilul	1,23±0,48	0,20±0,09	0,88±0,21	<0,05
3. Stafilococul epidermal	1,46±0,57	1,29±0,59	0,33±0,11	0,05
4. Blastomicetele	2,61±0,44	1,24±0,46	0	<0,05
5. Bacilii anaerobi	5,91±0,47	4,35±0,33	3,11±0,26	<0,05

Tabelul 6
Distribuirea nou-născuților de 6-10 zile de viață în conformitate cu stadiile disbacteriozei intestinale,
în procesul tratării lor prin antibioticoterapie tradițională și cu aplicarea bacililor acidofili, mărimea absolută /%

Caracterul modificării biocenozei intestinului	tratamentul tradițional		aplicarea eubioticului	
	până	după	până	după
Normocenoză	0/0	2/6,7	0/0	7/23,3
I stadiu de disbacterioză	9/30	8/26,7	4/13,4	13/43,3
al II-lea stadiu -"-	11/36,7	5/16,6	7/23,3	6/20,0
al III-lea stadiu -"-	10/33,3	15/50,0	19/63,3	4/13,3

După cursul de tratament doar la 33,3% din copii s-au înregistrat dereglări esențiale ale microbiocenozei intestinului, iar în 66,7% de cazuri microflora, în fond, revenea la normă sau se afla în procesul de normalizare (disbacterioză superficială).

În 10% de cazuri cu stare disbiotică netratată s-a înregistrat așa-numita disbacterioză Proteus, care în combinație cu stafilococul auriu și blastomicetele este destul de stabilă.

În grupa de comparație (antibioticoterapia) s-a observat următorul tablou: inițial s-a înregistrat o disbacterioză de grad înalt la 33,3% de copii, iar după aplicarea antibioticelor s-a înrăutățit starea la o jumătate din grupa nou-născuților. În această grupă semnele cantitative ale lacto- și bifidoflorei normale au tendința de reducere, pe când în grupa de bază acești indici cresc, în procesul de tratare, de 10 și mai multe ori.