



MD 1853 G2 2002.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **1853** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) **Int. Cl.**⁷: A 61 K 35/74;
A 61 P 1/00

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) **Nr. depozit:** 99-0198
(22) **Data depozit:** 1999.07.14

(45) **Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:**
2002.02.28, BOPI nr. 2/2002

(71) **Solicitant:** INSTITUTUL de FIZIOLOGIE și SANOCREATOLOGIE al ACADEMIEI de ȘTIINȚE a
REPUBLICII MOLDOVA, MD

(72) **Inventator:** TIMOȘCO Maria, MD

(73) **Titular:** INSTITUTUL de FIZIOLOGIE și SANOCREATOLOGIE al ACADEMIEI de ȘTIINȚE a
REPUBLICII MOLDOVA, MD

(54) **Preparat microbial eubiotic pentru profilaxia și tratamentul disbacteriozei
intestinale**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la preparatele microbiene
eubiotice bicomponente și poate fi folosită în
medicină la profilaxia și tratamentul disbacteriozei
intestinale.

Esența invenției constă în aceea că se propune
o compoziție nouă a preparatului microbial
eubiotic bicomponent care conține tulpini de
Bifidobacterium longum B1-154, *Lactobacillus*
acidophilus La-190 și un mediu protector, care
prezintă amestec de amidon, lactoză și celuloză în
următorul raport al componentelor la 1 g de
preparat:

tulpină de *Bifidobacterium longum B1-154*
(5...8)·10⁹ celule vii

2
tulpină de *Lactobacillus acidophilus La-190*
(4...6)·10⁶ celule vii
5 amestec de amidon, lactoză și celuloză în părți
egale 0,3 g.

10 Rezultatul invenției constă în extinderea sorti-
mentului de remedii pentru profilaxia și
tratamentul disbacteriozei intestinale la copii și
maturi.

Revendicări: 1

MD 1853 G2 2002.02.28

3

Descriere:

Invenția se referă la preparatele microbiene eubiotice bicomponente și poate fi folosită în medicină la profilaxia și tratamentul disbacteriozei intestinale.

5 Investigațiile științifice au relevat o răspândire largă a disbacteriozei intestinale la om, atât în ontogeneza timpurie, precum și la maturi [1, 2].

Din considerentele că disbacterioza intestinală în majoritatea cazurilor se caracterizează prin reducerea considerabilă a cantității de bacterii specifice bacteriocenozei, ce aparțin genurilor *Bifidobacterium* și *Lactobacillus*, este argumentată necesitatea elaborării preparatelor microbiene care ar conține așa bacterii.

10 Este cunoscut preparatul biosporin, pentru profilaxia și tratamentul maladiilor gastrointestinale la om, care include două tulpini de bacterii facultative bacteriocenozei tubului digestiv, care sunt din genul *Bacillus* (*Bisubtilis* 3 și *B. licheniformis* 31) [3].

Neajunsul principal al acestui preparat constă în aceea că are o influență indirectă asupra tubului digestiv.

15 Este cunoscut de asemenea și preparatul biflong, pregătit numai pe baza bacteriilor din genul *Bifidobacterium* [4].

Neajunsul acestui preparat constă în includerea speciilor de bacterii strict anaerobe și în aceea că pentru obținere necesită condiții și utilaj specifice. În afară de aceasta, eficiența preparatului este redusă din cauza limitării la bifidobacterii, iar în cazul disbacteriozei și maladiilor gastrointestinale la copii și maturi se înregistrează și o reducere considerabilă a numărului de lactobacterii, care uneori sunt eliminate completamente din tubul digestiv.

20 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este de a mari arealul folosirii și de a spori eficiența preparatelor microbiene sanogenice în profilaxia și tratamentul disbacteriozei intestinale de diversă etiologie, precum și la constituirea orientată și menținerea la nivel optim a stării sănătății tubului digestiv.

25 Esența invenției constă în aceea că se propune o compoziție nouă a preparatului microbial eubiotic bicomponent care conține două tulpini de *Bifidobacterium longum* Bl-154 și *Lactobacillus acidophilus* La-190 și un mediu protector, care prezintă un amestec de amidon, lactoză și celuloză în următorul raport al componentelor la 1 g de preparat:

tulpină de <i>Bifidobacterium longum</i> Bl-154	(5...8)·10 ⁹ celule vii
tulpină de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-190	(4...6)·10 ⁶ celule vii
amestec de amidon, lactoză și celuloză în părți egale	0,3 g.

30 Rezultatul invenției constă în extinderea sortimentului de remedii pentru profilaxia și tratamentul disbacteriozei intestinale la copii și maturi.

Tulpinile de bacterii incluse în componența preparatului microbial eubiotic bicomponent solicitat care a fost numit BIAȚ se păstrează în Colecția Națională de microorganisme din Republica Moldova (filiala nr. 3). Numerele de înregistrare al tulpinii de *Bifidobacterium longum* - Bl-154 și al tulpinii de *Lactobacillus acidophilus* - La-190

35 Tulpina de *Bifidobacterium longum* Bl-154 sunt bacili grampozitivi, nu formează spori, sunt imobili; în procesul fermentării nu formează CO₂, catalază, acid oleic și acid propionic; fermentează pozitiv: arabinoza, glucoza, galactoza, xiloza, lactoza, melecitoza, melibioza, maltoza, rafinoza, riboza, sorbita; fermentează variabil: amidonul și tregaloza; nu fermentează: adonita, amigdalina, glicerina, dulcita, inozita, manita, ramnoza, salicina, eritrita, esculina, celobioza; sunt strict anaerobe; temperatura optimă de înșămânțare și incubare este de 37±1°C timp de 24 ore; este avirulentă, structura antigenă nu este studiată de nimeni, deoarece participă numai la protecția locală a tubului digestiv. La aceasta din urmă contribuie formarea acizilor volatili, astfel conducând la reducerea pH-ului și la influența antagonistă față de provocatorii maladiilor intestinale (tab. 1); proprietățile serologice nu stau la baza tipizării deoarece au un aspect local, este anoncogenă; are o sensibilitate sporită față de antibiotice (tab. 2).

40 Tulpina de *Lactobacillus acidophilus* La-190 sunt bacili grampozitivi, care nu formează spori și sunt imobili, în procesul fermentării nu formează CO₂, produsul principal ce se formează în procesul fermentării este acidul lactic; fermentează pozitiv: amigdalina, celobioza, fructoza, galactoza, glucoza, lactoza, maltoza, manoza, salicina, zaharoza, tregaloza, esculina; fermentează variabil: melibioza și rafinoza; nu fermentează: arabinoza, manita, melecitoza, ramnoza, riboza, sorbita, xiloza, D-eretroza, D-fucoza, adonita, sorboza, glicerina, inozita, inulina, amidonul, dextrina, dulcita, tagatoza, xilita și L-arabita. Înșămânțarea și incubarea are loc la temperatura de 37±1°C timp de 24 ore; este avirulentă;

MD 1853 G2 2002.02.28

4

antigenul specific se găsește în peretele celular și prezintă acidul glicerinteinoic, participă activ la formarea imunității locale a tubului digestiv, fiind reprezentantul principal al bacteriocenozei obligative a tubului digestiv, aparține grupei serologice E; este anoncogenă; particularitățile antagoniste față de provocatorii maladiilor gastrointestinale sunt relatate în tab. 1; este sensibilă la antibiotice (tab. 2).

5 Ambele tulpini de bacterii incluse în componența preparatului eubiotic bicomponent BIAȚ au reflectat o activitate antagonistă sporită față de provocatorii maladiilor intestinale din genurile *Escherichia* și *Salmonella* (tab. 3).

În tab. 4 este prezentat numărul celulelor microbiene în preparatul microbial eubiotic bicomponent BIAȚ supus păstrării (comparativ cu acesta în soluția cea mai apropiată).

10 Rezultatele investigațiilor în scopuri profilactice sunt relatate în tab. 5, care prezintă că la animalele de model (purcei sugaci) cărora li s-a administrat preparatul microbial propus constituirea și menținerea bacteriocenozei intestinale obligative pe parcursul a 30 de zile a fost la nivelul optim (lotul I). În același timp, la animalele martor (fără administrare de preparat conform invenției) numărul de bifidobacterii și lactobacterii n-a atins nivelul optim nici la a 30-ea zi după naștere (lotul II). La aceste
15 animale pe parcursul întregii perioade de studiu s-a înregistrat starea de disbacterioză intestinală: sporirea numărului de bacterii coliforme din genul *Escherichia*, *Streptococcus*; însămânțarea bacteriilor facultative din genul *Staphylococcus*, *Proteus* și *Clostridium*. E de menționat că în lotul I stafilococi, protei și clostrizi nu s-au depistat.

Așadar preparatul microbial eubiotic bicomponent BIAȚ poate fi folosit în scopuri profilactice.

20 Folosirea acestui preparat pentru tratamentul disbacteriozei intestinale este argumentată de rezultatele expuse în tab. 6. În această serie de experiențe preparatul microbial eubiotic bicomponent BIAȚ a fost administrat animalelor de model cu disbacterioză intestinală. Aplicarea preparatului microbial propus a dus la reglarea bacteriocenozei intestinale și la reducerea numărului de celule microbiene facultative, fapt confirmat cu rezultatele obținute la 10 zile în lotul II, în lotul martor I menținându-se permanent un nivel crescut de bacterii din genul *Staphylococcus*, *Proteus* și *Clostridium*, care au contribuit la apariția simptomelor de disfuncții intestinale în formă de diaree. La animalele
25 experimentale din lotul II așa simptome n-au fost înregistrate.

Datele expuse în tab. 7 relatează că preparatul microbial eubiotic BIAȚ contribuie la efectuarea tratamentului disbacteriozei intestinale la copii. Aceasta este argumentat de sporirea numărului de celule microbiene obligative și reducerea numărului de bacterii facultative în conținutul intestinal.

30 *Exemplul 1.* Inoculatul tulpinii de *Bifidobacterium longum* B1-154 și *Lactobacillus acidophilus* La-190 se însămânțează în comun pe lapte degresat steril în volum de 1,7-2,0% la 1,0-1,3%, respectiv; se incubează la temperatura de $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ timp de 7-8 ore până la aciditatea finală de 105°T . Masa bacteriană obținută se stabilizează prin liofilizare cu folosirea substanțelor auxiliare protectoare: lactoză, amidon și celuloză, câte 10% fiecare.

Produsul finit conține celule microbiene vii (la 1 g) de bifidobacterii în cantitate de $(5\dots 8)\cdot 10^9$; lactobacterii în număr de $(4\dots 6)\cdot 10^6$ și substanțe auxiliare 0,3 g (câte 0,1 g fiecare).

40 *Exemplul 2.* Însămânțarea inoculului tulpinii de *Bifidobacterium longum* B1-154 și *Lactobacillus acidophilus* La-190 se efectuează în comun pe mediu de cultură nou "Mediu de cultură pentru acumularea biomasei de bifidobacterii" cu componența: lactoză 10,0; peptonă 10,0; clorură de sodiu 5,0; agar-agar 0,7 g/L; bragă de drojdii 500,0 ml și apă potabilă restul până la 1 L. Însămânțarea a avut loc în raportul de 1,7...2,0 la 1,0...1,3%, respectiv, al bifido- și lactobacteriilor; se incubează la $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 5-6 ore până la aciditatea finală de $(105\pm 5)^{\circ}\text{T}$; biomasa obținută se stabilizează prin liofilizare cu adăugarea substanțelor auxiliare: lactoză, amidon, celuloză, câte 10% fiecare.

45 Analiza datelor expuse în tab. 5, 6 și 7 argumentează raționalitatea folosirii preparatului microbial eubiotic bicomponent BIAȚ în scopul profilaxiei și tratamentului disbacteriozei intestinale, iar a celor din tab. 1 și 3 - recomandarea acestui preparat în scopul sănării tubului digestiv contra provocatorilor maladiilor intestinale.

MD 1853 G2 2002.02.28

5

Tabelul 1

5 Particularitățile antagoniste ale tulpinilor de bifido- și lactobacterii incluse în componența preparatului microbial eubiotic bicomponent BIAȚ

Bacteriile test	Zona inhibării creșterii sub influența tulpinilor de bifido- și lactobacterii, mm	
	<i>Bifidobacterium longum</i> B1-154	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-190
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	24-27	27-30
<i>Proteus vulgaris</i> 64	19-21	24-26
<i>Candida albicans</i> 01	18-20	22-24
<i>Pseudomonas aeroginoza</i> 2134	20-22	24-26
<i>Escherichia coli</i> 11	26-28	29-32
<i>Salmonella dublin</i>	19-21	28-31

10 Din considerentele că la copii se înregistrează cel mai frecvent așa maladii intestinale ca colibacterioza și salmoneloza s-a efectuat determinarea activității antagoniste numai față de provocatorii acestor maladii. Datele sunt expuse în tab. 3.

Tabelul 2

Sensibilitatea tulpinilor de bifido- și lactobacterii incluse în componența preparatului microbial eubiotic bicomponent BIAȚ față de antibiotice

Antibioticele	Zona de inhibiție a creșterii tulpinilor de bifido- și lactobacterii, mm	
	<i>Bifidobacterium lungum</i> B1-154	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-190
Clortetracilină	23,00±0,10	26,00±0,15
Polimixină M	0	9,00±0,05
Neomicină	18,00±0,10	22,00±0,12
Penicilină	7,00±0,05	12,00±0,10
Streptomycină	21,00±0,14	18,00±0,11
Monomicină	19,00±0,10	20,00±0,12
Canamicină	24,00±0,15	25,00±0,13
Hentamicină	29,00±0,12	32,00±0,14

15

Se observă o sensibilitate sporită față de majoritatea substanțelor antibiotice cu excepția polimixinei M și penicilinei.

Tabelul 3

20 Activitatea antagonistă a tulpinilor incluse în componența preparatului microbial eubiotic bicomponent BIAȚ cu evidențierea indicelui de combatere a provocatorilor de colibacterioză și salmoneloză

Specia de bacterii; numărul tulpinii; denumirea prepara- ratului	Numărul de celule microbiene la 1 ml de suspensie, logaritmi zecimali					
	Escherichii			Salmonele		
	Inițial	După însămânțare	Indicele combaterii	Inițial	După însămânțare	Indicele combaterii
<i>Bifidobacterium longum</i> B1-154	5,30±0,08	0,60±0,16	88,68	3,66±0,17	0,60±0,12	83,61
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-90	5,75±0,20	0,50±0,09	91,30	3,93±0,05	0,30±0,00	92,41
BIAȚ	5,45±0,10	0,55±0,08	89,91	3,82±0,11	0,40±0,00	89,59

MD 1853 G2 2002.02.28

6

Se observă o activitate antagonistă sporită față de provocatorii colibacteriozei și salmonelozei conform indicelui de combatere.

Tabelul 4

5

Numărul celulelor tulpinilor de bifido- și lactobacterii în preparatul microbial eubiotic bicomponent BIAȚ supus păstrării (comparativ cu soluția cea mai apropiată)

Denumirea preparatului	Microorganismele	Numărul de celule microbiene la 1 g de preparat, logaritmi zecimali conform termenului păstrării, luni			
		0	1	3	6
BIAȚ	B	9,78±0,12	9,19±0,14	8,63±0,11	8,04±0,15
	L	7,54±0,08	7,22±0,10	6,49±0,12	6,07±0,13
Cea mai apropiată soluție	B	9,53±0,13	7,32±0,18	5,43±0,17	3,42±0,11

10 B - bifidobacterii; L - lactobacterii

Se observă că peste 6 luni de păstrare a preparatului BIAȚ părțile componente, adică bifidobacteriile și lactobacteriile se înșămânțează într-o cantitate mai mare decât în soluția cea mai apropiată.

15 Notă pentru tab. 5-7: Microorganismele din genurile: 1-*Bifidobacterium*; 2-*Lactobacillus*; 3-*Escherichia*; 4-*Streptococcus*; 5-*Bacteroides*; 6-*Staphylococcus*; 7-*Proteus*; 8-*Clostridium*.

Tabelul 5

Numărul celulelor microbiene în bacteriocenoza intestinală la animalele de model supuse administrării preparatului microbial eubiotic bicomponent BIAȚ

20

Lotul de animale	Microorganism	Numărul de celule microbiene vii la 1 g de conținut intestinal în logaritmi zecimali (lg) în dinamica de vârstă, zile		
		3	10	30
I	1	9,40±0,08	10,19±0,12	9,70±0,10
	2	8,19±0,07	9,39±0,13	8,60±0,14
	3	3,07±0,11	5,25±0,10	6,19±0,11
	4	2,90±0,13	4,39±0,12	5,85±0,13
	5	4,80±0,10	7,80±0,11	7,90±0,12
	6	0	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
II	1	2,17±0,12	3,70±0,14	5,45±0,10
	2	1,39±0,08	2,10±0,12	4,19±0,13
	3	8,07±0,10	9,17±0,14	9,75±0,12
	4	7,07±0,12	7,87±0,13	8,57±0,13
	5	1,85±0,13	3,39±0,10	5,75±0,15
	6	5,75±0,14	7,25±0,11	8,19±0,10
	7	4,07±0,11	6,39±0,15	6,80±0,13
	8	8,19±0,13	8,67±0,13	8,90±0,10

Lotul I - experimental - li s-a administrat preparatul microbial eubiotic bicomponent BIAȚ imediat după naștere și timp de 15 zile peste o zi;

II - martor - netratați cu preparatul BIAȚ.

25

Se observă că la animalele din lotul martor pe parcursul întregului proces de investigații se menține starea de disbacterioză intestinală (numărul microorganismelor din genurile de *Escherichia* și *Streptococcus* mărit și înșămânțarea proteilor, clostrizilor și stafilococilor), iar la animalele experimentale (lotul I) cele expuse nu s-au depistat.

MD 1853 G2 2002.02.28

7

Tabelul 6

Cantitatea celulelor microbiene în bacteriocenoza intestinală la animalele de model supuse administrării preparatului eubiotic bicomponent BIAȚ

Lotul de animale	Microorga-nisme	Numărul celulelor microbiene la 1 g de conținut intestinal în logaritmi zecimali (1g) conform varstei, zile	
		10	15
I	1	2,07±0,12	4,19±0,10
	2	1,50±0,14	3,00±0,18
	3	9,60±0,15	9,85±0,16
	4	8,25±0,12	9,19±0,14
	5	4,39±0,10	5,45±0,12
	6	6,25±0,16	7,19±0,13
	7	7,07±0,12	8,65±0,16
	8	6,70±0,17	7,87±0,15
II	1	9,70±0,11	10,07±0,14
	2	8,85±0,13	9,45±0,12
	3	5,19±0,15	6,70±0,11
	4	5,75±0,14	6,39±0,14
	5	8,70±0,12	9,07±0,13
	6	0	0
	7	0	0
	8	0	0

5

Lotul: I - martor - cu disbacterioză intestinală

II - experimental - li s-a administrat preparatul eubiotic bicomponent BIAȚ pe fondul disbacteriozei.

10

Se observă că aplicarea preparatului microbial propus duce la reglarea bacteriocenozei intestinale și la reducerea numărului de celule microbiene facultative (3, 4, 6, 7, 8).

Tabelul 7

Nivelul numeric al microorganismelor în conținutul intestinal al copiilor, care au primit preparatul eubiotic bicomponent BIAȚ

15

Lotul	Microorga-nisme	Numărul de celule microbiene la 1 g de conținut intestinal, logaritmi zecimali	
		Inițial	Final
I	1	4,75±0,13	5,27±0,12
	2	3,43±0,20	3,74±0,17
	3	8,39±0,18	8,45±0,15
	4	7,65±0,14	7,57±0,19
	5	3,72±0,18	3,85±0,13
	6	2,19±0,13	3,04±0,16
	7	5,07±0,14	4,95±0,14
	8	2,36±0,15	2,55±0,18
II	1	4,80±0,17	9,36±0,12
	2	3,50±0,19	8,07±0,10
	3	8,45±0,20	5,57±0,13
	4	7,86±0,18	4,95±0,10
	5	3,36±0,19	6,07±0,12
	6	2,45±0,15	0
	7	5,45±0,16	0
	8	2,57±0,22	0

Lotul: I - martor, copii cu disbacterioză;

II - experimental, copii cu disbacterioză cărora li s-a administrat preparatul microbial BIAȚ.

Se observă o influență benefică asupra bacteriocenozei intestinale la copii cu disbacterioză.

5

(57) Revendicare:

Preparat microbial eubiotic pentru profilaxia și tratamentul disbacteriozei intestinale care conține bacterii din genul *Bifidobacterium* și un mediu protector, **caracterizat prin aceea că** include suplimentar tulpină de *Lactobacillus acidophilus La-190*, în calitate de bacterii din genul

10

Bifidobacterium conține tulpina de *Bifidobacterium longum B1-154*, iar în calitate de mediu protector se utilizează amestec de amidon, lactoză și celuloză în următorul raport al componentelor la 1 g de preparat:

15

tulpină de <i>Bifidobacterium longum B1-154</i>	(5...8)·10 ⁹ celule vii
tulpină de <i>Lactobacillus acidophilus La-190</i>	(4...6)·10 ⁶ celule vii
amestec de amidon, lactoză și celuloză în părți egale	0,3 g.

(56) Referințe bibliografice:

1. Петровская В.Г., Марко О.П. Микрофлора человека в норме и патологии. Москва, 1976, с. 232
2. Тимошко М.А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных. Кишинев, 1990, с. 187
3. SU 1722502 A1
4. SU 1692021 A1

Șef Secție:

CRASNOVA Nadejda

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

ANDRIUȚĂ Victoria