О.П. Корнійчук, Л.М. Бурова, Г.С. Лаврик, Н.М. Ференц, Н.І. Максимів

ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ БІОСПОРИНУ: ДОСЛІДЖЕННЯ *IN VITRO*

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна
КЗ ЛОР ОХМАТДИТ

Мета: *вивчення антагоністичної активності in vitro препарату «Біоспорин-Біофарма» стосовно стандартних культур кишкових патогенів Shigella sonnei, Salmonella typhimurium, референтного штаму Escherichia coli та клінічних ізолятів Escherichia coli, Proteus vulgaris, Citrobacter koseri, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, грибів роду Candida.*
Матеріали і методи. *У дослідженнні застосовано класичний метод відтермінованого антагонізму.*
Результати. *Доведено високу активність препарату «Біоспорин-Біофарма» відносно умовно-патогенних ентеробактерій — основних бактеріальних чинників кишкових захворювань і, що особливо важливо, відносно сальмонел та шигел Зонне. Найвищу активність Біоспорину встановлено відносно золотистого стафілокока. Важливою перевагою Біоспорину порівняно з іншими біопрепаратами є елімінуючий ефект відносно грибів роду Candida.*
Висновки. *Антимікробна дія препарату «Біоспорин-Біофарма» та наявність інших лікувальних властивостей дозволяють рекомендувати його застосування при кишкових захворюваннях, хворобах ЛОР-органів та патологічних процесах на слизових оболонках, при зниженні місцевого імунітету, захворюваннях сечовидільної системи. Використання Біоспорину як протигрибкового препарату при дисбіотичних станах у дітей та дорослих дозволяє уникнути або послабити хіміотерапевтичне навантаження на організм.*
Ключові слова: *протимікробна активність, дослідження in vitro, пробіотик, Біоспорин.*

Вступ

За останні десятиліття при дослідженні етіопатогенетичних механізмів розвитку як інфекційних, так і багатьох неінфекційних захворювань, встановлено роль мікробного фактору, що вимагає застосування протимікробної терапії. Появі перших змін, що свідчать про порушення функцій відповідного характеру, передують парафізіологічні стани.

У зв'язку з цим зросла тенденція до застосування пробіотичних препаратів. Накопичено значну кількість достатньо аргументованих і науково обґрунтованих свідчень того, що адекватна корекція мікроекологічних порушень за допомогою засобів біологічної терапії сприяє оптимізації процесів адаптації та компенсації порушених функцій, корекції патологічно змінених ланок метаболізму, досягненню імуномоделюючого, антиоксидантного та інших корисних ефектів (В.П. Широбоков) [9].

Величезний арсенал біопрепаратів включає різні за складом та прямим призначенням лікарські засоби. Якщо препарати першого покоління (традиційні лакто-, біфідо- та коліпрепарати) призначалися переважно для відновлення втраченої нормофлори, то сьогодні з біотерапією пов'язують очікування десенсибілізуючого, морфокінетичного, антитоксикаційного та інших ефектів. До актуальних біопрепаратів відносять композиції з двох і більше компонентів, в яких завдяки асоціації мікроорганізмів впродовж тривалого часу підтримується висока активність і спостерігається сумація ефекту при їх використанні.

Одним з таких препаратів є «Біоспорин-Біофарма» виробництва ПрАТ «Біофарма». Одна доза цього препарту містить ліофілізовані живі мікробні клітини *Bacillus subtilis* УКМ В-5007: $1x10^8$–$2x10^9$, *Bacillus licheniformis* УКМ В-5514: $1x10^9$–$8x10^9$. Останніми роками активно промотуються препарати живих бактерій. Проте бацилярні форми мікроорганізмів доцільно застосовувати саме у висушеному стані, що не містить небажаних бактерійних метаболітів, а проростання у вегетативну форму in vivo вже є початком лікувальної дії. Препарат виявляє високу антагоністичну активність стосовно патогенних та умовно-патогенних бактерій і не впливає на представників нормофлори кишківника. Препарати спороутворюючих бактерій не поступаються ефективністю традиційним пробіотикам у профілактиці кишкових розладів, а інколи виявляються й більш ефективними [11].

Спороносні аеробні бактерії роду *Bacillus* завдяки своїм адаптивним властивостям широко розповсюджені у природі та в об'єктах, з якими тісно контактує людина. Тому вони постійно і в значній кількості потрапляють в організм людини та завдяки стійкості до літичних і травних ферментів зберігають життєздатність у всіх відділах шлунково-кишкового тракту.

Bacillus spp. є алохтонними транзиторними (самоелімінуючими) мікроорганізмами, володіють широким спектром біологічної активності і завдяки цьому викликають великий інтерес як біопрепарати.

Бацили не формують біоплівок, оскільки їхні адгезивні властивості слабо виражені. Їхня активність виявляється в кишечнику і пов'язана, передусім, не з конкурентними взаєминами за місця прикріплення до слизової, а з високою антагоністичною активністю відносно багатьох патогенних бактерій. Одночасно бактерії роду *Bacillus* не виявляють антагоністичної дії щодо представників нормофлори, що створює умови для безконкурентного відновлення мікрофлори [4].

Антагоністична дія бацил здійснюється за рахунок продукції різних за природою біологічно активних речовин, дипіколінової кислоти спор [10], лізоциму, літичних ферментів, поліпептидних антибіотиків [7].

Встановлено, що *Bacillus subtilis B-439* продукує комплекс сполук низькомолекулярних речовин з амфіфільними властивостями, що належать до циклічних ліпопептидів з групи ітуринів, які широко відомі своїми антагоністичними антифунгальними властивостями [6].

Nosoi et al. в експериментах на мишах довели, що пробіотична ефективність спор може бути зумовлена посиленням місцевого метаболізму або ферментативної активності [12]. Завдяки протеазній активності спор *Bacillus* активізуються процеси травлення, виробляється вітамін K_2 і знижується алергенність їжі [8], а каталаза і субтилізин бацил стимулює ріст *Lactobacillus* [13] Про-

Таблиця 1

Зони затримки росту препаратом «Біоспорин-Біофарма» індикаторних культур бактерій (мм)

Вид мікроорганізму	Кількість культур	Зона затримки росту (M±m)	Рівень антагоністичної активності
S. aureus	12	33,0±1,1	Високий
S. saprophyticus	16	29,2±0,9	Високий
E. faecalis	20	25,0±2,8	Середній
E. coli	22	32,1±4,0	Високий
P. mirabilis	14	28,8±1,0	Високий
C. koseri	20	26,9±2,8	Високий
P. aeruginosa	14	24,0±3,0	Середній
Candida spp.	17	20,0±2,7	Середній

тиалергічна дія грунтується на здатності споротвірних бактерій розщеплювати харчові та мікробні алергени на субодиниці, які втрачають біологічну активність [10].

Традиційно Біоспорин призначають для лікування дітей та дорослих, хворих на гострі кишкові інфекції (ГКІ) різного ступеня тяжкості, спричинені патогенними та умовно-патогенними бактеріями; для осіб, що перенесли ГКІ; для корекції мікрофлори кишечника при дисбактеріозі, що розвинувся в результаті антибіотикотерапії. При постмедикаментозному дисбіозі на тлі пригнічення облігатних нормосимбіонтів, як правило, активуються умовно-патогенні ентеробактерії та інші бактерійні опортуністи (псевдомонади, ентерококи, стафілококи). Перебіг дисбіозу ускладнюється проліферацією дріжджоподібних грибів.

Метою роботи було вивчення антагоністичної активності *in vitro* Біоспорину стосовно стандартних культур кишкових патогенів *Shigella sonnei, Salmonella typhimurium*, референтного штаму *Escherichia coli* та клінічних ізолятів *Escherichia coli, Proteus vulgaris, Citrobacter koseri, Staphylococcus. saprophyticus, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis*, грибів роду *Candida*.

Матеріал і методи дослідження

Антагоністичну активність Біоспорину — асоціації бактерій *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis* (компоненти пробіотика) — визначали за класичним методом відтермінованого антагонізму [1,3]. Для цього штами аеробних сапрофітів (*B. subtilis, B. licheniformis*), не виділяючи їх із суміші, вирощували протягом доби при t 37°C до окремих макроколоній на пластинках 2% м'ясопептонного агару. Безпосередньо перед використанням суспензії індикаторних штамів підрощували 6 годин у м'ясопептонного бульйоні при t 37°C. Чашки Петрі з макроколоніями досліджуваних культур обробляли парами хлороформу протягом 50 хвилин. Наступні 50 хв їх підсушували на повітрі під кварцевою лампою. Свіжі бульйонні культури індикаторних штамів об'ємом 0,1 мл змішували з 5,0 мл 0,7% розплавленого і потім охолодженого до 48°C м'ясопептонного агару. Цією сумішшю заливали попередньо підготовлені тестові культури на пластинках агару, швидко розподіляючи її по поверхні агару з макроколоніями.

Облік результатів проводили після інкубації чашок протягом 24 годин при t 37°C. Якщо навколо макроколонії спостерігали помітну зону інгібування індикатора, то вважали, що біоспорин виявив антагоністичну активність. Рівень кіллерної активності біоспорину виражали умовно як низький, середній, високий та дуже високий. Антагоністична активність низького рівня визначалась, коли на газоні індикатора утворювались зони діаметром від 7 мм до 16 мм. Середній та високий рівень активності характеризувався зоною інгібування з діаметрами 17–26 мм і 27–36 мм відповідно. При дуже високому рівні активності зона затримкм росту індикаторних штамів становила від 37 мм до 46 мм (табл. 1,2).

У якості індикаторних культур використовували бактерійні ізоляти з клінічного матеріалу (гній із пустул на шкірі, слиз із зіву та сечогенітального тракту, сеча, випорожнення) грампозитивних (*S. aureus, S. saprophyticus, E. faecalis*) та грамнегативних мікроорганізмів (*E. coli, C. koseri, P. mirabilis, P. aeruginosa*), грибів роду *Candida* (*C. albicans*). У роботі використано референтний штам *E. coli* ATCC 25922. При дослідженні дії біоспорину на облігатні патогени використовувалися стандартні культури *S. sonnei (III)139, S. typhimurium A154*

Виділені мікроорганізми піддавали ідентифікації за морфологічними, культуральними, біохімічними властивостями [12,13]. Виділену чисту культуру ентеробактерій та стафілококів ідентифікували за допомогою пластин (для біохімічної ідентифікації) ПБДЕ та ПБДС (НВО «Диагностические системы», Россия). Неферментуючі бактерії роду *Pseudomonas* ідентифікували загальноприйнятими методами, а також за допомогою тест-системи для ідентифікації API 20 NE фірми BioMerieux (Франція).

Отримані результати були статистично оброблені.

Після інкубування посівів проведено замірювання зон затримки росту і визначено середні величини для клінічних штамів мікроорганізмів (рис.).

Результати дослідження та їх обговореннння

Отримані результати абсолютних значень зон затримки росту індикаторних культур під дією Біоспорину дозволили проаналізувати активність відносно різних видів тестованих бактерій та дріжджоподібних грибів і визначити рівень антагоністичної активності препарату. Так, для всіх видів досліджених клінічних культур активність Біоспорину була середньою або високою. Найвищу активнсть Біоспорину встановлено відносно золотистого стафілокока. Проте високоактивним Біоспорин виявився для всіх досліджених ентеробактерій. Лише для *C. koseri* зона затримки росту навколо інокулянта Біоспорину була на межі середньої та високої

Таблиця 2

Зони затримки росту стандартних штамів патогенних ентеробактерій біоспорином (мм)

Вид мікроорганізму	№ референтного штаму	Зона затримки росту	Рівень антагоністичної активності
E.coli	ATCC 25922	28,0	Високий
S. typhimurium	A154	29,0	Високий
S. sonnei	(III)139	27,0	високий

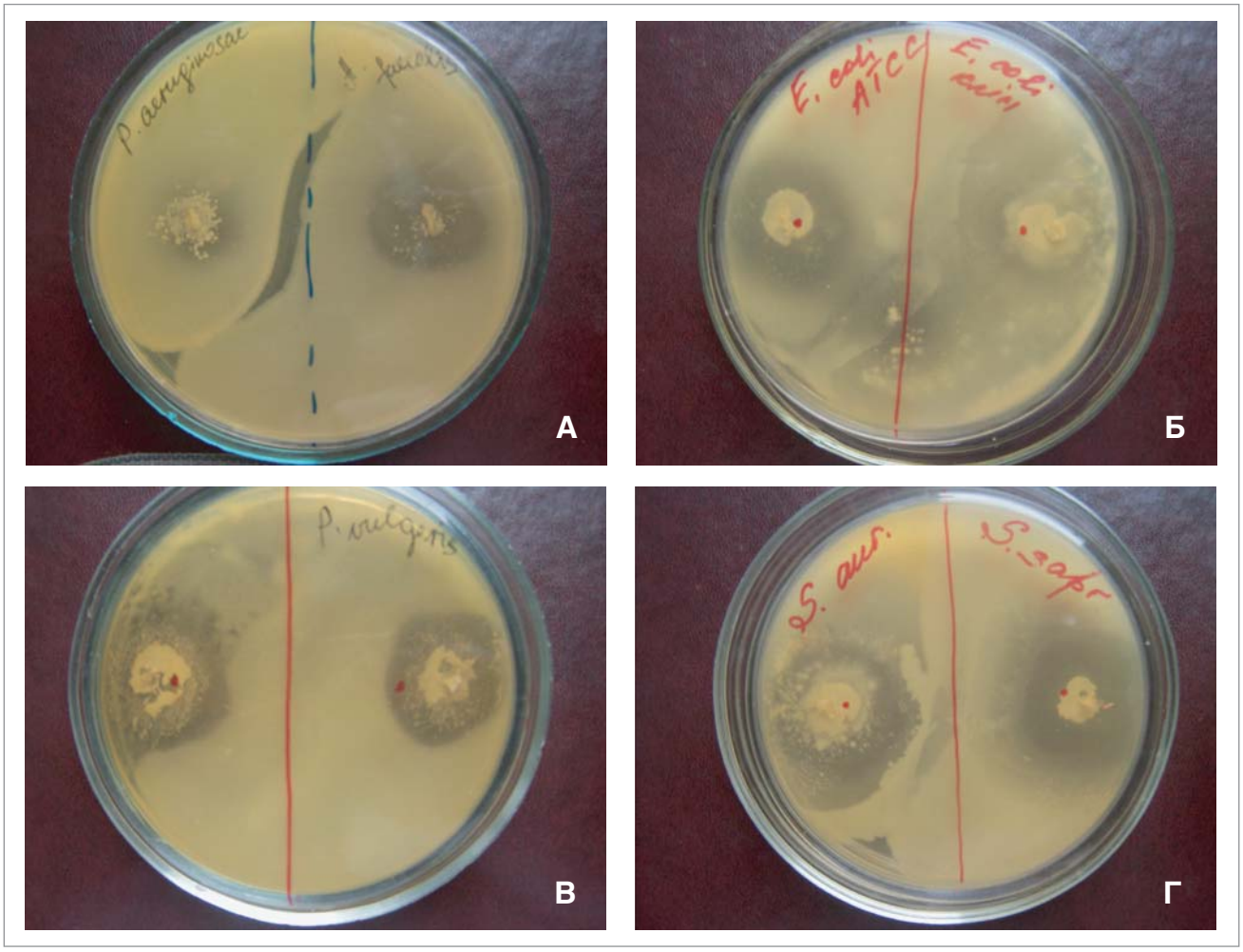


Рис. Антагоністична активність Біоспорину відносно індикаторних культур: А — Pseudomonas aeruginosa та Enterococcus faecalis; Б — Escherichia coli ATCC 25922 та Escherichia coli (клінічний штам); В — Proteus vulgaris (2 штами); Г — Staphylococcus aureus та Staphylococcus saprophyticus.
Зони затримки росту перелічених індикаторних культур показано навколо«бляшок» інокульованого Біоспорину.

активності (26,9±2,8)мм. Менш чутливими були і *E. faecalis* та *P. aeruginosa*.

Аналізуючи активність Біоспорину відносно збудників сальмонельозу та дизентерії — *S. sonnei* та *S. typhimurium* (стандартні штами), — слід зазначити високу активнсть препарату. Значно вищою виявилася чутливість до Біоспорину і референтного штаму кишкової палички АТСС 25922 порівняно із середнім показником клінічних штамів ешерихій, хоча обидва показники визначають високу активнсть пробіотика. Достатньо чутливими до дії Біоспорину виявилися і гриби *Candida spp*.

Біоспорин *in vitro* стійкий лише до незахищених пеніцилінів, лінкоміцинів та слабочутливий до аміноглікозидів. До всіх груп цефалоспоринів та фторхінолонів досліджена асоціація бацил має добру чутливість. Слід враховувати значну підтримку в атакуванні інфекційного фактору імунної системи, а також наявність у досліджуваного препарату імуномодулюючого ефекту.

Висновки

Таким чином, показано і підвтерджено отримані раніше показники високої активності препарату «Біоспорин-Біофарма» виробництва ПрАТ «Біофарма» відносно основних бактеріальних чинників кишкових захворювань, спричинених умовно-патогенними ентеробактеріями, і, що особливо важливо, відносно сальмонел та шигел Зонне, оскільки після перенесення ГКІ нерідко формується дисбактеріоз, який сприяє або хронізації захворювання, або формуванню носійства, може бути провокуючим фактором для розвитку синдрому подразненої кишки в людей, що мають генетичну схильність до цього захворювання. Особливо важливою перевагою біоспорину порівняно з іншими біопрепаратами є елімінуючий ефект відносно грибів роду *Candida*. Він досягається не лише наявністю антагоністичних властивостей у компонентів Біоспорину, але й впливом препарату на морфокінетику кишечника. Використання Біоспорину як протигрибкового препарату показане при дисбіотичних станах у дітей та дорослих, що дозволяє уникнути або послабити хіміотерапевтичне навантаження на організм.

Наявність у препарату «Біоспорин-Біофарма» інших лікувальних властивостей, окрім прямого антимікробного ефекту, дозволяє обирати індивідуальні найбільш ефективні схеми його застосування при кишкових захворюваннях, хворобах ЛОР-органів та патологічних процесах на слизових оболонках, при зниженні напружено-

сті місцевого імунітету, при захворюваннях сечовидільної системи.

При проведенні медикаментозного лікування найбільш доцільним є застосування Біоспорину одразу після закінчення курсу антибіотикотерапії у поєднанні з вживанням молочнокислих харчових продуктів, оскільки Біоспорин продукує речовини, які стимулюють розвиток *Lactobacillus*, що дозволить у найкоротші терміни досягти елімінації інфекційного чинника та попередити можливі ускладнення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Информационное письмо по типированию колицинов, выделенных возбудителями дизентерии и других кишечных инфекций. — К., 1979. — 8 с.
2. Клиническая лабораторная аналитика / под ред. В. В. Меньшикова. — М. : Агат-Мед, 2003. — Т. IV. — 815 с.
3. Колтукова Н. В. Коліциногенна активність та чутливість до антибіотиків колекційних і свіжовиділених штамів Shigella flexneri та Shigella sonnei / Н. В. Колтукова, Т. Л. Серебрякова, В. В. Яновська // Микробиол. журн. — 2005. — Т. 67, № 5. — С. 69—79.
4. Коршунов В. М. Проблема регуляции микрофлоры кишечника / В. М. Коршунов // Журн. микробиол. — 1995. — № 3.
5. МОЗ України Головне санітарно-епідеміологічне управляння. Державні санітарні правила та норми, гігієнічні нормативи. 9. Епідеміологія. 9.5. Стан здоров'я населення у зв'язку з впливом мікробіологічного фактора «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторії мікробіологічного профіля» Державні санітарні правила ДСП 9.9.5.—080—02 Київ 2002 рік.
6. Первичная идентификация метаболитов с антифунгальной активностью, продуцируемiх штам мов Bacillus subtilis Б-439 / Бережная А. В., Коломиец Є. И., Романовская Т. В., Купцов // Тези доп. XIII з'їзду ТМУ ім. С.М. Виноградського., 1—6 жовтня 2013. — Ялта, 2013. — С. 65.
7. Сорокулова И. Б. Влияние пробиотиков из бацилл на функциональную активность макрофагов / И. Б. Сорокулова // Рос. вестн. пеританол. и педиатрии. — 2007. — № 2. — С. 28—29.
8. Функціональна активність та природа екзометаболітів Bacillus subtilis IMB B-7404 / Драговоз І. В., Леонова Н. О., Марченкова Ю. Ф. [та ін.] // Тези доп. XIII з'їзду ТМУ ім. С.М. Виноградського., 1—6 жовтня 2013. — Ялта, 2013. — С. 90.
9. Широбоков В. П. Мікробна екологія людини з кольоровим атласом / В. П. Широбоков, Д. С. Янковський, Г.С. Димент. — К., 2009. — С. 206.
10. Changes in fecal microflora induced by incubation of mice with Bacillus subtilis (natto) spores are dependent upon dietary components / Hosoi T., Ametani A., Kiuchi K., Kaminogava S. // Can. J. Microbiol. — 1999. — Vol. 45. — P. 59—66.
11. Hong H. A. The use of bacterial spore formers as probiotics / H. A. Hong, L. H. Duc, S. M. Culting // FEMS Microdiol. Rev. — 2005. — Vol. 29, № 4. — P. 813—835.
12. Hosoi T. A food made by fermenting cooked soybeans with Bacillus subtilis (natto) / Hosoi T., Kiuchi K. Natto // Handbook of fermented Functional Foods / Farnworth E. R. (editor). — Boca Raton, Fla:CRC Press, 2003. — P. 227—245.
13. Improved growth and viability of Lactobacilli in the presence of Bacillus subtilis (natto), catalase, or subtillisin / Hosoi T., Ametani A., Kiuchi K., Kaminogava S. // Can. J. Microbiol. — 2000. — Vol. 46. — P. 892—897.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ БИОСПОРИНА: ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*

О.П. Корнийчук, Л.М. Бурова, Г.С. Лаврик, Н.М. Ференц, Н.И. Максимив

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Украина КУ ЛОР ОХМАТДЕТ

Цель: изучение антагонистической активности in vitro препарата «Биоспорин-Биофарма» относительно стандартных культур кишечных патогенов Shigella sonnei, Salmonella typhimurium, референтного штамма Escherichia coli и клинических изолятов Escherichia coli, Proteus vulgaris, Citrobacter koseri, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, грибов рода Candida.

Материалы и методы. В исследовании применялся классический метод отсроченного антагонизма.

Результаты. Доказана высокая активность препарата «Биоспорин-Биофарма» относительно условно-патогенных энтеробактерий — основных бактериальных факторов кишечных заболеваний и, что особенно важно, относительно сальмонелл и шигелл Зонне. Наибольшая активность Биоспорина установлена относительно золотистого стафилококка. Важным преимуществом Биоспорина по сравнению с другими биопрепаратами является элиминирующий эффект относительно грибов рода Candida.

Выводы. Антимикробное действие препарата «Биоспорин-Биофарма» и наличие других лечебных свойств позволяют рекомендовать его применение при кишечных заболеваниях, болезнях ЛОР-органов и патологических процессах на слизистых оболочках, при снижении местного иммунитета, заболеваниях мочевыделительной системы. Использование Биоспорина в качестве противогрибкового препарата при дисбиотических состояниях у детей и взрослых позволяет избежать или ослабить химиотерапевтическую нагрузку на организм.

Ключевые слова: противомикробная активность, исследование in vitro, пробиотик, Биоспорин.

BIOSPORIN ANTIMICROBIAL ACTIVITY: STUDY IN VITRO

O.P. Korniychuk, L.M. Burova, G.S. Lavrik , N.M. Ferents , N.I. Maksimov

Danylo Galytskyi Lviv National Medical University, Ukraine

PD ENT OHMATDET

Objective: To study the antagonistic activity of «Biosporin — Biopharma» in vitro according to the standard cultures of enteric pathogens Shigella sonnei, Salmonella typhimurium, Escherichia coli of the reference strain and clinical isolates Escherichia coli, Proteus vulgaris, Citrobacter koseri, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis and Candida.

Materials and methods. In the examination the classical method of deferred antagonism is used.

Results. It is proved the high activity of «Biosporin — Biopharma» to the opportunistic Enterobacteriaceae — the main factors of intestinal bacterial diseases and, most importantly, with regard to Salmonella and Shigella sonnei. Most Biosporin activity is set with respect to Staphylococcus aureus. An important advantage of Biosporin compared to other biopreparations is eliminating effect to Candida.

Conclusions. The antimicrobial action of «Biosporin — Biopharma» and the presence of other medical properties allow recommending its use during the intestinal diseases, diseases of the upper respiratory tract and pathological processes in the mucous membranes, reduced local immunity and urinary system diseases. The use of Biosporin as an antifungal preparation in dysbiotic conditions in children and adults can avoid or reduce the chemotherapeutic stress on the body.

Key words: antimicrobial activity, study in vitro, probiotic Biosporin.

Сведения об авторах:

Корнийчук А.П. — Национальный медицинский университет им. Д. Галицького, КЗ ЛОР ОХМАТДЕТ. Адрес: г. Львов, ул. Пекарская, 69.
Бурова Л.М. — Национальный медицинский университет им. Д. Галицького, КЗ ЛОР ОХМАТДЕТ. Адрес: г. Львов, ул. Пекарская, 69.
Лаврик Г.С. — Национальный медицинский университет им. Д. Галицького, КЗ ЛОР ОХМАТДЕТ. Адрес: г. Львов, ул. Пекарская, 69.
Ференц Н.М. — Национальный медицинский университет им. Д. Галицького, КЗ ЛОР ОХМАТДЕТ. Адрес: г. Львов, ул. Пекарская, 69.
Максимив Н.И. — Национальный медицинский университет им. Д. Галицького, КЗ ЛОР ОХМАТДЕТ. Адрес: г. Львов, ул. Пекарская, 69.

Статья поступила в редакцию 18.10.2013 г.

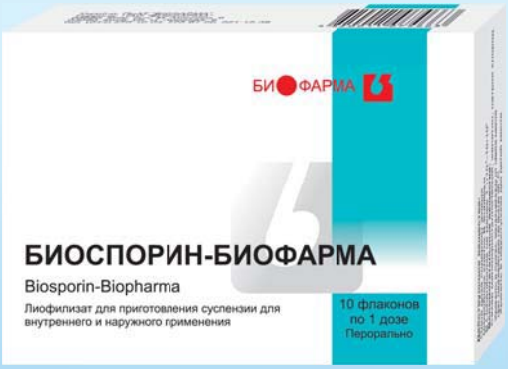
✓ Самоэлиминирующий антагонист*

✓ Вырабатывает антибиотикоподобные вещества*

✓ Оказывает высокую антагонистическую активность по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре*

✓ Не влияет на представителей нормальной микрофлоры*

N.B.
Используется у детей с 3-х месяцев.
Разрешен к применению у беременных женщин и кормящих матерей.



Р. с. № 677/12-300200000 приказ МЗ Украины № 554 от 23.07.2012

Показания к применению:
- Острые кишечные инфекции (ОКИ)**
- Лечение реконвалесцентов после ОКИ**
- Лечение хронического афтозного стоматита**
- Лечение вульвовагинального кандидоза и бактериального вагиноза**
- Лечение дисбактериоза кишечника у детей **

Побочные действия: не выявлено.

* Похиленко В.Д., Перелыгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2–3. – С. 27–28, 32–33.
** Выдержка из инструкции по медицинскому применению препарата.

Информация о лекарственном средстве для профессиональной деятельности медицинских и фармацевтических специалистов. Перед применением необходимо проконсультироваться с врачом и ознакомиться с инструкцией. Хранить в недоступном для детей месте. Персонализированная информация.

BIOFARMA

Производитель:
ЧАО «БИОФАРМА», ул. Н. Амосова, 9
г. Киев, 03680, Украина,
тел./факс: +380 (44) 529 21 93
www.biofarma.ua