



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2007 00504

(22) Data de depozit: 17.07.2007

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: 30.05.2011 BOPI nr. 5/2011

(41) Data publicării cererii:
28.02.2008 BOPI nr. 2/2008

(73) Titular:

• UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,
BD. M. KOGĂLNICEANU NR. 36-46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

• PELINESCU DIANA-ROXANA,
STR. CRISTEA MATEESCU NR.3, BL. T4B,
SC.1, ET.7, AP.42, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CHIFIRIUC MARIANA-CARMEN,
STR. TUZLA NR. 1, BL. 11, SC. B, ET. 4,
AP. 56, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• SĂȘĂRMAN ELENA, BD. IULIU MANIU
NR.158, BL.37, SC.2, ET.2, AP.50,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• VASSU-DIMOV TATIANA-ELISABETA,
STR. POPA PETRE, NR. 18, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;

• STOICA ILEANA, STR. UNITĂȚII NR.89,
BL. B10, ET.5, AP.29, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• ENACHE-SOARE SIMONA-CĂTĂLINA,
ALEEA CALLATIS NR.1, BL. A14A, SC.1,
ET.4, AP.13, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;

• IONESCU ROBERTINA-ADRIANA,
CARTIER EPISCOPIEI, BL.A9, ET.5, AP.23,
BUZĂU, BZ, RO;

• AVRAM IONELA, STR. TEILOR NR.6,
BL. PS36, SC.B, ET.1, AP.5, PITEȘTI, AG,
RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

M. Marcinakova, M. Simonova, A. Laukova,
"Probiotic Properties of *Enterococcus
faecium* EF 9296 Strain Isolated from
Silage", pp. 513-519, Acta Vet. Brno, 73,
2004; EP 0508701 A2; G. Reuter,
"Culture media for enterococci and group
D-streptococci", pp. 101-111, International
Journal of Food Microbiology, 17, 1992.

(54) PROCEDEU DE IZOLARE, SELECȚIE ȘI CONSERVARE A UNEI TULPINI PROBIOTICE DE *ENTEROCOCCUS FAECIUM*,

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de izolare, selecție și conservare a unei tulpini probiotice de *Enterococcus faecium*, bacterie lactică, având utilizări în domeniul zootehnic, ce este formată din coci Gram-pozitivi, imobili, este catalazo-negativă, microaerofilă, homo-

fermentativă și fermentează riboza, L-arabinoza, manitolul, lactoza, trehaloza și amidonul, cu producere de acid.

Revendicări: 1
Figuri: 12

Examinator: biochimist BABALIGEA IRINA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 123277 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de izolare, selecție și conservare a unei
tulpini probiotice de *Enterococcus faecium*, bacterie lactică de uz zootehnic.

3 Este cunoscut faptul că bacteriile lactice sunt considerate probiotice tradiționale. În
prezent, se extinde utilizarea unor tulpini noi de bacterii lactice atent selecționate după
5 numeroase criterii, în zootehnie, în industria de panificație, precum și în fermentarea
materiilor prime de origine vegetală, în scopul obținerii de produse conservabile cu valoare
7 biologică superioară și care să îmbunătățească starea de sănătate a animalelor (Blum S.,
Reniero R., Schiffrin E.J., și alții 1999, *Adhesion studies for probiotics: need for validation and
9 refinement*, Trends Food Sci TechnoLB. 10:405-410, Conway, P. LB. 1996, *Selection criteria
for probiotic microorganisms*, Asia Pacific J. Clin. Nutr. 5:10-14).

11 Uniunea Europeană a aprobat 13 preparate probiotice ca aditivi alimentari pentru
porcine. Dintre acestea 7 produse conțin *Enterococcus faecium*, având ca habitat natural
13 tractul gastrointestinal.

Utilizarea microorganismelor de tip probiotic în alimentația animală diferă sub
15 aspectul modalităților și frecvenței de administrare, a surselor de izolare și selecție a micro-
organismelor care au un grad scăzut de risc datorită prezenței lor la nivelul microbiotei
17 intestinale la animalele sănătoase și a lipsei efectelor adverse (Bomba, A., Nemcova, R.,
Mudronova, D. And Guba, P., 2002, *The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics*,
19 Trends in Food Science & Technology, no. 13, p. 121-126; Kritas, S.K., Morrison, R.B., 2005,
Evaluation of probiotics as a substitute for antibiotics in a large pig nursery, The Veterinary
21 Record, no. 156, p. 447-448; Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines
for the Evaluation of Probiotics in Food, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002;
23 Simonsen Gs, Haaheim H, Dahl Kh, Kruse H, Lovseth A, Olsvik O, Sundsfjord A 1998:
Transmission Of Vana-Type Vancomycin-Resistant Enterococci And Vana Resistance
25 Elements Between Chicken And Humans At Avoparcin-Exposed Farms. *Microb Drug Resist*
4: 313-318).

27 Principalele efecte urmărite prin administrarea preparatelor de tip probiotic de uz
zootehnic sunt: intensificarea ratei de creștere a animalelor, reducerea morbidității și
29 mortalității, reducerea riscului îmbolnăvirii animalelor și, indirect, a consumatorilor de produse
animale. Aceste efecte se pot datora activității antimicrobiene, capacității de a competiționa
31 cu microorganismele patogene și stimulării sistemului imunitar (**US 20070098744**, *Probiotic
enterococci for improved immunity*, **US 5589168**, *Probiotic*, **US 6503544**, *Animal feed
33 additives*).

Atât în literatura non-brevet, cât și în literatura de brevete, s-au descris metode de
35 izolare a unor tulpini de *Enterococcus faecium*. O tulpină de *Enterococcus faecium* a fost
izolată din nutrețuri fermentate și cultivată pe M-*Enterococcus* agar (Marciňáková M.,
37 Simonová M., Lauková A. 2004 *Probiotic properties of Enterococcus faecium EF926 Strain
Isolated from Silage*, Acta Vet. Brno, 73:513-519). Cererea de brevet **EP 0508701 A2** cu titlul
39 "Probiotic" descrie o tulpină de *Enterococcus faecium* cu proprietăți probiotice care se
dezvoltă pe un mediu care cuprinde agar, glucoză și acetat de tetrazoliu. În lucrarea lui G.
41 Reuter (1992, *Culture media for enterococci and group D-streptococci*, International Journal
of Food Microbiology, 17, 101-111) se prezintă compoziții de medii de cultură pentru
43 enterococi și se menționează că *Enterococcus faecium* se dezvoltă pe medii de cultură ce
conțin triptonă, extract de drojdie, tween 80, KH₂PO₄, citrat de sodiu, carbonat de sodiu,
45 azidă de sodiu, TTC, agar, la pH 7 și la 37°C.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a izola o tulpină de bacterie
47 lactică (care în mod obișnuit este rezidentă a tractului gastrointestinal), de tip probiotic, care
inclusă în hrana animalelor să conducă la îmbunătățirea stării de sănătate a animalelor și
49 implicit la creșterea performanțelor acestora.

RO 123277 B1

Procedeul de izolare, selecție și conservare a unei tulpini probiotice de *Enterococcus faecium*, conform invenției, constă în aceea că se izolează o tulpină de *Enterococcus faecium* prin realizarea de diluții seriale zecimale dintr-o probă de lapte fermentat care se însămânțează pe un mediu specific care cuprinde 1,0% lactoză, 1,0% bacto-tryptonă, 0,5% extract de drojdie; 0,25 % gelatină, 0,4 % clorură de sodiu, 0,05 % acid ascorbic, 1,5% agar-agar și 1% CaCO₃, cu pH 7,0, peste care se repartizează o peliculă de mediu specific semisolid cu 0,7% agar-agar și care se incubează timp de 24...72 h, la 37°C, rezultând colonii înconjurate de un halou transparent, cărora li se măsoară indicele de aciditate, iar din acestea se selectează colonii cu indice de aciditate $I_a \geq 2$, care se repică de 3 ori pe un mediu având compoziția de mai sus, în scopul obținerii de clone pure care aparțin grupului de bacterii lactice, apoi clonele pure rezultate se caracterizează prin teste de taxonomie polifazică și teste de analiză a sensibilității față de antibiotice și de analiză a capacității de aderență *in vitro* la celulele HeLa în prezența tulpinii patogene *Salmonella enteridis* în scopul selectării unei clone pure de bacterie lactică *Enterococcus faecium* catalazo - negativă, microaerofilă, homofermentativă, care dezvoltă pe mediu specific colonii de tip S, are un interval optim de dezvoltare la pH cuprins între 7 și 8, la o temperatură cuprinsă între 28 și 42°C și o rezistență la NaCl până la o concentrație de 5%, fermentează riboza, L-arabinoza, manitol, lactoza, trehaloza și amidonul cu producere de acid, procentul molar de G+C reprezentând 37,53% din ADN-ul genomic, este rezistentă la aminoglicozidele amikacina, kanamicina, netilmicina, sisomicina, la cefalosporinele cefuroxim și ceftriaxonă, este sensibilă la glicopeptidele vancomicină și teicoplanină, prezintă un *pattern* de aderență difuz și capacitate de inhibare a aderenței celulelor de *Salmonella enteritidis* la substratul reprezentat de celulele eucariote și respectiv de blocare a internalizării celulelor patogene, și are efect antiinfecțios și antimicrobian față de celulele viabile de *Salmonella*, și care, în final, se conservă fie prin liofilizare utilizând ca mediu protector un mediu care cuprinde 10,0% trehaloză, 1,0% sorbitol și 0,5% gelatină, fie prin crioconservare la -70°C folosind ca mediu protector un mediu specific pentru cultivarea enterococilor conținând 20% glicerol.

Procedeul conform invenției permite obținerea unei tulpini de bacterie lactică, izolată dintr-o nișă ecologică specifică (lapte fermentat), caracterizată printr-o activitate antimicrobiană față de tulpinile *Bacillus subtilis* LMG 17722 și *Clostridium tyrobutiricum* LMG 1285, sensibilitate la glicopeptide (vanomicina și teicolpanina), capacitatea de aderență *in vitro* și efectul protector față de infecția cu *Salmonella enteritidis* prin experimente *in vivo* prin care se atestă caracterul probiotic și care o recomandă ca o tulpină de tip de probiotic de uz zootehnic.

Procedeul conform invenției constă în aceea că se obține o tulpină de bacterie lactică prin izolare dintr-o nișă ecologică specifică (lapte), care se caracterizează prin teste de taxonomie polifazică, fiind încadrată în specia *Enterococcus faecium*, și care se conservă vegetativ pe mediu specific în prezența CaCO₃ și timp îndelungat prin liofilizare și congelare la -70°C. Caracterul de tip probiotic al tulpinii este atestat de *pattern-ul* de sensibilitate la antibiotice care a demonstrat sensibilitatea la vancomicină și teicoplanină, prin care tulpina nu prezintă riscul de diseminare a genelor de rezistență la glicopeptide la tulpinile patogene. Analiza capacității de aderență *in vitro* la celulele HeLa atât în absența, cât și în prezența tulpinii patogene *Salmonella enteritidis* care a relevat faptul că tulpina de *Enterococcus* dezvoltă un *pattern* de aderență difuz. Studiile *in vivo* au demonstrat eliminarea în materiile fecale ale animalelor de experiență a celulelor de *Salmonella enteritidis*, reducerea ratei de eliminare în fecale a microbiotei normale și absența agentului patogen, atât în diferite segmente ale tractului gastrointestinal, cât și în fecale.

RO 123277 B1

1 Procedeul conform invenției conduce la următoarele avantaje:

2 - izolează și identifică o tulpină de tip probiotic de uz zootehnic care prezintă
3 sensibilitate la vancomicină și teicoplanină și elimină prin aceasta riscul diseminării genelor
de rezistență la glicopeptide la tulpinile patogene;

5 - permite obținerea unei tulpini care prin administrare la animalele de experiență
influențează compoziția microbiotei autohtone, determină o creștere a densității bacteriilor
7 lactice atât a celor care aderă și colonizează tractul gastrointestinal, cât și a celor luminale,
eliminate în materiile fecale;

9 - permite obținerea unei tulpini care are capacitatea de a disloca și inhiba dezvoltarea
microorganismului patogen *Salmonella enteritidis*.

11 Se prezintă în continuare patru exemple de realizare a invenției, în legătură cu
figurile:

13 - Fig. 1: Celule HeLa infectate cu *Enterococcus faecium* CMGB 8 (A), *Salmonella*
14 *enteritidis* (B) și *Enterococcus faecium* CMGB 8 + *Salmonella enteritidis* (C) (colorație
15 Giemsa, x2500).

17 - Fig. 2: Reprezentarea comparativă a numărului de microorganisme viabile lactozo-
fermentative (LFM) eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ,
18 CI - control cu infecție și CMGB 8 - administrare profilactică a tulpinii *Enterococcus faecium*
19 CMGB 8 (trei zile înainte de infecția cu *Salmonella enteritidis*).

21 - Fig. 3: Reprezentarea comparativă a numărului de bacterii lactice (BL) viabile
eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ, CI - control cu infecție
22 și CMGB 8 - administrare profilactică a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 (trei zile
23 înainte de infecția cu *Salmonella enteritidis*).

25 - Fig. 4: Reprezentarea comparativă a numărului de celule de *Salmonella enteritidis*
viabile eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ, CI - control cu
26 infecție și CMGB 8 - administrare profilactică a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 (trei
27 zile înainte de infecția cu *Salmonella enteritidis*).

29 - Fig. 5: Reprezentarea comparativă a numărului de microorganisme viabile lactozo-
fermentative (LFM), bacterii lactice (BL), *Salmonella enteritidis* la nivelul diferitelor segmente
30 ale tractului digestiv la diferite loturi experimentale. CN - control negativ, CI - control cu
31 infecție și CMGB 8 - administrare profilactică a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 cu
Salmonella enteritidis.

33 - Fig. 6: Reprezentarea comparativă a numărului de microorganisme viabile lactozo-
fermentative (LFM) eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ,
34 CI - control cu infecție și CMGB 8 - administrare simultană a tulpinii *Enterococcus faecium*
35 CMGB 8 cu *Salmonella enteritidis*.

37 - Fig. 7: Reprezentarea comparativă a numărului de bacterii lactice (BL) viabile
eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ, CI - control cu infecție
38 și CMGB 8 - administrare simultană a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 cu *Salmonella*
39 *enteritidis*.

41 - Fig. 8: Reprezentarea comparativă a numărului de celule *Salmonella eneteritidis*
viabile eliminat în fecale. CN - control negativ, CI - control cu infecție și CMGB 8 -
42 administrare simultană a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 cu *Salmonella enteritidis*.

44 - Fig. 9: Reprezentarea comparativă a numărului de microorganisme viabile lactozo-
fermentative (LFM) eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ,
45 CI - control cu infecție și CMGB 8 - administrare terapeutică a tulpinii *Enterococcus faecium*
46 CMGB 8 (24 h de la infecția cu *Salmonella enteritidis*).

RO 123277 B1

- Fig. 10: Reprezentarea comparativă a numărului de bacterii lactice (BL) viabile eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ, CI - control cu infecție și CMGB 8 - administrare terapeutică a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 (24 h de la infecția cu *Salmonella enteritidis*). 1
3

- Fig. 11: Reprezentarea comparativă a numărului de celule *Salmonella enteritidis* viabile eliminate în fecale. CN - control negativ, CI - control cu infecție și CMGB 8 - administrare terapeutică a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 (24 h de la infecția cu *Salmonella enteritidis*). 5
7

- Fig. 12: Reprezentarea comparativă a numărului de microorganisme viabile lactofermentative (LFM), bacterii lactice (BL), *Salmonella enteritidis* la nivelul diferitelor segmente ale tractului digestiv la diferite loturi experimentale. CN - control negativ, CI - control cu infecție și CMGB 8 - administrare terapeutică a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 (24 h de la infecția cu *Salmonella enteritidis*). 9
11
13

Exemplul 1. Izolarea tulpinii de *Enterococcus faecium* CMGB 8 s-a efectuat dintr-o probă de lapte fermentat provenit dintr-o gospodărie țărănească din Banat. În acest scop 10 g lapte fermentat au fost introduse în 100 ml ser fiziologic steril (0,9% NaCl), realizându-se în continuare diluții zecimale. Pentru obținerea de colonii izolate, câte 0,1 ml din fiecare diluție au fost însămânțați pe mediu specific solidificat repartizat în plăci Petri conținând procentual (g/100): lactoză - 1,0; bacto-triptonă - 1,0; extract de drojdie - 0,5; gelatină - 0,25, 19
21

Pentru crearea condițiilor de microaerofilie pe suprafața mediilor însămânțate s-a repartizat o peliculă de LIA semisolid (cu 0,7% agar-agar). Plăcile au fost incubate timp de 24-72 h la 37°C, iar coloniile care au prezentat un halou mare în jurul lor au fost măsurate pentru determinarea indicelui de acidifiere (I_a) care se recomandă a fi egal sau mai mare de 1,5. 23

$$I_a = \phi_{\text{total}} / \phi_{\text{colonie}} \geq 1,5 \quad 25$$

Un număr de zece colonii tipice cu $I_a \geq 2$ au fost repicate pe mediu lichid de mai sus, obținându-se stocul inițial de clone pure. Pentru o selecție riguroasă clonele au fost repicate de trei ori. 27

Investigațiile preliminare efectuate: analiza microscopică, aciditatea totală și reacția catalazei au permis încadrarea lor în grupul bacteriilor lactice, cu probabilitatea cea mai mare de a aparține genului *Enterococcus*. 29
31

Din totalul clonelor pure a fost selecționată o tulpina (clonă pură) *Enterococcus faecium* care a fost identificată comparativ cu tulpina de referință *Enterococcus faecium* IC 14903. 33
35

Tabelul 1

Profilul enzimatic al tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8, efectuat cu kitul API20 Strep 37

Substrat	Reacție/Enzima	Tulpini de bacterii lactice	
		<i>E. faecium</i> IC 14903	CMGB 8
Piruvat	Producere de acetoina	+	+
Hipurat	Hidroliza acidului hipuric	+	-
Esculina	β -glucozidaza (hidroliza esculinei)	+	+
Pirolidonil 2 naftilamida	Pirolidonil arilamidaza	+	+

RO 123277 B1

Tabelul 1 (continuare)

Substrat	Reacție/Enzima	Tulpini de bacterii lactice	
		<i>E. faecium</i> IC 14903	CMGB 8
6-brom-2-naftil α D-galactopiranozid	α -galactozidaza	+	+
Naftol AS-BI β -glucuronat	β -glucuronidaza	-	-
2-naftil- β -D-galactopiranozid	β -galactozidaza	+	+
2-naftilfosfat	Fosfataza alcalină	+	+
L-leucina-2-naftilamina	Leucin arilamidaza	+	+
Arginina	Arginin dihidrolaza	+	-

Tabelul 2

Metabolizarea surselor de carbon a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 cu kitul API20 Strep

Substrat	Tulpini de bacterii lactice	
	<i>Enterococcus faecium</i> IC 14903	CMGB8
Riboza	+	+
L Arabinoza	+	+
Manitol	+	+
Sorbitol	-	-
Lactoza	+	+
Trehaloza	+	+
Inulina	-	-
Rafinoza	-	-
Amidon	+	+
Glicogen	+	-
Încadrarea taxonomică preliminară		<i>Enterococcus faecium</i>

Conform rezultatelor obținute, tulpina izolată poate fi încadrată în specia *Enterococcus faecium*, având următoarele caracteristici: coci izolați, în diplo și lanțuri scurte sau în grămezi, Gram pozitivi, immobili; tulpina este catalazo-negativă, microaerofilă, homofermentativă, dezvoltând pe mediu specific solidificat colonii de tip S, de culoare crem, cu un diametru între 0,2 și 2 mm. Tulpina prezintă un interval optim de dezvoltare la pH cuprins între 7 și 8, temperatura cuprinsă între 28 și 42°C și rezistența la NaCl până la o concentrație de 5%. Metabolizează diferite surse de carbon cu producere de acizi organici ca: riboză, L-arabinoză, manitol, lactoză, trehaloză și amidon. Nu fermentează sorbitolul, inulina și rafinoza. Se deosebește de tulpina de referință *Enterococcus faecium* IC 14903 prin aceea că nu fermentează glicogenul. A fost evidențiată prezența unor enzime caracteristice

diferitelor căi metabolice ca: β -glucozidază, pirolidonil arilamidază, α -galactozidază, β -galactozidază, fosfatază alcalină, leucinaril amidaza. Comparativ cu tulpina de referință *Enterococcus faecium* IC 14903, nu a fost evidențiată arginindihidrolaza și nici hidroliza acidul hipuric. Tulpina este rezistentă la săruri biliare, produce hidrogen sulfurat și nu reduce sărurile de tetrazoliu. Procentul molar de GC (G=guanină, C=citozină) este de 37,53%.

Tulpina izolată și identificată a fost înregistrată în Colecția Centrului de Cercetare Formare și Consultanță în Microbiologie, Genetică și Biotehnologie (MICROGEN) ca *Enterococcus faecium* având acronimul CMGB 8.

Pentru menținerea caracteristicilor biotehnologice se recomandă conservarea acestora pe medii lichide, fapt care impune transferuri periodice frecvente care favorizează inducerea unor modificări genetice nedorite. Acest dezavantaj a fost înlăturat prin conservarea tulpinii pe mediu lichid specific indicat mai sus la izolarea tulpinii cu adaos de 1% CaCO_3 cu rol de neutralizare a acizilor organici, în special a acidului lactic - metabolit final al fermentației - adăugat în concentrație stoichiometrică față de sursa de carbon. Valabilitatea conservului prin păstrare la -40°C este de 27 luni. Conservarea îndelungată s-a efectuat prin două tehnici și anume: liofilizare prin care s-a folosit ca mediu protector: g/100 10.0 trehaloză, 1.0 sorbitol și 0.5 gelatină, timp de valabilitate peste 25 ani. Conservarea prin congelare la -70°C s-a efectuat folosind ca mediu protector mediu specific pentru cultivarea enterococilor conținând 20% glicerol, valabilitatea conservului fiind de aproximativ 10 ani.

Evaluarea proprietăților biotehnologice a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 izolată și selecționată în scopul evidențierii caracterului probiotic este demonstrată în exemplele următoare.

Exemplul 2. Sensibilitatea la substanțele antibiotice (antibiograma) reprezintă una din caracteristicile importante în utilizarea bacteriilor lactice ca preparate probiotice. Pentru aceasta s-a utilizat metoda difuzimetrică (metoda Kirby - Bauer) cu discuri standardizate Oxoid impregnate cu antibiotic. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3

Spectrul de sensibilitate la antibiotice pentru tulpina *Enterococcus faecium* CMGB 8

PENICILINE		CEFALOSPORINE		AMINOGLTCOZIDE		POLIPEPTIDE	
Amoxicilina	R	Cefaclor	I	Amikacina	R	Colistin	R
Amoxicilina + acid clavulanic	I	Cefadroxil	R	Dibekacina	S	TETRACICLINE	
Ampicilina + Sublactam	I	Cefalexina	S	Kanamicina	R	Doxyciclina	S
Azlocilina	S	Cefaloridina	R	Gentamicina	I	Tetracilină	S
Aztreonam	R	Cefalotina	S	Neomicina	S	MACROLIDE	
Carbenicilina	S	Cefamandol	R	Netilmicina	R	Clindamicina	S
Imipenem	S	Cefazolina	S	Sisomicina	R	Eritromicina	R
Meropenem	R	Cefetin	R	Streptomicina	S	Lincomicina	R
Mezlocilina	S	Cefoperazona	R	Tobramicina	S	GLIGOPEPTIDE	
Moxalactam	R	Cefotaxim	R	QUINOLONE		Vancomicina	S
Oxacilina	S	Cefotetan	R	Acid nalidixic	R	Teicoplanina	S
Penicilina	R	Cefsulodin	R	Ciprofloxacina	I	SULFAMIDE	

Tabelul 3 (continuare)

PENICILINE		CEFALOSPORINE		AMINOGLICOZIDE		POLIPEPTIDE	
Piperacilina	R	Ceftazidim	R	Norfloxacin	I	Nitrofuran	R
Piperacilina + tazobactam	R	Ceftizoxim	S	Ofloxacin	R	Trimethoprim + sulfametoxazol	R
Ticarcilina	S	Ceftriaxona	R	Pefloxacin	S	DIVERSE	
Ticarcilina+ acid clavulanic	S	Claritromicina	R	RIFAMICINE		Cloramfenicol	S
Ampicilina	I	Cefuroxim	R	Rifampicina	R	Fosfomicina	R

Nota: R - rezistență; S - sensibilitate; I - intermediar

Rezistența naturală multiplă a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 la diferitele clase de antibiotice reprezintă un avantaj, deoarece preparatul probiotic obținut cu acest tip de tulpină poate fi administrat împreună cu antibioticele în tratamentul infecțiilor cu patogeni restabilind astfel microbiota normală.

Enterococcus faecium CMGB 8 prezintă rezistență naturală la aminoglicozide (amikacina, kanamicina, netilmicina, sisomicina), ca și rezistență la cefalosporine (de generația a doua: cefuroxim și de generația a treia: ceftriaxonă). În ceea ce privește sensibilitatea la antibiotice din clasa penicilinelor, *Enterococcus faecium* CMGB 8 prezintă sensibilitate la: azlocilină, carbenicilină, imipenem, mezlocilină, oxacilină și ticarcilină. Din clasa cefalosporinelor, sensibilitatea se manifestă față de cefalexină, cefalotină, cefazolină și ceftizoxim. Prezintă de asemenea sensibilitate față de aminoglicozide ca dibekacină, neomicină, streptomycină și tobramicină; față de quinolone sensibilitatea se observă față de pefloxacin și de asemenea este sensibilă la fosfomicină + trometanol. Antibioticele de tip glicopeptidic sunt foarte importante pentru tratarea unor infecții severe. Este cunoscut faptul că tulpinile aparținând genului *Enterococcus* pot transfera genele de rezistență la vancomicină și teicoplanină, frecvent întâlnite la agenții etiologici Gram-pozitivi ai bolilor nosocomiale. De aceea, pentru tulpinile de *Enterococcus* folosite ca probiotic, este esențială sensibilitatea la vancomicină și teicoplanină.

Tulpina selecționată prezintă avantajul sensibilității la aceste antibiotice, deci nu vor transfera pe orizontală (conjugare, transformare sau transducție) caracterul de rezistență tulpinilor indigene sau alohtone (potențial patogene) din microbiota intestinală, făcându-le mai ușor tratabile.

Exemplul 3. Investigarea capacității de aderență a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 (experiențe *in vitro*) în scopul demonstrării potențialului probiotic al acesteia s-a făcut prin metoda Cravioto adaptată. Modelul utilizează ca substrat sensibil linia celulară HeLa și s-a efectuat în plăci pentru culturi celulare tip - 6 - multiwell care au permis stabilirea capacității tulpinii de *Enterococcus faecium* CMGB 8, respectiv a tulpinilor patogene, separat și în competiție pentru situsurile de aderență la substratul celular ca și *pattern*-ul de aderență.

Enterococcus faecium CMGB 8 a prezentat un *pattern* de aderență difuz. În ceea ce privește tulpina *Salmonella enteritidis*, aceasta prezintă aderență difuz-localizată, o parte din celulele bacteriene sunt internalizate și determină apariția unui efect citopatic manifestat prin balonizarea celulelor eucariote cu apariția de celule gigant. În prezența tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8, se constată o inhibare drastică a aderenței celulelor de *Salmonella enteritidis* la substratul reprezentat de celulele eucariote și respectiv blocarea internalizării celulelor patogene (Figura 1).

Exemplul 4. Experimente *in vitro* pe culturi de celule epiteliale în prezența/ absența tulpinilor patogene care au demonstrat efectele antimicrobiene și competiția pentru situsurile de aderență au servit drept bază pentru selectarea tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 în etapa a doua - studii *in vivo*.

A fost conceput un model de infecție experimentală *in vivo*, care a utilizat animale de laborator (șoareci convenționali), la care s-a urmărit evidențierea interacțiunilor tulpinii de *Enterococcus faecium* cu microorganismul patogen *Salmonella enteritidis*. În cazul administrării profilactice a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 s-a observat faptul că are loc o scădere a numărului de microorganisme lactozo-fermentative eliminate în fecale (fig. 2) comparativ cu lotul martor, căruia nu i-a fost administrată tulpina probiotică. De asemenea numărul de bacterii lactice eliminate este relativ mai mic comparativ cu numărul de bacterii lactice eliminate în fecalele animalelor cărora nu li s-a administrat tulpina *Enterococcus faecium*, ceea ce indică abilitatea tulpinii probiotice de a se lega la situsurile de aderență de la nivelul mucoasei intestinale (fig. 3). Acest fapt este confirmat și de rezultatele obținute în cazul cuantificării numărului de celule viabile de bacterii lactice de la nivelul diferitelor segmente ale tractului digestiv (fig. 5) care este mai mare la lotul cu probiotic față de controlul negativ.

Analiza compoziției microbiotei de la nivelul segmentelor tractului intestinal indică faptul că administrarea tulpinii de *Enterococcus faecium* CMGB 8 determină scăderea numărului de microorganisme lactozofermentative și la nivelul celor trei segmente ale tractului digestiv (duoden, ileon, colon) (fig. 5). Aceste rezultate demonstrează că tulpinile de bacterii lactice administrate profilactic exercită un efect bactericid și asupra microorganismelor din microbiota normală.

În același timp se observă faptul că administrarea profilactică a tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 conduce la scăderea numărului de celulele viabile de *Salmonella enteritidis* eliminate în fecale comparativ cu lotul infectat (CI) (fig. 4) și la absența totală a celulelor microorganismului patogen la nivelul segmentelor tractului intestinal (fig. 5) ceea ce indică acțiunea inhibitorie exercitată de tulpina de bacterie lactică asupra celulelor de *Salmonella enteritidis*.

În cazul administrării tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 simultan cu infecția cu *Salmonella enteritidis*, s-a evidențiat faptul că are loc:

- scăderea numărului de microorganisme lactozo-fermentative eliminate în fecale (fig. 6) ca și în cazul administrării profilactice a bacteriilor lactice;
- creșterea inițială la timpul 0, urmată de menținerea relativ constantă a numărului bacteriilor lactice eliminate (comparativ cu lotul martor negativ) (fig. 7);
- în ceea ce privește celulele de *Salmonella enteritidis*, acestea au fost complet absente din fecale (fig. 8).

În ceea ce privește distribuția microorganismelor la nivelul diferitelor segmente ale tractului intestinal (tabelul 4) s-a constatat o creștere a numărului de celule de bacterii lactice comparativ cu lotul control. Aderența bacteriilor lactice la nivelul segmentelor intestinale poate explica absența celulelor de *Salmonella* din ileon și colon.

Numărul de microorganisme viabile lactozo-fermentative (LFM), bacterii lactice (BL) și *Salmonella* la nivelul diferitelor segmente ale tractului intestinal, în cazul administrării tulpinii *Enterococcus faecium* CMGB 8 concomitent cu infecția cu *Salmonella*, CN - control negativ și CI - controlul cu infecție

Segmente intestinale	Duoden			Ileon			Colon		
	BL	LFM	<i>Salmonella</i>	BL	LFM	<i>Salmonella</i>	BL	LFM	<i>Salmonella</i>
Control negativ	7x10 ⁶	0	0	0	10 ²	0	6x10 ⁷	5x10 ⁴	0
Control cu infecție	7x10 ⁷	0	0	10 ⁹	10 ⁵	1x10 ⁴	2x10 ⁷	10 ⁴	2x10 ²
CMGB 8 + infecție	2x10 ⁸	4x10 ²	0	3x10 ⁸	5x10 ³	0	3x10 ⁸	4x10 ³	0

În cazul administrării probioticelor după 24 h de la infecția cu *Salmonella*, rezultatele sunt similare cu cele obținute atunci când probioticele au fost administrate simultan cu infecția (fig. 9 și 10), și anume:

- crește numărul de celule de *Salmonella* eliminate în fecale la 48 h, iar la 72 h nu au mai fost evidențiate celule viabile ale microorganismului patogen (fig. 11);
- la nivelul segmentelor intestinale, se observă un număr mare de bacterii lactice, iar *Salmonella* este absentă în cazul administrării probioticelor (fig. 12).

Concluzii

1. Administrarea de bacterii lactice viabile șoarecilor convenționali infectați cu doze mari de *Salmonella enteritidis* determină eliminarea rapidă a celulelor infectioase în fecale simultan cu scăderea ratei de colonizare a microorganismului patogen.

2. Analizele comparative privind administrarea profilactică, simultană și după infecția cu *Salmonella* sugerează faptul că tulpinile potențial probiotice exercită un efect vizibil antimicrobian atunci când sunt administrate simultan cu infecția.

3. Tulpina de *Enterococcus faecium* CMGB 8 prezintă activitate antimicrobiană, fapt evidențiat prin lipsa celulelor viabile de *Salmonella enteritidis*, atât la nivelul segmentelor tractului intestinal, cât și în fecale.

RO 123277 B1

Revendicare

	1
Procedeu de izolare, selecție și conservare a unei tulpini probiotice de <i>Enterococcus faecium</i> , bacterie lactică pentru uz zootehnic, caracterizat prin aceea că:	3
- se izolează o tulpină de <i>Enterococcus faecium</i> prin realizarea de diluții seriale zecimale dintr-o probă de lapte fermentat care se însămânțează pe un mediu specific care cuprinde 1,0% lactoză, 1,0% bacto-triptonă, 0,5% extract de drojdie; 0,25% gelatină, 0,4% clorură de sodiu, 0,05% acid ascorbic, 1,5% agar-agar și 1% CaCO ₃ , cu pH 7,0, peste care se repartizează o peliculă de mediu specific semisolid cu 0,7% agar- agar și care se incubează timp de 24...72 h, la 37°C, rezultând colonii înconjurate de un halou transparent, cărora li se măsoară indicele de aciditate, iar din acestea se selectează colonii cu indice de aciditate I _a ≥2, care se repică de 3 ori pe un mediu având compoziția de mai sus, în scopul obținerii de clone pure care aparțin grupului de bacterii lactice,	5
- se caracterizează clonele pure rezultate prin teste de taxonomie polifazică și teste de analiză a sensibilității față de antibiotice și de analiză a capacității de aderență <i>in vitro</i> la celulele HeLa în prezența tulpinii patogene <i>Salmonella enteridis</i> , în scopul selectării unei clone pure de bacterie lactică <i>Enterococcus faecium</i> catalazo - negativă, microaerofilă, homofermentativă, care dezvoltă pe mediu specific colonii de tip S, are un interval optim de dezvoltare la pH cuprins între 7 și 8, la o temperatură cuprinsă între 28 și 42°C și o rezistență la NaCl până la o concentrație de 5%, fermentează riboza, L-arabinoza, manitol, lactoza, trehaloza și amidonul cu producere de acid, procentul molar de G+C reprezentând 37,53% din ADN-ul genomic, este rezistentă la aminoglicozidele amikacina, kanamicina, netilmicina, sisomicina, la cefalosporinele cefuroxim și ceftriaxonă, este sensibilă la glicopeptidele vancomicină și teicoplanină, prezintă un <i>pattern</i> de aderență difuz și capacitate de inhibare a aderenței celulelor de <i>Salmonella enteritidis</i> la substratul reprezentat de celulele eucariote și respectiv de blocare a internalizării celulelor patogene, și are efect antiinfecțios și antimicrobian față de celulele viabile de <i>Salmonella</i> , și care, în final,	7
- se conservă fie prin liofilizare, utilizând ca mediu protector un mediu care cuprinde 10,0% trehaloză, 1,0% sorbitol și 0,5% gelatină, fie prin crioconservare la -70°C, folosind ca mediu protector un mediu specific pentru cultivarea enterococilor conținând 20% glicerol.	9
	11
	13
	15
	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

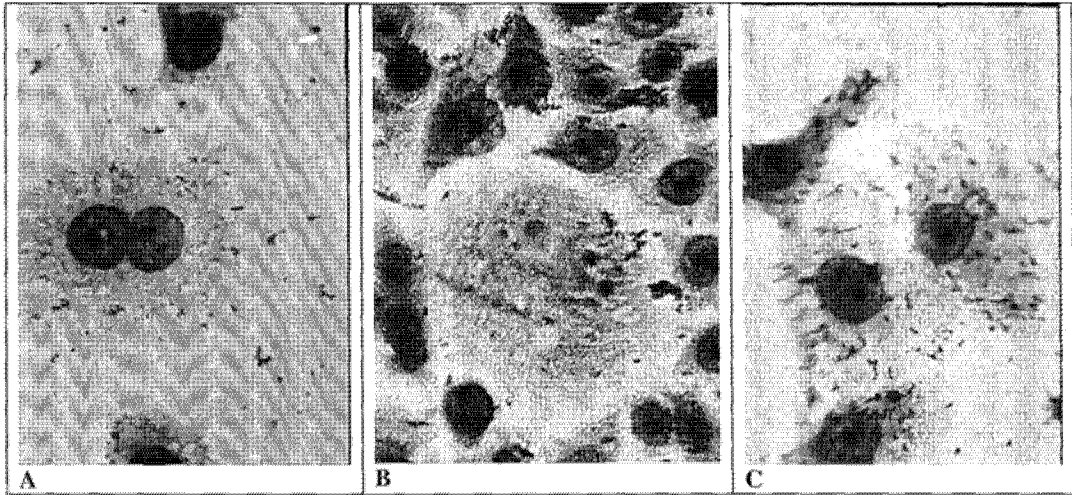


Fig. 1

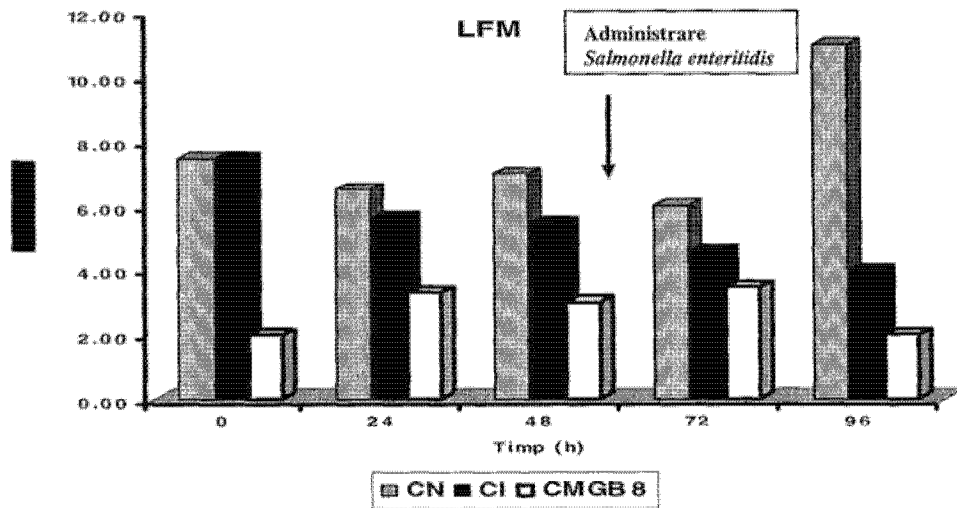


Fig. 2

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

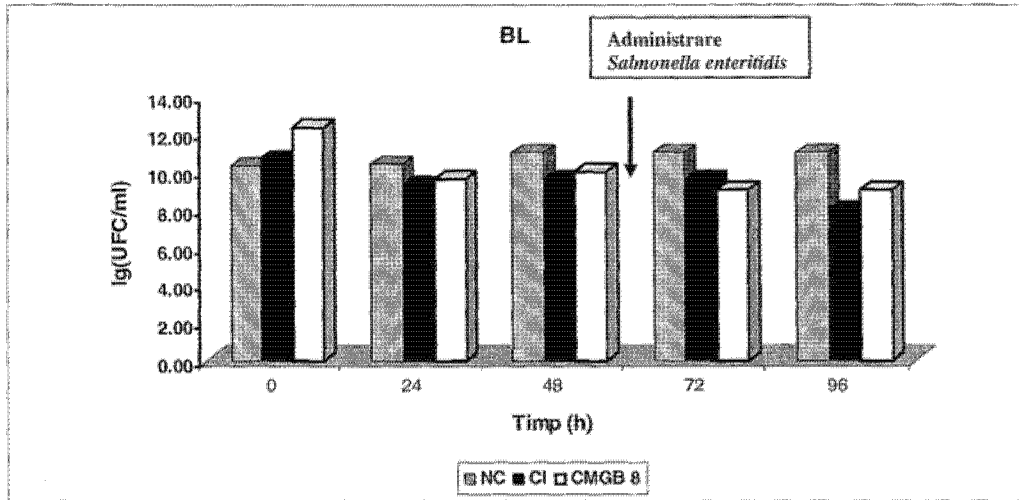


Fig. 3

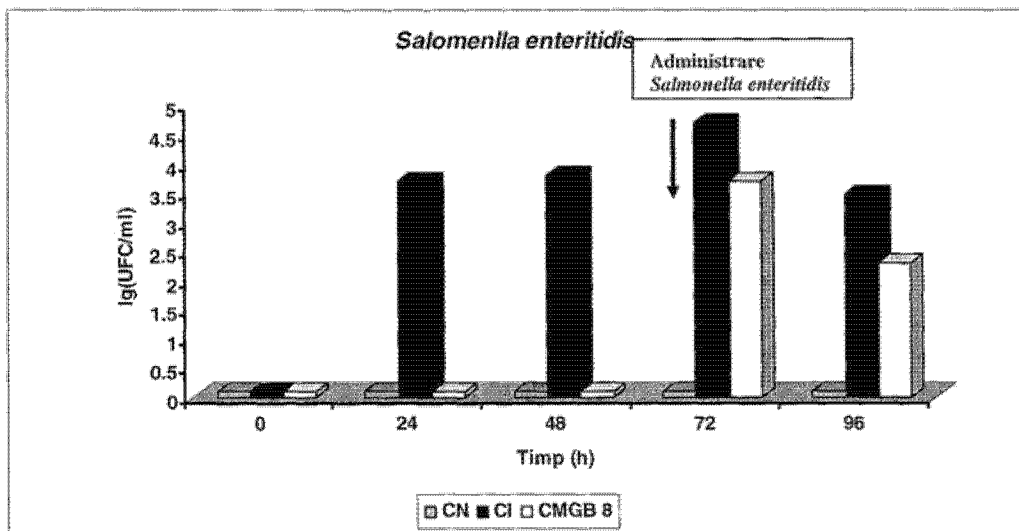


Fig. 4

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

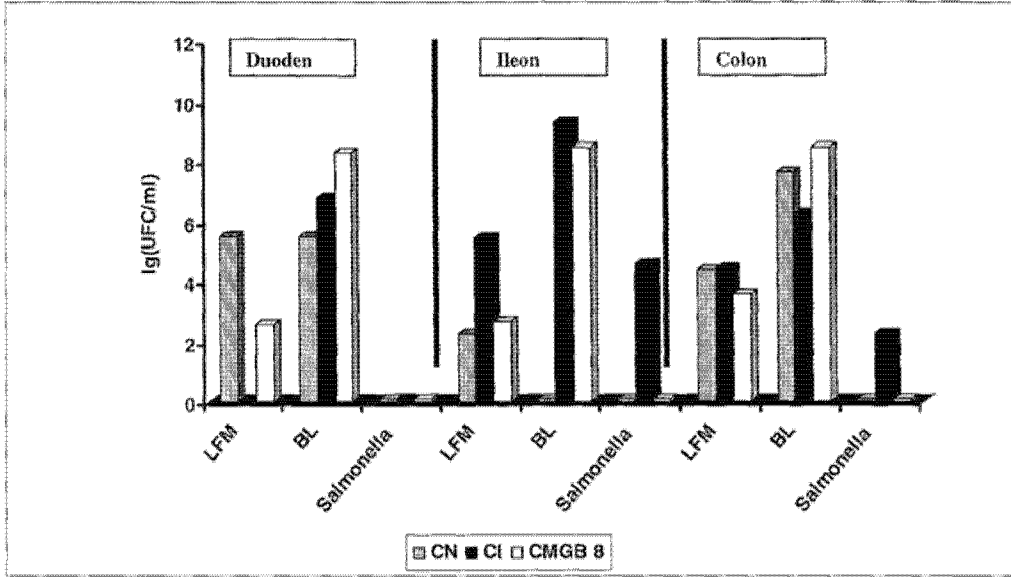


Fig. 5

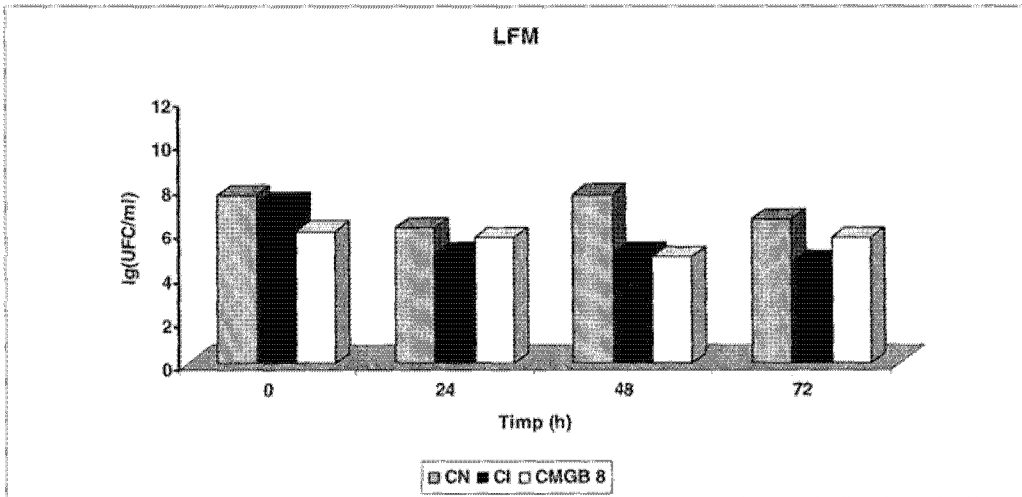


Fig. 6

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

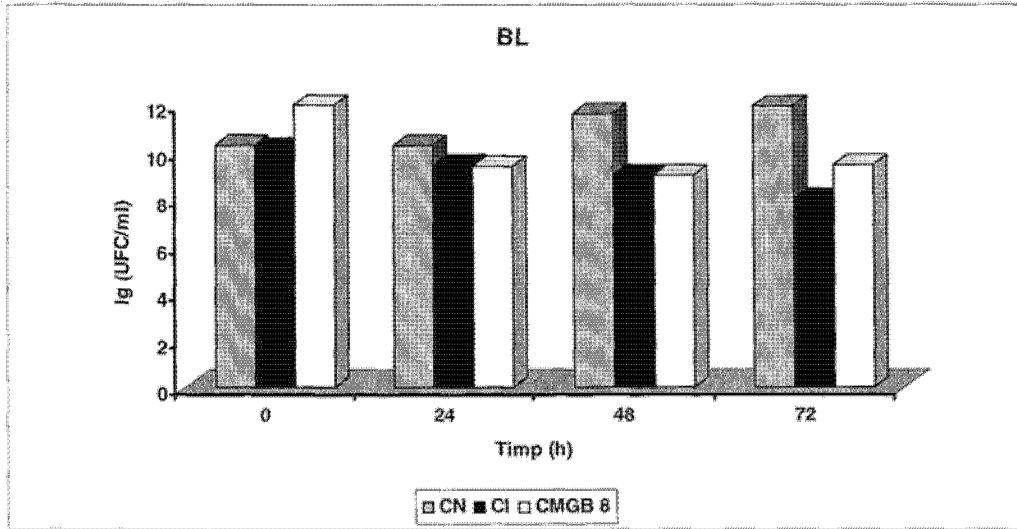


Fig. 7

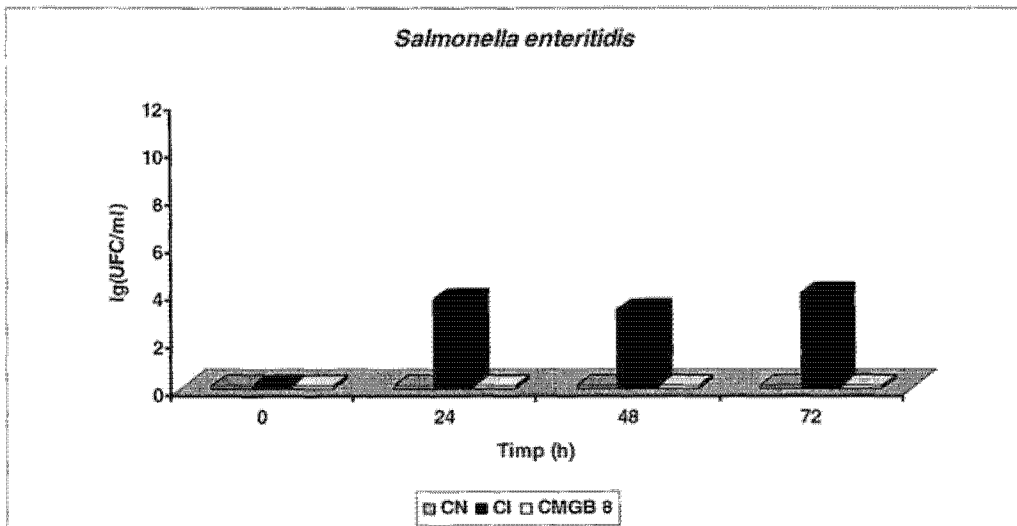


Fig. 8

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

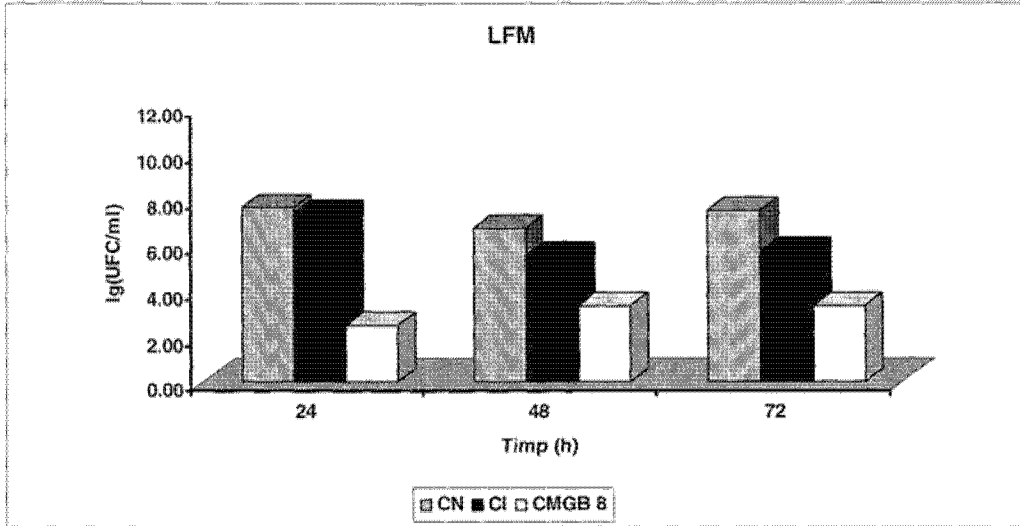


Fig. 9

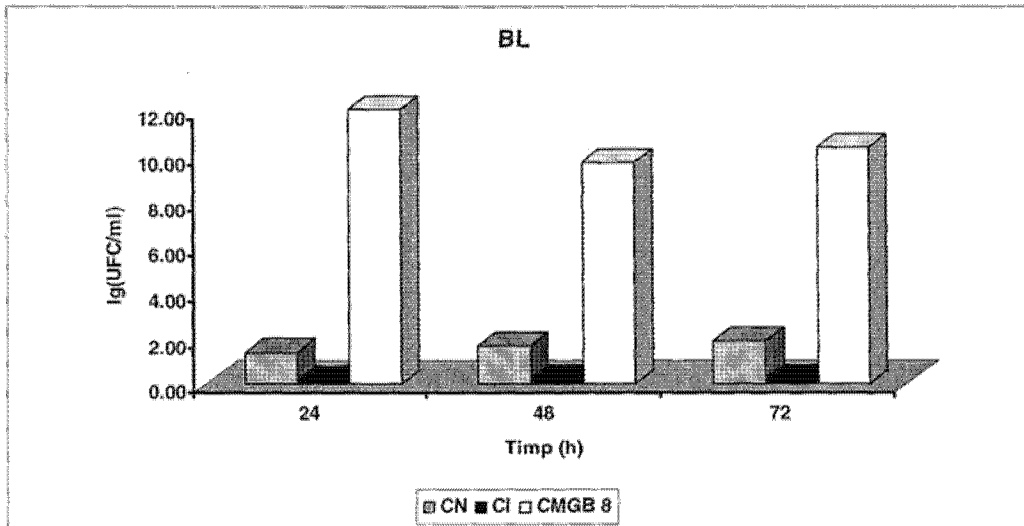


Fig. 10

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

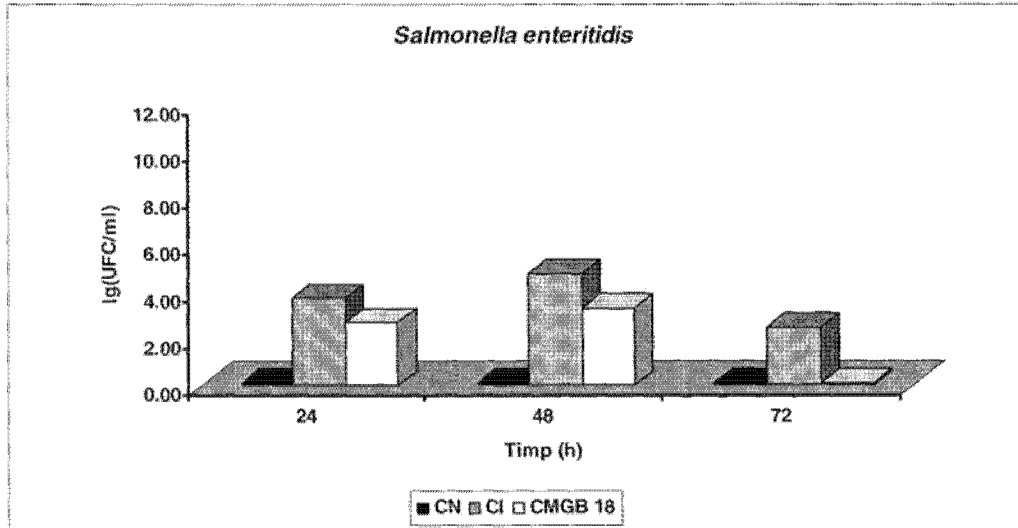


Fig. 11

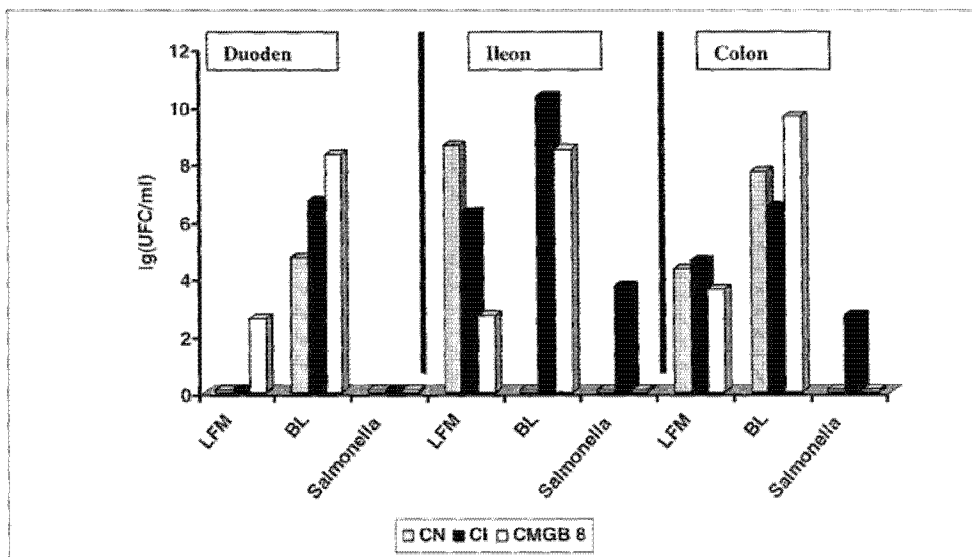


Fig. 12



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci