



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2007 00655

(22) Data de depozit: 18.09.2007

(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. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 36-46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• SĂSĂRMAN ELENA, BD. IULIU MANIU
NR. 158, BL. 37, SC. 2, ET. 2, AP. 50,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• CHIFIRIUC MARIANA-CARMEN,
STR. TUZLA NR. 1, BL. 11, SC. B, ET. 4,
AP. 56, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• PELINESCU DIANA-ROXANA,
STR. CRISTEA MATEESCU NR. 3, BL. T4B,
SC. 1, ET. 7, AP. 42, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;

• BLEOTU CORALIA,
ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5,
SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, 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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 112995 B1; KR 20020050048 A;
KR 20030060415 A

(54) **PROCEDEU DE IZOLARE, SELECȚIE ȘI CONSERVARE A
UNEI TULPINI PROBIOTICE DE *LACTOBACILLUS
PARACASEI* SSP. *PARACASEI*, BACTERIE LACTICĂ
PENTRU UZ UMAN**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de izolare, selecție și conservare a unei tulpini de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, care poate fi utilizată ca tulpină de tip probiotic, pentru uz uman, și care prezintă celule sub formă de cocobacili imobili, Gram pozitivi, este catalazo-negativă, microaerofilă, homofermentativă, dezvoltă pe mediu lichid specific colonii netede de tip S, rotunde, bombate, lenticulare, metabolizează glicerolul,

riboza, galactoză, glucoza, fructoza, manoză, manitolul, sorbitolul, N-acetilglucozamina, amidalina, arabutina, esculina, salicina, celobioza, maltoza, lactoza, trehaloza, gentiobioza, D-tagatoza, cu producerea de acid.

Revendicări: 1
Figuri: 14



RO 123278 B1

1 Prezența invenției se referă la un procedeu de izolare, selecție și conservare a unei
tulpini probiotice de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, bacterie lactică pentru uz uman.

3 Este cunoscut faptul că probioticele pentru nou-născuți și copii se administrează în
prezent în infecțiile intestinale în special în țările în curs de dezvoltare, diareea fiind
5 principala cauză a morbidității și mortalității.

Este cunoscut faptul că enterocolita necrotică - una dintre cele mai frecvente boli la
7 copii - provoacă o rată a mortalității cuprinsă între 20 și 30% și apare la aproximativ 25% din
copii născuți prematur. Incidența acestei boli scade considerabil dacă copiii sunt crescuți cu
9 lapte matern întrucât microbiota acestora conține în principal lactobacili și bifidobacterii.
Analizele efectuate la 25 copii sănătoși comparativ cu 23 bolnavi cu enterocolită necrotică
11 a evidențiat existența lactobacililor în microbiota intestinală în proporție de 48% comparativ
cu prezența acestora de 12% la cei bolnavi. Tulpinile de *Lactobacillus acidophilus* și
13 *Bifidobacterium infantis* acționează eficient în cazul dermatitelor alergice prin modularea
activității sistemului imunitar. Rata cazurilor de dermatită alergică a scăzut de la 46 la 23%
15 în cazul administrării de *Lactobacillus sp.* (Stefana Jurcoane, Petruta Cornea, Ileana Stoica,
Tatiana Vassu și alții, 2006, *Tratat de Biotehnologie*, volumul II, Editura Tehnică).

17 Răspunsul imun la nivelul tractului gastrointestinal este reprezentat de echilibrarea
de citokine proinflamatorii (exemplu interleukina-1, -6 și -8) și citokinele antiinflamatorii
19 (exemplu interleukina IRA, -4 și -10). Microorganismele probiotice pot influența starea de
sănătate a gazdei prin modularea acestei balanțe (Gabriela Perdigón, Roy Fuller and Raúl
21 Raya, 2001, *Lactic Acid Bacteria and their Effect on the Immune System*, Current Issues in
Intestinal Microbiology. 2(1): 27-42; brevet **US 6266829**, *Lactobacillus paracasei strain GM-*
23 *080 for treating allergy related diseases*).

Este cunoscut faptul că bacteriile lactice pot inhiba creșterea celulelor de
25 *Helicobacter pylori*, bacterie gram-negativă patogenă și prin aceasta pot determina scăderea
activității ureazei, enzimă necesară supraviețuirii bacteriilor în stomac (Reid, G., Jass, J.,
27 Sebulsky, M.T., McCormick, J.K., 2003, *Potential uses of probiotics in clinical practice*,
Clinical Microbiology Reviews, vol.16, p. 658-672; brevet **US 7090840**, *Lactobacillus*
29 *paracasei subsp. paracasei strain antibacterial against Helicobacter pylori and Escherichia*
coli 0157:h7.

31 O altă caracteristică importantă implicată în efectul probiotic a lactobacililor și
bifidobacteriilor este reprezentată de reducerea incidenței cancerului prin scăderea nivelului
33 de β -glucuronidază și de compuși carcinogeni. Astfel în cazul cancerului vezicii biliare
instalarea la nivel intestinal a microorganismelor probiotice cum ar fi *Lactobacillus casei*
35 Shirota reduce riscul apariției bolii.

Caracteristicile unui bun probiotic sunt: lipsa de patogenitate și toxicitate, capacitatea
37 de a supraviețui în mediul intestinal, de a exercita efecte benefice asupra organismului
gazdei, accesibilitatea din punct de vedere economic și capacitatea de a rămâne stabil după
39 tehnica de conservare (Matilla-Sandholm T., Blum S., Collins J.K., et al., 1999, *Probiotics:*
towards demonstrating efficacy, Trends Food Sci Technol. 10:393-399; Dunne, C.,
41 O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S.,
Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G.C., Shanahan F., Collins J. K., 2001, *In vitro*
43 *selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings*, Am.
J. Clin. Nutr. 73:386S-392S).

45 Există o serie de brevete și cereri de brevet care propun diverse procedee de izolare
a tulpinilor de *Lactobacillus sp.* Unul dintre acestea este **RO 112995 B1** care se referă la un
47 produs medicamentos care cuprinde *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*,
Lactobacillus plantarum și *Streptococcus lactis*. Obținerea tulpinii de *Lactobacillus casei*
49 presupune introducerea probei din care se dorește a se izola tulpina de lactobacili în mediu

RO 123278 B1

MRS lichid, urmată de termostatare la 37°C timp de 24...48 h, luarea cu ansa din acest mediu însămânțat și introducerea în 10 ml de apă peptonată 1‰ din care apoi se realizează diluții succesive până la diluția 6...7 din care 1 ml se introduce într-o placă Petri peste care se toarnă mediu MRS organizat la 45°C, după solidificarea mediului, placa Petri fiind termostată la 37°C timp de 48 h, în final izolându-se coloniile de *Lactobacillus casei*, ținând cont de aspectul specific al acestora, care apoi se introduc în mediu MRS.

Cererea de brevet **KR 20020050048** descrie izolarea și identificarea unei tulpini de *Lactobacillus* rezistente la acidul gastric și acizii biliari din materii fecale de câine, care presupune colectarea de probe din materii fecale de câine, cultivarea probelor diluate pe mediu Man-Rogosa-Sharpe (MRS) la 37°C, pentru 24...48 h, tratarea coloniilor rezultate cu suc gastric simulat și soluție de acid biliar simulat și împărțirea acestora pe mediu MRS, selectarea unei bacterii lactice având activitate terapeutică a tulburărilor intestinale, *in vitro* și *in vivo*, îmbunătățită, și efecte de inhibare a creșterii bacteriilor patogene precum *E. Coli* și *Salmonella sp.*

Cererea de brevet **KR 200230060415** descrie o tulpină de *Lactobacillus sp.* care reduce colesterolul seric și din gălbenușul de ou la găini.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a izola o tulpină de bacterie lactică de origine umană, de tip probiotic, care permite reducerea semnificativă a duratei bolii și înlăturarea efectelor secundare, precum și îmbunătățirea stării de sănătate a pacienților.

Soluția pe care o propune prezenta invenție la problema tehnică menționată constă în aceea că se obține o tulpină de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* prin realizarea de diluții seriale zecimale dintr-o probă de materii fecale de copil nou-născut, recoltate înainte de întărcare, care se însămânțează pe mediu specific Man-Rogosa-Sharpe (MRS) care cuprinde 1,0% peptonă, 0,5% extract de carne, 0,5% extract de drojdie, 2,0% glucoză, 0,2% fosfat bipotasic, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% sulfat de magneziu, 0,05% sulfat de mangan, 1,5% agar-agar; 1,0% carbonat de calciu, cu pH 6,5, peste care se repartizează o peliculă de mediu semisolid Man-Rogosa-Sharpe cu 0,7% agar- agar și care se incubează timp de 48 h, la 37°C, rezultând colonii înconjurate de un halou transparent, dintre care se selectează colonii cu indice de aciditate I_a cuprins între 2 și 3, 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, se caracterizează clonele pure obținute prin teste de taxonomie polifazică, prin teste de analiză a sensibilității față de antibiotice, a capacității de scădere a concentrației colesterolului, a producerii de compuși cu acțiune antimicrobiană față de tulpini aparținând speciilor *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* și *Enterobacter cloacae*, a capacității de imunomodulare și prin teste *in vivo* a efectului antiinfecțios și antimicrobian față de celulele viabile de *Salmonella*, în scopul selectării unei clone pure de bacterie lactică *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, catalazo-negativă, microaerofilă, homofermentativă, care dezvoltă pe mediu specific colonii de tip S, rotunde, bombate, lenticulare, are un interval optim de dezvoltare la pH cuprins între 6,5 și 8,5, la o temperatură cuprinsă între 28 și 42°C și o rezistență la NaCl până la o concentrație de 5%, metabolizează glicerolul, riboza, galactoza, glucoza, fructoza, manoza, manitolul, sorbitolul, N-acetilglucozamina, amigdalina, arabutina, esculina, salicina, celobioza, maltoza, lactoza, trehaloza, gentiobioza, D-tagatoza, procentul molar de G+C reprezentând 54,38% din ADN-ul genomic, este rezistentă la oxacilină, cefoxitină, kanamicină, eritromicină și teicoplanină, și sensibilă la cefuroxim, ceftioxonă, piperacilină, amoxicilină și vancomicină, prezintă capacitate de scădere a concentrației colesterolului, determină *in vivo* eliminarea rapidă a celulelor patogene în fecale simultan cu scăderea ratei de colonizare a microorganismului patogen, exercită efect imunomodulator prin generarea unui nivel ridicat al secreției de citokine proinflamatorii IL-1, IL-2, IL-6, iar în final, se conservă clona pură selecționată, fie prin liofilizare, utilizând ca mediu protector un mediu care cuprinde 2,0% sucroză, 1,0% sorbitol și 1,0% gelatină, fie prin crioconservare la -70°C, folosind ca mediu protector un mediu pentru cultivarea lactobacililor conținând 20% glicerol.

1 Procedeul conform invenției permite obținerea unei tulpini de *Lactobacillus paracasei*
2 *ssp. paracasei* izolată dintr-o nișă ecologică specifică (materii fecale de copil nou-născut,
3 recoltate înainte de înțarcare) caracterizată printr-o activitate antimicrobiană, capacitate de
4 imunomodulare și rezultatele testelor *in vivo* prin care se atestă caracterul probiotic și care
5 o recomandă ca o tulpină de tip probiotic pentru uz uman.

6 Procedeul conform invenției constă în aceea că se obține o tulpină de bacterie lactică
7 prin izolarea dintr-o nișă ecologică specifică (materii fecale de nou-născut), care se caracte-
8 rizează prin teste de taxonomie polifazică, fiind încadrată în specia *Lactobacillus paracasei*
9 *ssp. paracasei*, și este conservată timp îndelungat prin liofilizare și crioconservare la -70°C.
10 Caracterul de tip probiotic al tulpinii este atestat de *pattern*-ul de antibiosensibilitate, activi-
11 tatea antimicrobiană și capacitatea de imunomodulare. Studiile *in vivo* au demonstrat elimi-
12 narea în materiile fecale ale animalelor de experiență a tulpinilor patogene *Salmonella*
13 *enteritidis*, reducerea eliminării microbiotei normale, creșterea numărului de bacterii lactice
14 și eliminarea microorganismului patogen în fecale. Efectul imunomodulator se manifestă prin
15 stimularea secreției de citokine proinflamatorii.

16 Procedeul conform invenției conduce la următoarele avantaje:

17 - izolează și identifică o tulpină nouă de tip probiotic de uz uman care prezintă rezis-
18 tență multiplă la compuși antimicrobieni, prin aceasta putând fi administrată în tratamentul
19 cu antibiotice în bolile infecțioase, o activitate antimicrobiană față de tulpini patogene, un
20 efect imunomodulator pronunțat prin stimularea secreției de citokine proinflamatorii, deter-
21 mină eliminarea rapidă a celulelor de tip patogen în fecale simultan cu scădere ratei de
22 colonizare a microorganismului patogen.

23 Se prezintă în continuare 6 exemple de realizare a invenției în legătură cu figurile:

24 - Fig. 1: Viteza de consum a colesterolului cu tulpina *Lb. paracasei ssp. paracasei*
25 *CMGB 18*.

26 - Fig. 2: *Pattern*-ul citokinelor în cazul utilizării limfocitelor normale ca substrat.

27 - Fig. 3: *Pattern*-ul citokinelor în cazul utilizării celulelor neimune aderente ca substrat.

28 - Fig. 4: Reprezentarea comparativă a numărului de microorganisme viabile lactozo-
29 fermentative (LFM) eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ;
30 CI - controlul cu infecție; CMGB 18 - administrare profilactică a tulpinii *Lactobacillus*
31 *paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 (trei zile înainte de infecția cu *Salmonella enteritidis*).

32 - Fig. 5: Reprezentarea comparativă a numărului de bacterii lactice (BL) viabile
33 eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ; CI - controlul cu
34 infecție; CMGB 18 - administrare profilactică a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*
35 *CMGB 18* (trei zile înainte de infecția cu *Salmonella enteritidis*).

36 - Fig. 6: Reprezentarea comparativă a numărului de celule de *Salmonella enteritidis*
37 viabile eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ; CI - controlul
38 cu infecție; CMGB 8 - administrare profilactică a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp.*
39 *paracasei* CMGB 18 (trei zile înainte de infecția cu *Salmonella enteritidis*).

40 - Fig. 7: Reprezentarea comparativă a numărului de microorganisme viabile lactozo-
41 fermentative (LFM), bacterii lactice (BL), *Salmonella enteritidis* la nivelul diferitelor segmente
42 ale tractului digestiv la diferite loturi experimentale. CN - control negativ; CI - controlul cu
43 infecție; CMGB 18 - administrare profilactică a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*
44 *CMGB 18* (trei zile înainte de infecția cu *Salmonella enteritidis*).

45 - Fig. 8: Reprezentarea comparativă a numărului de microorganisme viabile lactozo-
46 fermentative (LFM) eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ;
47 CI - controlul cu infecție; CMGB 18 - administrare simultană a tulpinii *Lactobacillus paracasei*
ssp. paracasei CMGB 18 cu *Salmonella enteritidis*.

RO 123278 B1

- Fig. 9: Reprezentarea comparativă a numărului de bacterii lactice (BL) viabile eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ, CI - controlul cu infecție și CMGB 18 - administrare simultană a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 cu *Salmonella enteritidis*. 1
3

- Fig. 10: Reprezentarea comparativă a numărului de celule *Salmonella enteritidis* viabile eliminate în fecale. CN - control negativ, CI - controlul cu infecție și CMGB 18 - administrare simultană a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 cu *Salmonella enteritidis*. 5
7

- Fig. 11: Reprezentarea comparativă a numărului de microorganisme viabile lactozofermentative (LFM) eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ, CI - controlul cu infecție și CMGB 18 - administrare terapeutică a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 (24 h de la infecția cu *Salmonella enteritidis*). 9
11

- Fig. 12: Reprezentarea comparativă a numărului de bacterii lactice (BL) viabile eliminate în fecale la diferite loturi experimentale. CN - control negativ, CI - controlul cu infecție și CMGB 18 - administrare terapeutică a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 (24 h de la infecția cu *Salmonella enteritidis*). 13
15

- Fig. 13: Reprezentarea comparativă a numărului de celule *Salmonella enteritidis* viabile eliminate în fecale. CN - control negativ, CI - controlul cu infecție și și CMGB 18 - administrare terapeutică a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 (24 h de la infecția cu *Salmonella enteritidis*). 17
19

- Fig. 14: Reprezentarea comparativă a numărului de microorganisme viabile lactozofermentative (LFM), bacterii lactice (BL), *Salmonella enteritidis* la nivelul diferitelor segmente ale tractului digestiv la diferite loturi experimentale. CN - control negativ, CI - controlul cu infecție și CMGB 18 - administrare terapeutică a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 (24 h de la infecția cu *Salmonella enteritidis*). 21
23
25

Exemplul 1. Izolarea și identificarea tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*

Izolarea tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* s-a efectuat dintr-o probă de materii fecale provenită de la un nou-născut hrănit cu lapte matern, în anul 2004. În acest scop, 10 g de materie fecală au fost introduse în 10 ml ser fiziologic steril (0,9 NaCl), realizându-se în continuare diluții seriale zecimale. 27
29

Pentru obținerea de colonii izolate, câte 0,1 ml din fiecare diluție au fost dispersate pe suprafața unui mediu specific (repartizat în plăci Petri), de următoarea compoziție, g%: peptonă 1,0; extract de carne 0,5; extract de drojdie 0,5; glucoză 2,0; fosfat bipotasic 0,2; acetat de sodiu 0,5; sulfat de magneziu 0,1; sulfat de mangan 0,05; agar-agar 1,5; carbonat de calciu 1,0 (sterilizat separat și adăugat înainte de repartizarea mediului în plăci Petri), pH 6,5. Pentru crearea condițiilor de microanaerobioză pe suprafața mediului însămânțat s-au turnat 3 ml mediu semisolid cu 0,7% agar-agar având compoziția de mai sus. Plăcile au fost incubate timp de 48 h la 37°C, iar coloniile care au prezentat un halou clar în jurul lor au fost măsurate (diametrul total și diametrul coloniei) pentru determinarea indicelui de acidifiere (I_a), care se recomandă a fi $\geq 1,5$. 31
33
35
37
39

$$I_a = \Phi_{\text{total}} / \Phi_{\text{colonie}} \geq 1,5$$

Examinarea plăcilor după 48 h a evidențiat prezența, cu precădere, a unui singur tip de colonie crem, bombată, lucioasă. Un număr de 15 colonii care au prezentat un I_a cuprins între 2 și 3 au fost repicate pe mediul lichid de mai sus, obținându-se stocul inițial de clone pure. Pentru o selecție riguroasă, clonele au fost purificate de 3 ori. Investigațiile preliminare privind aspectul microscopic și caracterul gram pozitiv, I_a și reacția catalazo-negativă au constituit premisele apartenenței clonelor pure grupului de bacterii lactice. Din totalul clonelor pure a fost selecționată, o clonă pură de bacterie lactică care a fost identificată comparativ cu o tulpină de referință (tabelul 1). 41
43
45
47
49
51

RO 123278 B1

Tabelul 1

Identificarea tulpinii *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CMGB 18, efectuată cu kitul API 50CHL

Tub	Substrat	Tulpini de bacterii lactice	
		<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> NCFB 206	Clona pură
0	Control	-	-
1	Glicerol	-	+
2	Eritrol	-	-
3	D. Arabinoză	-	-
4	L. Arabinoză	-	-
5	Riboză	+	+
6	D. Xiloză	-	-
7	L. Xiloză	-	-
8	Adonitol	-	-
9	β -metil-D-xifozidă	-	-
10	Galactoză	+	+
11	Glucoză	+	+
12	Fructoză	+	+
13	Manoză	+	+
14	Sorboză	-	-
15	Ramnoză	-	-
16	Dulcitol	+	-
17	Inozitol	-	-
18	Manitol	+	+
19	Sorbitol	+	+
20	α -metil-D-Manozidă	-	-
21	α -metil-D-Glucozidă	+	-
22	N-acetil-glucozamină	+	+
23	Amigdalină	v	+
24	Arabutină	+	+
25	Esculină	+	+
26	Salicină	+	+
27	Celobioză	+	+
28	Maltoză	+	+
29	Lactoză	-	+

Tabelul 1 (continuare)

Tub	Substrat	Tulpini de bacterii lactice	
		<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i> NCFB 206	Clona pură
31	Sucroză	+	-
32	Trehaloză	+	+
33	Inulină	+	-
34	Melezitoză	+	-
35	Rafinoză	-	-
36	Amidon	-	-
37	Glicogen	-	-
38	Xilitol	-	-
39	Gentiobioză	v	+
40	D-Turanoză	+	-
41	D-Lixoză	-	-
42	D-tagatoză	+	+
43	D-Fucoză	-	-
44	L-Fucoză	-	-
45	D-Arabitol	-	-
46	L-Arabitol	-	-
47	Gluconat	v	-
48	2-ceto-gluconat	-	-
49	5-ceto-gluconat	-	-
încadrarea taxonomică preliminară			<i>Lh. paracasei ssp. paracasei</i>

Conform rezultatelor obținute, tulpina izolată poate fi încadrată în specia *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18, având următoarele caracteristici: bacili dispuși izolați, în diplo sau în lanțuri scurte, gram pozitivi, imobili, tulpina este catalazo-negativă, homofermentativă, formând pe mediu specific solidificat colonii de tip "smooth" (S), mari, bombate, lenticulare de culoare crem. Fermentează glicerolul, riboza, galactoza, glucoza, fructoza, manoza, manitolul, sorbitolul, N-acetilglucozamina, amigdalina, arabutina, esculina, salicina, celobioza, maltoza, lactoza, trehaloza, gentiobioza, D-tagatoza.

Rezultatele obținute cu kitul API 50CHL au fost interpretate cu ajutorul unui software specializat de identificare API Web, prin care clona pură izolată prezintă o similitudine de 96,9% cu specia *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* și de 2% cu specia *Lactococcus lactis ssp. lactis*.

Procentul molar de G+C este de 54,38 (G=guanină, C=citozină).

Tulpina prezintă un pH optim de dezvoltare între 6,5 și 8,5, temperatura între 28 și 42°C, rezistență la NaCl până la o concentrație de 5%. Tulpina de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* izolată prezintă rezistență la sărurile biliare, produce hidrogen sulfurat și nu reduce sărurile de tetrazoliu.

RO 123278 B1

1 Coroborarea rezultatelor obținute cu testul API 50 CHL și a caracteristicilor morfofizio-
2 logice a permis încadrarea tulpinii în specia *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* și a fost
3 introdusă în Colecția de Culturi a Centrului de Cercetare, Formare și Consultanță în
4 Microbiologie, Genetică și Biotehnologie (MICROGEN) cu acronimul CMGB 18 și depozitată
5 în Colecția de Microorganisme Industriale a Institutului de Cercetare Dezvoltare Chimico -
6 Farmaceutică (CMI-ICCF-WFCC) sub numărul ICCF 388.

7 Este cunoscut faptul că tulpinile lactice sunt conservate frecvent pe medii lichide, fapt
8 care impune transferuri periodice care pot favoriza inducerea unor modificări genetice
9 nedorite. Acest dezavantaj a fost înlăturat prin aplicarea a două tehnici de conservare:
10 conserv liofilizat și conservare la -70°C . Conservul liofilizat a fost realizat prin folosirea ca
11 mediu protector, g%: sucroză 2,0, sorbitol 1,0, gelatină 1,0. Timpul de valabilitate al conser-
12 vului este de peste 25 de ani conform datelor din literatura de specialitate (Ileana Stoica și
13 alții, 2002).

14 Conservarea prin congelare la -70°C s-a efectuat folosind ca mediu protector, mediu
15 specific de cultivare a lactobacililor, menționat mai sus la care s-a adăugat 20% glicerol.
16 Valabilitatea conservului este aproximativ 10 ani conform datelor din literatura de specialitate
17 (Ileana Stoica și alții, 2002).

18 Evaluarea proprietăților biotehnologice ale tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp.*
19 *paracasei* CMGB 18 izolată și selecționată în scopul evidențierii caracterului probiotic este
20 demonstrată de exemplele următoare.

21 **Exemplul 2. Metabolizarea colesterolului**

22 Metabolizarea colesterolului, caracteristică importantă a bacteriilor lactice de tip
23 probiotic, a fost experimentată într-o primă etapă prin cultivarea tulpinii de *Lb. paracasei ssp.*
24 *paracasei* CMGB 18 pe mediu specific indicat mai sus (martor) și mediu cu adaos de
25 0,05 mg/ml colesterol. Estimarea dezvoltării s-a făcut prin determinarea UFC/ml (unități
26 formatoare de colonii) la timpul 0 și la 24 h, observându-se o creștere a numărului de celulele
27 cu de peste 2 ordine de mărime ($1,8 \times 10^7$ respectiv $2,87 \times 10^9$) comparativ cu martorul ($2,0 \times 10^7$
28 respectiv $4,1 \times 10^8$).

29 În a doua etapă s-a determinat în aceleași condiții de cultivare viteza de consum a
30 colesterolului pe o perioadă de 72 h prin dozarea acestuia cu reactiv specific (DIALAB) și
31 citirea absorbanței la spectrofotometru la lungimea de undă de 500 nm. Rezultatele
32 prezentate în fig. 1 demonstrează un consum lent de colesterol în primele 24 h - acumularea
33 de biomasă realizându-se în perioada de creștere *log* prin metabolizarea sursei de carbon
34 ușor asimilabile glucoza - urmată apoi de o scădere treptată a concentrației din mediu până
35 la o valoare de aproximativ 6 ori la 72 h.

36 **Exemplul 3. Sensibilitatea la substanțe antimicrobiene**

37 Sensibilitatea la substanțe antimicrobiene (antibiograma) s-a realizat folosind metoda
38 difuzimetrică (Kirby-Bauer) cu discuri standardizate OXOID impregnate cu antibiotic.
39 Rezistența multiplă naturală a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 la
40 diferite clase de compuși antimicrobieni (tabelul 2) reprezintă un avantaj, deoarece
41 preparatul probiotic obținut cu această tulpină poate fi administrat împreună cu substanțele
42 antimicrobiene în tratamentul bolilor infecțioase, prin aceasta restabilind microbiota
43 normală. Astfel tulpina prezintă rezistență la oxacilină și cefoxitină (din clasa b lactamice),
44 kanamicină (din clasa aminoglicozidelor), eritromicină (clasa macrolidelor) și teicoplanină
45 (clasa glicoproteinelor). Prezintă de asemenea sensibilitate față de cefuroxim și ceftiaxonă
46 (clasa cefalosporinelor), piperacilină și amoxicilină (clasa b lactamice) și vancomicină (clasa
47 glicopeptidelor).

Spectrul de sensibilitate la diferiți compuși antimicrobieni al tulpinii de Lactobacillus paracasei ssp. paracasei CMGB 18

COMPUȘI ANTIMICROBIENI	Oxacilină	Cefuroxim	Ceftiazonă	Kanamicină	Cefoxitină	Piperacilina	Amoxicilina	Vancomicina	Teicoplanin	Eritromicina
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei CMGB 18</i>	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R

Exemplul 4. Activitatea antimicrobiană

În scopul investigării activității antimicrobiene a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18, filtratul tulpinii probiotice a fost testat față de 82 de tulpini de enterobacterii izolate de pe diferitele obiecte din mediu spitalicesc. Tulpinile microbiene patogene au fost însămânțate în pânză, iar filtratul culturii de probiotic ca atare și inactivat termic la 100°C cu un pH ajustat la 6,5 a fost testat prin pipetarea a câte 5 μl pe medii însămânțate în pânză cu tulpinile de enterobacterii.

Rezultatele au demonstrat activitatea antimicrobiană față de 6 tulpini de enterobacterii: patru tulpini de *Escherichia coli*, o tulpină de *Klebsiella pneumoniae* și o tulpină de *Enterobacter cloacae*. Activitatea antimicrobiană s-a păstrat și după inactivarea la 100°C și ajustarea pH-ului la 6,5.

Exemplul 5. Activitatea de modulare imunitară

Pentru determinarea influenței tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 asupra modurii sistemului imunitar, limfocitele normale și respectiv celulele neimune aderente (HeLa) au fost tratate (incubare 24 h la 37°C) cu supernatant obținut prin centrifugarea culturii de tulpină probiotică în fază logaritmică de creștere. Determinarea cantității de interleukine produse de celulele limfocitare normale și de celulele HeLa s-a realizat cu ajutorul unor truse Endogen Human ELISA Kit (Pierce Biotechnology, Inc).

Filtratul de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 a indus *pattern* de citokine pe celulele imunitare (celule limfocitare normale) diferit față de cel obținut de celulele neimune aderente (celule HeLa) astfel:

- pe celulele limfocitare s-a observat o represiune a producerii de interleukine IL-1, IL-2, IL-6 și IL-10, precum și o stimulare medie de IL-8 (fig. 2) raportat la nivelul de interleukine obținut prin stimulare cu antigene solubile de *Pseudomonas aeruginosa* și *Staphylococcus aureus*;

- pe celulele HeLa s-a observat o stimulare maximă a producerii de IL-8 și o stimulare medie a sintezei de IL-2 și IL-6 comparativ cu cea indusă de antigenele solubile de *Pseudomonas aeruginosa* și *Staphylococcus aureus* (fig. 3).

Exemplul 6. Studii in vivo

Studiul *in vivo* al eficienței tulpinii de tip probiotic *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 selecționate pentru rezistență multiplă față de compuși antimicrobieni, activitatea antimicrobiană, precum și după caracterul imunomodulator, s-a urmărit pe un model experimental care a utilizat animale de laborator (șobolani convenționali). Efectul benefic al tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 a constat în evidențierea interacțiunilor cu microorganismul patogen *Salmonella enteritidis*.

RO 123278 B1

A. În cazul administrării profilactice a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18

S-a observat faptul că are loc:

- Scăderea numărului de microorganisme lactozo-fermentative eliminate în fecale (fig. 4) 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 *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18, ceea ce indică abilitatea tulpinii probiotice de a se lega la situsurile de aderență de la nivelul mucoasei intestinale (fig. 5). 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 gastro-intestinal (fig. 7) care este mai mare la lotul cu probiotic față de controlul negativ.

- În același timp se observă faptul că administrarea profilactică a tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 conduce la scăderea numărului de celulele viabile de *Salmonella enteritidis* eliminate în fecale comparativ cu lotul infectat (CI) (fig. 6) și la absența totală a celulelor microorganismului patogen la nivelul segmentelor tractului gastrointestinal (fig. 7) ceea ce indică acțiunea inhibitorie exercitată de tulpina de bacterie lactică asupra celulelor de *Salmonella enteritidis*.

- Analiza compoziției microbiotei de la nivelul segmentelor tractului gastrointestinal indică faptul că administrarea tulpinii de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 determină scăderea numărului de microorganisme lactozofermentative și la nivelul celor trei segmente ale tractului digestiv (duoden, ileon, colon) (fig. 7). Aceste rezultate demonstrează că tulpinile de bacterii lactice administrate profilactic au un efect bactericid asupra microorganismelor din microbiota normală.

B. În cazul administrării tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 simultan cu infecția cu *Salmonella enteritidis*

S-a evidențiat faptul că are loc:

- scăderea numărului de microorganisme lactozo-fermentative eliminate în fecale (fig. 8) ca și în cazul administrării profilactice a bacteriilor lactice;

- menținerea relativ constantă până la 48 h a numărului bacteriilor lactice eliminate în fecale și o scădere cu aproximativ două ordine de mărime la 72 h (comparativ cu lotul martor negativ) (fig. 9);

- reducerea numărului celulelor de *Salmonella enteritidis* din fecale la 72 h (fig. 10).

În ceea ce privește distribuția microorganismelor la nivelul diferitelor segmente ale tractului intestinal (tabelul 3) 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.

Tabelul 3

Numărul de microorganisme viabile lactozo-fermentative (LFM), bacterii lactice (BL) și *Salmonella* la nivelul diferitelor segmente ale tractului intestinal, în cazul administrării tulpinii *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* CMGB 18 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	7×10^6	0	0	0	10^2	0	6×10^7	5×10^4	0
Control cu infecție	7×10^7	0	0	10^9	10^5	1×10^4	2×10^7	10^4	2×10^2
CMGB 18	10^8	0	0	10^6	0	0	6×10^8	0	0

RO 123278 B1

C. În cazul administrării terapeutice a tulpinii probiotice după 24 h de la infecția cu <i>Salmonella</i>, rezultatele sunt similare cu cele obținute în cazul administrării probioticului simultan cu infecția, și anume:	1
- numărul de celule lactozofermentative în fecale scade până la 48 h, urmat de o creștere a acestora la 72 h (fig. 11);	3
- numărul de bacterii lactice prezente în fecale rămâne constant pe tot parcursul experimentului (fig. 12);	5
- crește numărul de celule de <i>Salmonella</i> eliminate în fecale la 48 h, iar la 72 h nu au mai fost evidențiate celule viabile ale microorganismului patogen (fig. 13);	7
- la nivelul segmentelor intestinale se observă un număr mare de bacterii lactice, iar <i>Salmonella</i> este absentă în cazul administrării probioticelor (fig. 14).	9
	11

RO 123278 B1

Revendicare

1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
35
37

Procedeu de izolare, selecție și conservare a unei tulpini probiotice de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, bacterie lactică pentru uz uman, **caracterizat prin aceea că:**

- se izolează o tulpină de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* prin realizarea de diluții seriale zecimale dintr-o probă de materii fecale de copil nou-născut, recoltate înainte de înțârcare, care se însămânțează pe mediu specific Man-Rogosa-Sharpe (MRS) care cuprinde 1,0% peptonă, 0,5% extract de carne, 0,5% extract de drojdie, 2,0% glucoză, 0,2% fosfat bipotasic, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% sulfat de magneziu, 0,05% sulfat de mangan, 1,5% agar-agar; 1,0% carbonat de calciu, cu pH 6,5, peste care se repartizează o peliculă de mediu semisolid Man-Rogosa-Sharpe cu 0,7% agar-agar și care se incubează timp de 48 h, la 37°C, rezultând colonii înconjurate de un halou transparent, dintre care se selectează colonii cu indice de aciditate I_a cuprins între 2 și 3, 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,

- se caracterizează clonele pure obținute prin teste de taxonomie polifazică, prin teste de analiză a sensibilității față de antibiotice, a capacității de scădere a concentrației colesterolului, a producerii de compuși cu acțiune antimicrobiană față de tulpini aparținând speciilor *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* și *Enterobacter cloacae*, a capacității de imunomodulare și prin teste *in vivo* a efectului antiinfecțios și antimicrobian față de celulele viabile de *Salmonella* în scopul selectării unei clone pure de bacterie lactică *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, catalazo-negativă, microaerofilă, homofermentativă, care dezvoltă pe mediu specific colonii de tip S, rotunde, bombate, lenticulare, are un interval optim de dezvoltare la pH cuprins între 6,5 și 8,5, la o temperatură cuprinsă între 28 și 42°C și o rezistență la NaCl până la o concentrație de 5%, metabolizează glicerolul, riboza, galactoza, glucoza, fructoza, manoza, manitolul, sorbitolul, N-acetilglucozamina, amigdalina, arabutina, esculina, salicina, celobioza, maltoza, lactoza, trehaloza, gentiobioza, D-tagatoza, procentul molar de G+C reprezentând 54,38% din ADN-ul genomic, este rezistentă la oxacilină, cefoxitină, kanamicină, eritromicină și teicoplanină, și sensibilă la cefuroxim, ceftiaxonă, piperacilină, amoxicilină și vancomicină, prezintă capacitate de scădere a concentrației colesterolului, determină *in vivo* eliminarea rapidă a celulelor patogene în fecale simultan cu scăderea ratei de colonizare a microorganismului patogen, exercită efect imunomodulator prin generarea unui nivel ridicat al secreției de citokine proinflamatorii IL-1, IL-2, IL-6, iar în final,

- se conservă clona pură selecționată fie prin liofilizare, utilizând ca mediu protector un mediu care cuprinde 2,0% sucroză, 1,0% sorbitol și 1,0% gelatină, fie prin crioconservare la -70°C, folosind ca mediu protector un mediu pentru cultivarea lactobacililor conținând 20% glicerol.

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

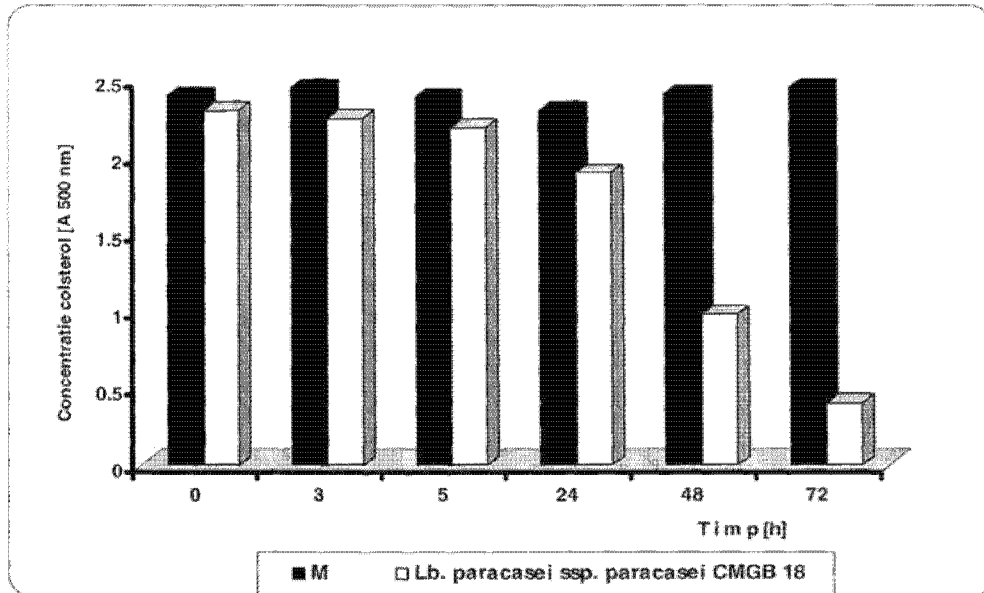


Fig. 1

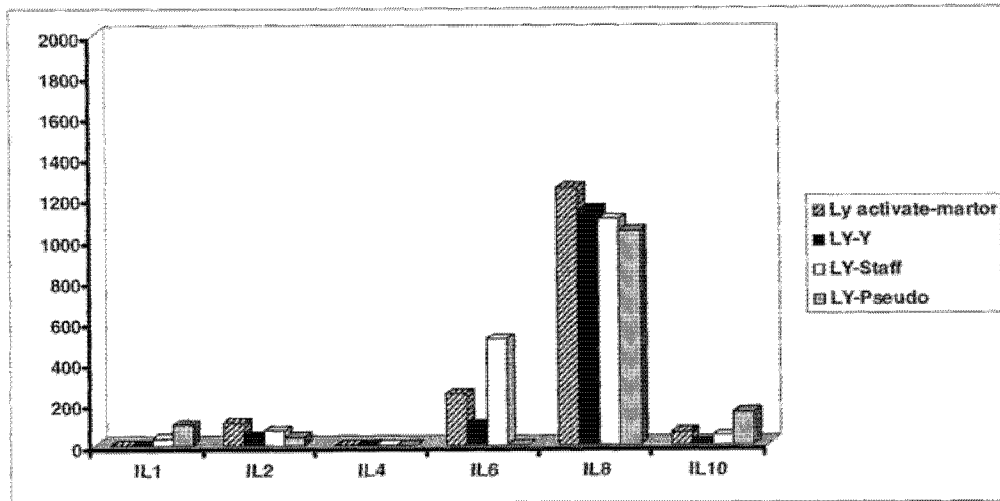


Fig. 2

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

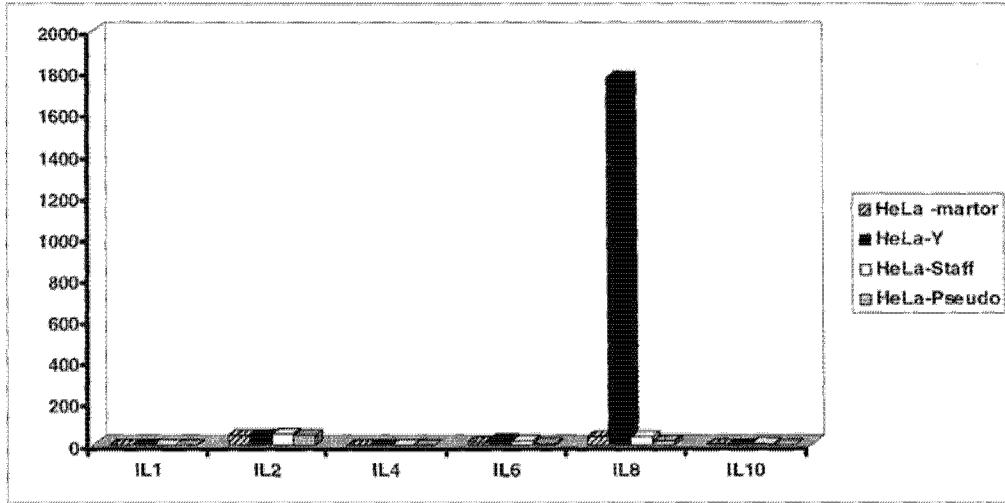


Fig. 3

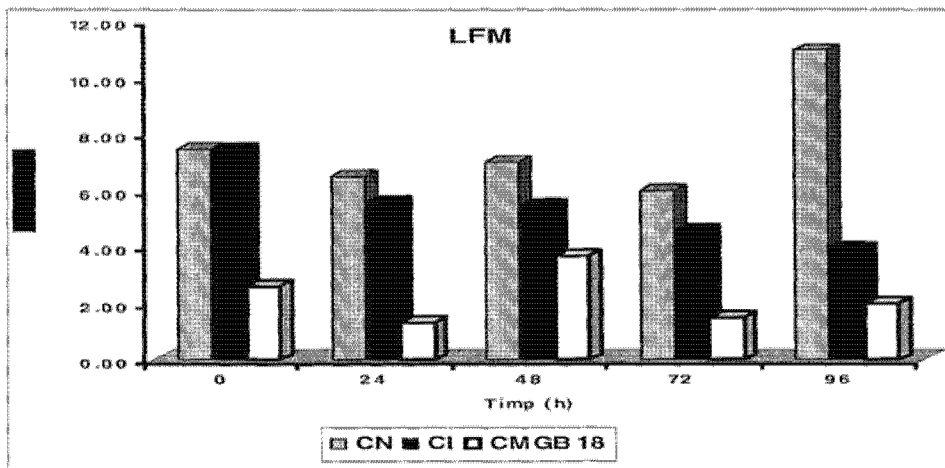


Fig. 4

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

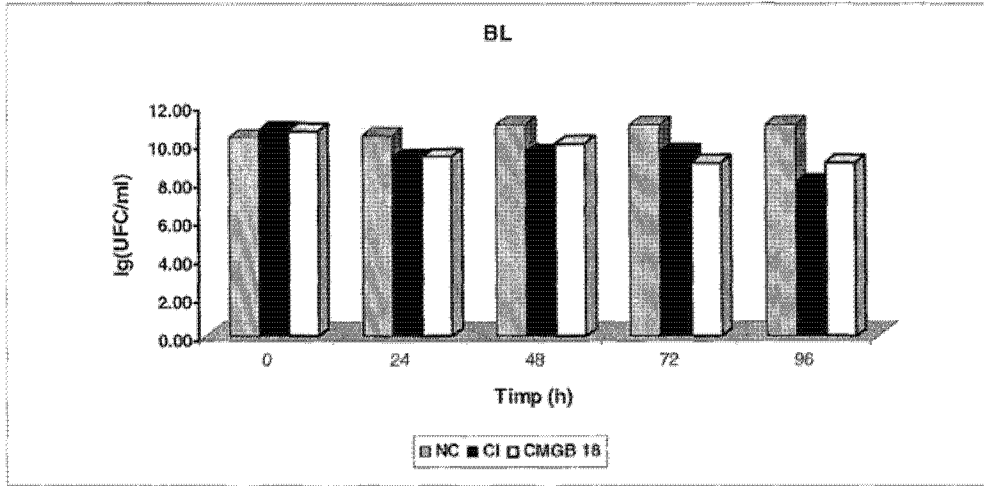


Fig. 5

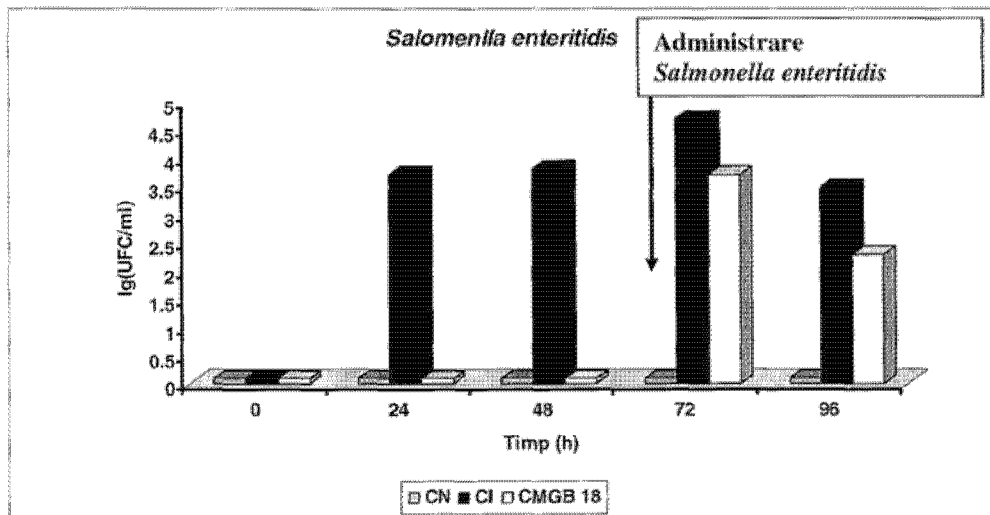


Fig. 6

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

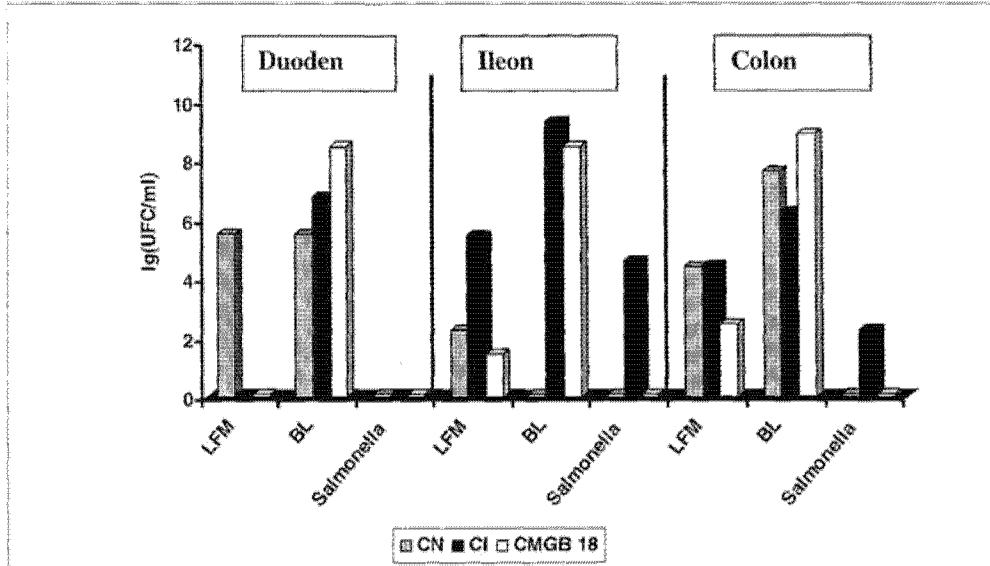


Fig. 7

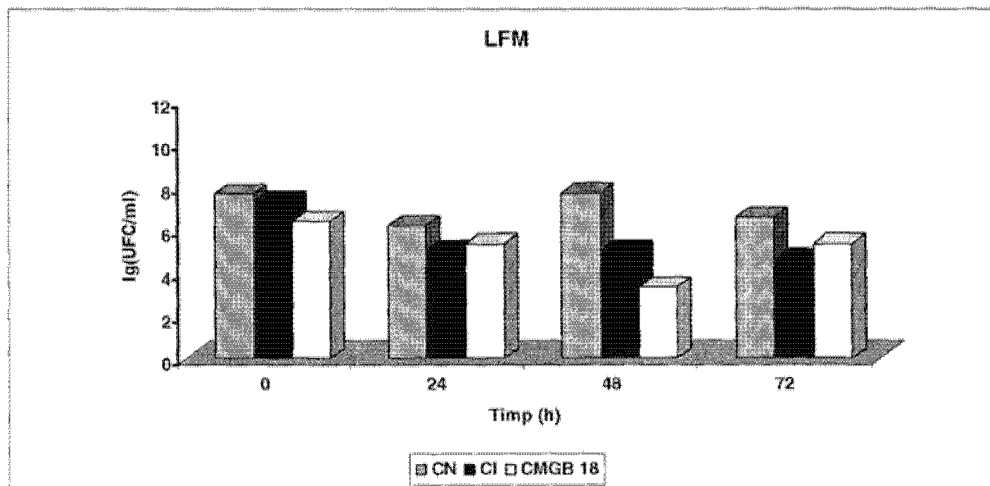


Fig. 8

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

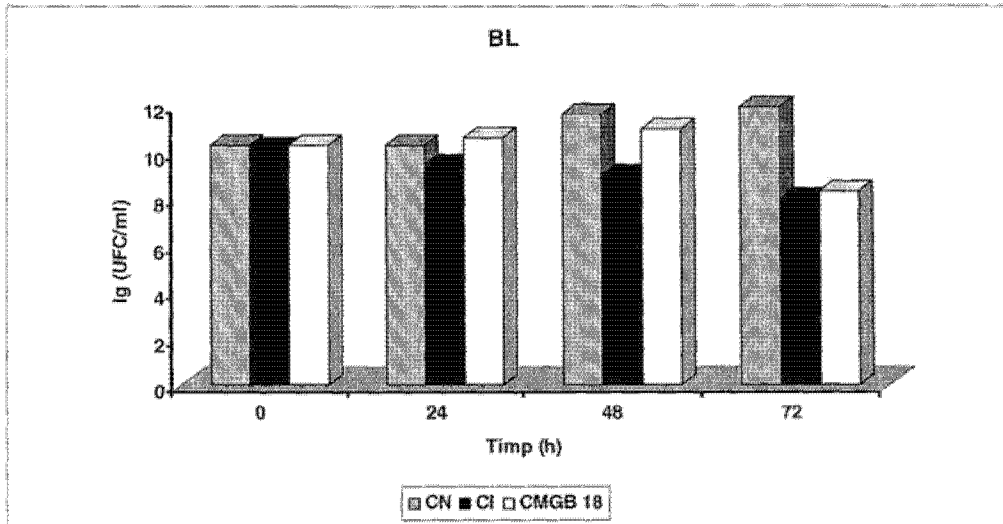


Fig. 9

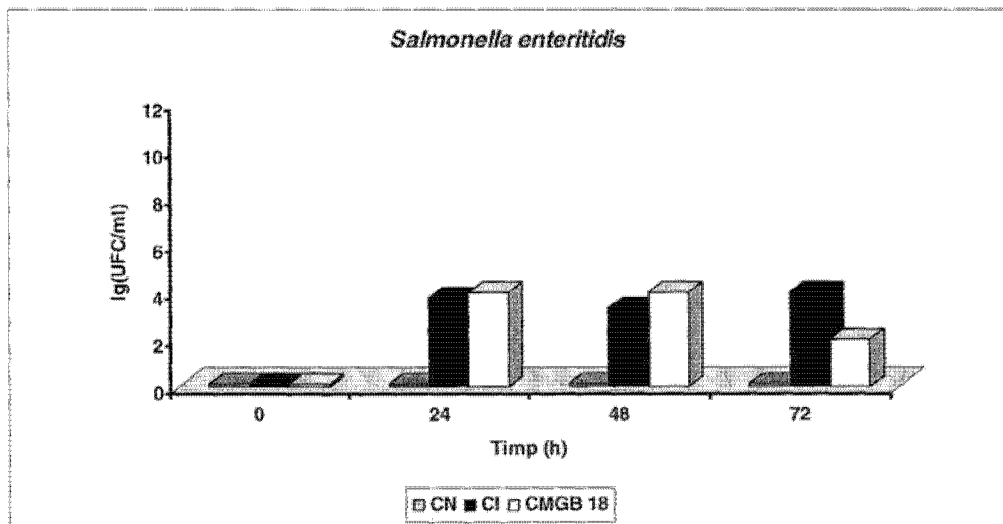


Fig. 10

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

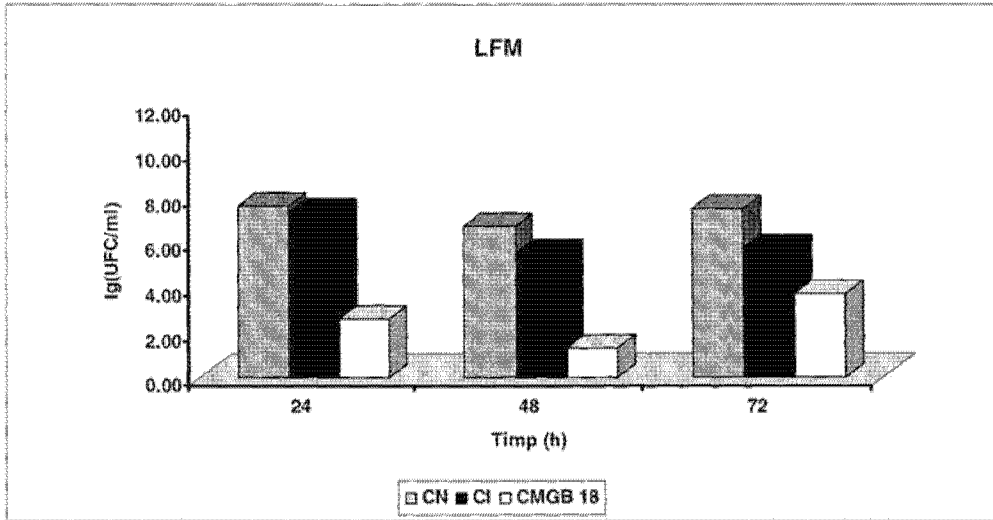


Fig. 11

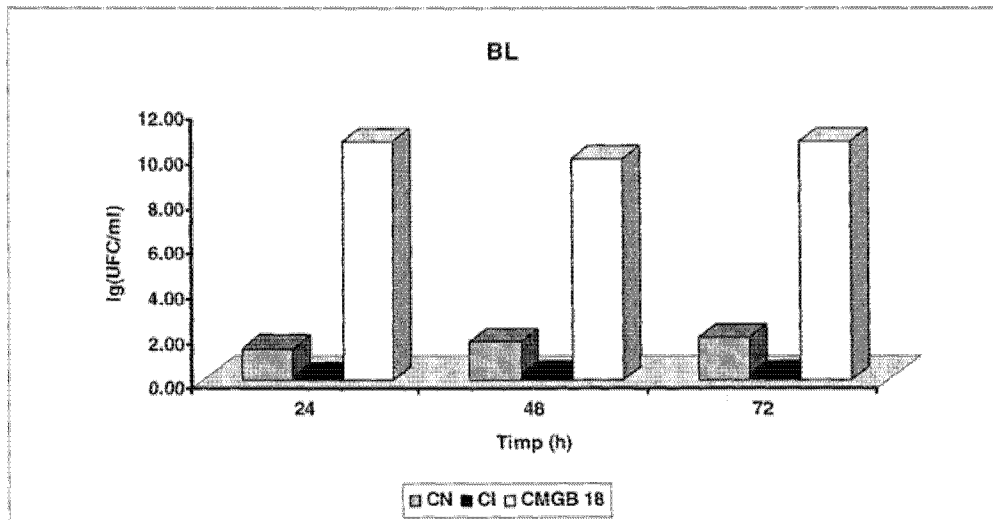


Fig. 12

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01),

C12N 1/20 (2006.01)

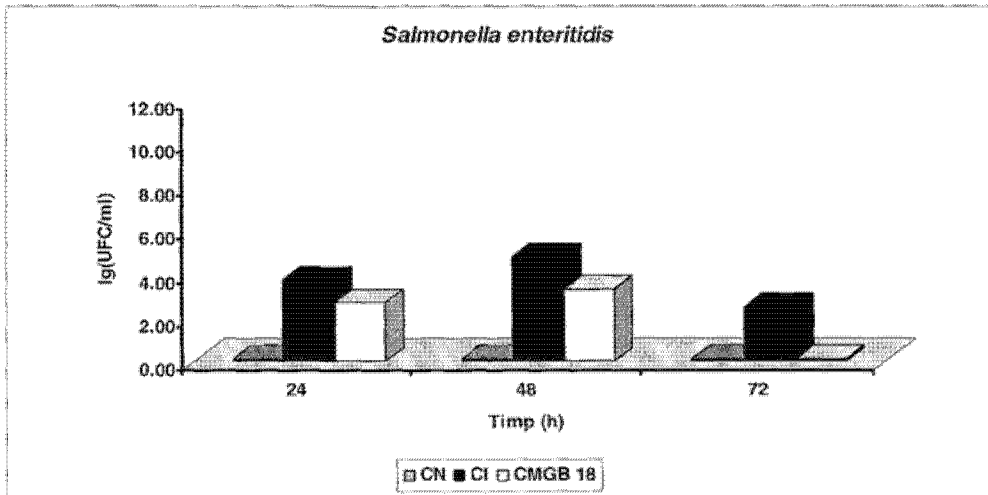


Fig. 13

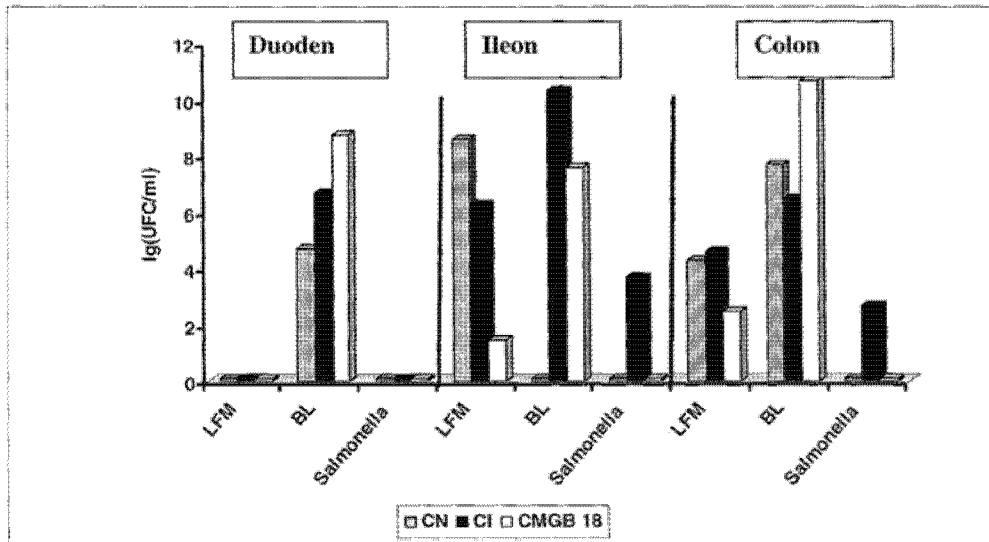


Fig. 14



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