



(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)*A61K 35/74* (2006.01)*C12N 1/21* (2006.01)*A61P 1/00* (2006.01)*C12R 1/07* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2008121602/10, 29.11.2006**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.11.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
29.11.2005 US 60/740,518(43) Дата публикации заявки: **10.12.2009** Бюл. № 34(45) Опубликовано: **20.02.2011** Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 6461607 B1, 08.08.2002. RU 2270858 C2, 20.11.2004. RU 2141970 C1, 27.11.1999. RU 2117672 C1, 20.08.1998. RU 2270858 C2, 20.11.2004. WO 0197822 A1, 27.12.2001. RU 2141970 C1, 27.11.1999. RU 2246537 C2, 27.05.2005. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. - М.: Грантъ, 2001, т.111, с.105-107.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **28.05.2008**(86) Заявка РСТ:
US 2006/045755 (29.11.2006)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/064741 (07.06.2007)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517**

(72) Автор(ы):

**САС Бенедикт (BE),
ВАН ХЕМЕЛЬ Йохан (BE),
ВАНДЕНКЕРКХОВЕ Ян (BE),
ПЕЙС Эрик (BE),
ТАНЬ Хай Менг (SG),
СЕ Чеа-юн (MY),
РАМЧАНД Чанийилпарампу (IN),
ВАРГИЗ Джерри (IN)**

(73) Патентообладатель(и):

КЕМИН ИНДАСТРИЗ, ИНК. (US)

(54) СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ЖИВОТНЫХ ИЛИ ЛЮДЕЙ, СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ЖИВОТНЫХ ИЛИ ЛЮДЕЙ И ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ЖИВОТНЫХ ИЛИ ЛЮДЕЙ

(57) Реферат:

Способ профилактики и способ лечения желудочно-кишечных заболеваний у животных или людей, таких как диарея, связанная с антибиотиками, воспалительное кишечное заболевание и диарея, вызванная *Clostridium*

difficile (CDAD), включает стадию введения эффективного количества штамма *Bacillus subtilis* ATCC PTA-6737 в качестве пробиотика. Штамм продуцирует липопептид суфрактин и представляет собой лекарственное средство для лечения желудочно-кишечных заболеваний у

животных или людей, таких как диарея, диарея, связанная с антибиотиками, воспалительное кишечное заболевание и диарея, вызванная Clostridium difficile (CDAD).

Изобретение обеспечивает высокую эффективность в лечении и профилактике желудочно-кишечных заболеваний у людей или животных. 3 н. и 12 з.п. ф-лы, 14 ил., 12 табл.

RU 2 4 1 2 2 4 1 C 2

RU 2 4 1 2 2 4 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)*A61K* 35/74 (2006.01)*C12N* 1/21 (2006.01)*A61P* 1/00 (2006.01)*C12R* 1/07 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2008121602/10, 29.11.2006**(24) Effective date for property rights:
29.11.2006

Priority:

(30) Priority:
29.11.2005 US 60/740,518(43) Application published: **10.12.2009 Bull. 34**(45) Date of publication: **20.02.2011 Bull. 5**(85) Commencement of national phase: **28.05.2008**(86) PCT application:
US 2006/045755 (29.11.2006)(87) PCT publication:
WO 2007/064741 (07.06.2007)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**SAS Benedikt (BE),
VAN KhEMEL' Jokhan (BE),
VANDENKERKKhOVE Jan (BE),
PEJS Ehrik (BE),
TAN' Khaj Meng (SG),
SE Chea-jun (MY),
RAMChAND Chanijilparampu (IN),
VARGIZ Dzhherri (IN)**

(73) Proprietor(s):

KEMIN INDASTRIZ, INK. (US)**(54) METHOD OF PREVENTING GASTROINTESTINAL DISEASES IN ANIMALS OR PEOPLE, METHOD OF TREATING GASTROINTESTINAL DISEASES IN ANIMALS OR PEOPLE AND MEDICATION FOR TREATMENT OR PREVENTION OF GASTROINTESTINAL DISEASES IN ANIMALS OR PEOPLE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method of prevention and method of treatment of gastrointestinal diseases in animals or people, such as diarrhea, antibiotics-associated diarrhea, inflammatory intestinal disease and diarrhea, caused by *Clostridium difficile* (CDAD), includes stage of introduction of efficient amount of strain of *Bacillus subtilus* ATCC PTA-6737, as probiotic. Strain produces lipopeptide sufactine andrepresents medication for treatment of gastrointestinal diseases in animals or people, such as diarrhea, antibiotics-associated diarrhea, inflammatory intestinal disease and diarrhea, caused by *Clostridium difficile* (CDAD).

EFFECT: invention ensures high efficiency in treatment and prevention of gastrointestinal diseases in people or animals.

15 cl, 14 dwg, 12 tbl, 4 ex

Описание

Настоящая заявка испрашивает приоритет заявки на патент США под серийным № 60/740518, поданной 29 ноября 2005 г.

Предшествующий уровень техники

Изобретение относится в целом к введению бактерий для лечения желудочно-кишечных заболеваний и, конкретнее, к введению бактерий штамма *Bacillus amyloliquefaciens* для лечения связанной с антибиотиками диареи (AAD) и заболеваний, связанных с *Clostridium difficile* (CDAD).

Термин «связанная с антибиотиками диарея» относится к доброкачественной, самостоятельно преходящей диарее после применения противомикробных средств. Обычно патогены не идентифицируются, и диарея вызывается изменениями состава и функции кишечной флоры. Большинство пациентов реагирует на поддерживающие меры и прекращение приема антибиотиков.

Продолжительное применение множественных антибиотиков, в частности средств широкого спектра с низким кишечным всасыванием или высокой желчной экскрецией, вызывает изменение состава и функции кишечной флоры и поэтому приводит к более частому возникновению AAD.^{1,2} На степень изменения будет влиять способность нормальной флоры противодействовать колонизации и типу используемого антибиотика. Поэтому уменьшение анаэробной флоры ободочной кишки препятствует метаболизму углеводов и желчных кислот. Может возникнуть осмотическая или секреторная диарея. Избыточный рост оппортунистических патогенов происходит в результате микробиологических и метаболических изменений.

C. difficile, анаэробная грамотрицательная палочка, вызывает от 15% до 20% всех случаев AAD. В частности, этот микроорганизм можно выделить в большом количестве случаев AAD с симптомами колита и во всех случаях с псевдомембранами. *C. difficile* широко присутствует в окружающей среде, может выживать в течение значительного времени и передается фекально-оральным путем восприимчивым индивидуумам. Ее считают частью нормальной флоры маленьких детей, и она может быть выделена примерно у 5% здоровых взрослых и до одной трети госпитализированных пациентов без патологических симптомов или госпитализированных пациентов, имеющих колонии бактерий.

Клинические проявления AAD могут варьироваться от легкой диареи до скоротечного колита.³ Представляется, что на тяжесть колита, вызванного *C. difficile*, влияет огромное множество факторов, включая возраст, сопутствующие заболевания, иммунный ответ организма хозяина и применение антиперистальтических средств. Представляет интерес то, что, как оказывается, бактериальный генотип и продукция токсина⁴ играют минимальные роли. Кардинальным симптомом этого заболевания является диарея, которая обычно развивается во время лечения, но она может появиться даже через 8 недель после прекращения введения антибиотиков. В большинстве случаев AAD у пациентов возникает жидкий стул, минимальные признаки колита и отсутствие симптомов, свидетельствующих о генерализации заболевания. Диарея быстро реагирует на поддерживающие меры и отмену противомикробного средства.

Clostridium difficile впервые была описана в 1935 г.⁵, но ее не ассоциировали со связанной с антибиотиками диареей до конца 1970-х годов. *Clostridium difficile* представляет собой спорообразующую, грамположительную *Bacillus*, которая продуцирует, по меньшей мере, 2 экзотоксина: токсин А, в первую очередь

энтеротоксин, и токсин В, цитотоксин. Организм вызывает у людей желудочно-кишечные инфекции, которые по тяжести варьируются в диапазоне от бессимптомной колонизации до тяжелой диареи, псевдомембранозного колита (РМС), токсического мегаколона, перфорации ободочной кишки и смерти^{6,7,8}.

Первая стадия в развитии колонизации *C. difficile* разрушение нормальной флоры ободочной кишки, обычно вызванное антибиотиками, или, в необычных случаях, противоопухолевыми или иммуносуппрессивными лекарственными средствами^{9,10}.

Колонизация происходит фекально-оральным путем, попавшие внутрь споры *C.*

difficile выживают, проходя через барьер желудочной кислоты и развиваются в толстой кишке^{11,12}. Симптомы CDAD могут начинаться в первый день лечения антибиотиками или до нескольких недель после прекращения лечения антибиотиками¹³.

Недавно было показано, что следующие 2 фактора увеличивают вероятность симптоматического заболевания у пациентов, которые приобретают колонизацию *C. difficile* в больнице: тяжесть других заболеваний и сниженные уровни сывороточного IgG антитела к токсину А¹⁴. Эти результаты свидетельствуют о том, что ранее существующее антитело против токсина А может облегчить тяжесть заболевания и что иммунизация может быть эффективной в предотвращении и борьбе с больничной CDAD.

Для ясности, пациенты определяются как имеющие заболевание, связанное с *C. difficile* (CDAD), если у них проявляется симптоматическое заболевание, вызванное *C. difficile*. Выявление присутствия токсина *C. difficile* в фекалиях пациентов с диареей было самым общепринятым способом диагностики.

Clostridium difficile является причиной приблизительно 25% всех случаев связанной с антибиотиками диареи¹⁵. Большинство случаев заболеваний, связанных с *C. difficile*, возникают в стационарах или учреждениях длительного ухода (частота 25-60 на 100000

занятых койко-дней), вызывая более чем 300000 случаев в год в США, и, по оценкам, аналогичные частоты во многих европейских странах. Это может удлинить госпитализацию на 2 недели при дополнительных затратах от 6000 до 10000 долларов США на каждый случай заболевания^{16,17,18,19,20,21}.

Диарея может пройти спонтанно у пациентов с CDAD после отмены вызвавшего его антибиотика, а у некоторых пациентов с легким заболеванием специфическое лечение может не потребоваться^{22,23}. Однако стандартной практикой является лечение почти всех пациентов с симптомами заболевания антибиотиками

ванкомицином или метронидазолом. Хотя метронидазол в настоящее время не утвержден FDA (Федеральной Администрацией США по пищевым продуктам и лекарственным средствам) для лечения CDAD, он широко применяется в качестве лечения первой линии ввиду более высокой стоимости ванкомицина и озабоченности возникновением бактерий, устойчивых к ванкомицину. Ввиду того, что

метронидазол эффективно разрушает нормальную кишечную флору, он также предрасполагает пациентов к колонизации устойчивыми к метронидазолу энтерококками²⁴. Обычно адекватно лечение пероральным введением метронидазола (250 мг 4 раза в день или 500 мг 3 раза в день) в течение 10-14 дней.

Пероральное введение ванкомицина гидрохлорида (125 мг 4 раза в день) в течение 10-14 дней показано тем пациентам, которые не переносят пероральный метронидазол, пациентам, у которых лечение метронидазолом не имеет эффекта, беременным пациенткам и, возможно, тяжело больным. Первый рецидив колита,

вызванного *Clostridium difficile*, можно лечить еще одним курсом от 10 до 14 дней перорального метронидазола или ванкомицина.

Лечение CDAD ванкомицином или метронидазолом создает порочный круг за счет изменения нормальной, защитной флоры кишечника. В последующем, у 20% получавших лечение пациентов с первоначальным эпизодом происходит рецидив CDAD, обычно в пределах двух недель после прекращения лечения^{25,26,27,28}. Еще одной выгодой исключения антибиотиков из схемы лечения CDAD является уменьшение «давления» необходимости их подбора с учетом устойчивости бактерий.

Было ясно показано, что ванкомицин и метронидазол выбирают для устойчивых грамположительных кокков, таких как VRE (резистентные к ванкомицину энтерококки). Ретроспективные эпидемиологические исследования связали кишечную колонизацию VRE с применением антибиотиков широкого спектра, таких как цефалоспорины, фторхинолоны и метронидазол²⁹. Кишечная колонизация VRE обеспечивает резервуар для этого патогена внутри стационара. Многие штаммы VRE являются множественно устойчивыми, оставляя немного возможностей для лечения угрожающих жизни системных инфекций. Пациенты с колонизацией *C. difficile*, вероятно, ввиду предшествующего воздействия на них антибиотиков, представляются особенно восприимчивыми к колонизации и инфекции VRE^{30,31}. Умение справиться с колонизацией VRE представляет собой решающий компонент практики борьбы с больничной инфекцией. Поэтому очень желательны лечебные стратегии, которые снижают риск колонизации VRE и в общей популяции пациентов, и пациентов с колонизацией *C. difficile*. Возможное возникновение *C. difficile*, резистентных к ванкомицину и метронидазолу, представляет дополнительный риск применения антибиотиков для лечения этого заболевания. В настоящее время возникновение резистентных к антибиотикам *C. difficile* является спорадическим, но, по сообщениям, оно было отмечено в клинических изолятах, составляющих до 12%³².

Краткое описание сущности изобретения

Изобретение относится к профилактике кишечного заболевания, такого как связанная с антибиотиками диарея, приобретенная диарея, вызванная *Clostridium difficile*, воспалительное кишечное заболевание и желудочно-кишечное заболевание, введением эффективного количества бактерий *Bacillus*, которые продуцируют липопептиды. Бактерии *Bacillus* можно вводить в виде пробиотика и можно комбинировать с другими пробиотиками, такими как инулин.

С использованием биохимических способов, и в частности API 50 CBH/L, предпочтительная *Bacillus* была предположительно идентифицирована в виде *Bacillus subtilis*. При использовании 16S рНК предпочтительная *Bacillus* была предположительно идентифицирована в виде *Bacillus subtilis*. При использовании *gyrA* предпочтительная *Bacillus* была предположительно идентифицирована в виде *Bacillus amyloliquefaciens*. Перед анализом *gyrA* предпочтительная *Bacillus*, депонированная в ATCC (Американской коллекции типовых культур), была идентифицирована как *Bacillus subtilis*.

Изобретение также относится к изолированному штамму бактерий, имеющих последовательность 16S рНК SEQ ID NO:1, к изолированному бактериальному штамму, имеющему гомологию 90%, гомологию 80%, гомологию 70%, гомологию 60%

и гомологию 50% с SEQ ID NO:1.

Изобретение также относится к изолированному штамму бактерий, имеющему частичную последовательность *gyrA* SEQ ID NO:2, к изолированному

бактериальному штамму, имеющему гомологию 90%, гомологию 80%, гомологию 70%, гомологию 60%

и гомологию 50% с SEQ ID NO:2.

Изобретение также относится к изолированному штамму бактерий, имеющему частичную последовательность *gyrA* SEQ ID NO:3, к изолированному бактериальному штамму, имеющему гомологию 90%, гомологию 80%, гомологию 70%, гомологию 60%

и гомологию 50% с SEQ ID NO:3.

Изобретение, кроме того, относится к бактериям *Bacillus* штамма, идентифицированного как штамм ATCC PTA-6737.

Предпочтительную *Bacillus* PB6 можно использовать для нескольких неудовлетворенных медицинских потребностей ввиду ее многосторонних и необычных характеристик.

Краткое описание чертежей

Фиг.1 представляет собой фотографию антагонистического воздействия *Bacillus* PB6 (1) против *S. perfringens* ATCC13124 (2) и *S. difficile* ATCC9689 (3).

Фиг.2 представляет собой фотографию антагонистического воздействия *Bacillus* PB6 на *Clostridium difficile* NAP1/027.

Фиг.3 представляет собой фотографию антагонистического воздействия *Bacillus* PB6 на *Campylobacter jejuni* ATC55918.

Фиг.4 представляет собой чертеж химической структуры сурфактина.

Фиг.5 представляет собой график выживания в % хомячков с CDAD при различных способах лечения.

Фиг.6 представляет собой последовательность гена (положение нуклеотида 27-1492) 16S рРНК из 1466 пар оснований PB6 *Bacillus*.

Фиг.7 представляет собой частичную последовательность (положение нуклеотида 43-1065) *gyrA* из 1023 пар оснований PB6 *Bacillus*.

Фиг.8 представляет собой консенсусную последовательность из 801 пары оснований, полученную в результате частичного секвенирования *gyrA* PB6 *Bacillus*.

Фиг.9 представляет собой гель выявления продукта PCR (полимеразной цепной реакции) (1650 пар оснований), кодирующего гемолизин BL; полоса 1, лестницы масс GeneRuler™ (3000, 2000, 1500, 1200 пар оснований); полоса 2, *Bacillus* PB6; Полоса 3, *Escherichia coli* ATCC 25922; Полоса 4, *B. Cereus* ATCC 49064; Полоса 5, *B. cereus* ATCC 11778. Ни в одной из полос, за исключением полос 4 и 5, не была выявлена амплифицированная зона, соответствующая продукту PCR из 1650 пар оснований.

Фиг.10 представляет собой гель выявления продукта PCR (1437 пар оснований), кодирующего не гемолитический энтеротоксин (Nhe). Полоса 1, лестницы масс GeneRuler™ (3000, 2000, 1500, 1200 пар оснований); полоса 2, *Bacillus* PB6; Полоса 3, *Escherichia coli* ATCC 25922; Полоса 4, *B. Cereus* ATCC 49064; Полоса 5, *B. cereus* ATCC 11778. Ни в одной из полос не была выявлена амплифицированная зона, соответствующая продукту PCR из 1437 пар оснований.

Фиг.11 представляет собой гель выявления продукта PCR (1400 пар оснований), кодирующего энтеротоксин K (EntK). Полоса 1, *Bacillus* PB6; Полоса 3, *Escherichia coli* ATCC 25922; Полоса 4, *B. Cereus* ATCC 49064; Полоса 5, *B. cereus* ATCC 11778; полоса 6, лестницы масс GeneRuler™ (3000, 2000, 1500, 1200 пар оснований); ни в одной из полос не была выявлена амплифицированная зона, соответствующая продукту PCR из 1400 пар оснований.

Фиг.12 представляет собой фотографию, показывающую отсутствие антагонистического эффекта *Bacillus cereus* (1) против *C. perfringens* ATCC13124 (2) и *C. difficile* ATCC9689 (3).

Фиг.13 представляет собой фотографию, показывающую антагонистический эффект *Bacillus* PB6 против *Campylobacter jejuni* ATCC 33291.

Фиг.14 представляет собой фотографию, показывающую отсутствие антагонистического эффекта *Bacillus cereus* (1) против *Campylobacter jejuni* ATCC 33291.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

PB6 представляет собой патентованный бактериальный штамм, который был выделен в природе и не был генетически модифицирован. С использованием методики риботипирования, эта бактерия была идентифицирована как являющаяся штаммом *Bacillus subtilis*. Исследование гибридизации ДНК:ДНК указывают на то, что штамм *Bacillus* PB6 может вероятнее представлять собой *Bacillus amyloliquefaciens*, которая будет дополнительно описана ниже.

Используемый в настоящем описании термин «профилактика» означает медицинскую или публичную медицинскую процедуру, целью которой является скорее предотвращение, а не лечение или излечение заболевания. Используемый в настоящем описании термин «синергическое соединение» означает соединение, которое усиливает профилактический эффект или эффективность лечения бактерии *Bacillus*, введенной для профилактики или лечения заболевания или состояния здоровья. Используемый в настоящем описании липопептиды представляют собой молекулы, которые содержат и липиды, и белки, и включают поверхностно-активные молекулы, содержащие несколько аминокислот и одну или более жирных кислот. Сурфактины, итурины, микосубтилины, байлломицины, бациллопептины, фенгицины и плипастатины являются примерами липопептидов.

Пример 1

Эффективность *Bacillus* PB6 против *C. difficile* AAD и CDAD

Антагонистические свойства *Bacillus* PB6 испытывали против *C. perfringens* ATCC13124 и *C. difficile* ATCC9689.

Bacillus PB6 обладала антагонистическим эффектом против *C. perfringens* ATCC13124 и *C. difficile* ATCC9689. Прозрачную зону наблюдали в промежуточных отрезках штриховых линий на чашке для обоих видов. Пример тестируемой чашки изображен на фиг.1.

Bacillus PB6 также обладала антагонистическим эффектом против *C. difficile* NAP1/027. Этот штамм *C. difficile* связан с несколькими очень опасными вспышками и проявляет устойчивость к антибиотикам. Пример тестируемой чашки изображен на фиг.2.

Для определения противомикробного эффекта вторичных метаболитов *Bacillus* PB6 бактерию ферментировали и продукт ферментации экстрагировали простым диэтиловым эфиром. Органический слой отделяли, концентрировали в вакууме и повторно растворяли в DMSO (диметилсульфоксиде) для скрининга.

Минимальная ингибирующая концентрация (MIC) экстракта составляла 2,5-5 мкг/мл против *C. perfringens* и 5-10 мкг/мл против *C. difficile* (таблица 1).

Таблица 1
Результаты скрининга неочищенным экстрактом *Bacillus* PB6 против *C. perfringens*, *C. difficile* и *C. jejuni*

MIC (мкг/мл)

	<i>C. perfringens</i> ATCC13124	<i>C. difficile</i> ATCC9689	<i>C. jejuni</i> ATCC33291
Неочищенный экстракт	2,5-5	5-10	25-100

Было также доказано, что *Bacillus* PB6 ингибирует рост *Campylobacter jejuni* in vitro. Пример тестируемой чашки показан на фиг.3. МИС эфирного экстракта продукта ферментации *Bacillus* PB6 против *C. jejuni* составила 25-100 мкг/мл.

Campylobacter jejuni и *Helicobacter pylori* очень тесно связаны, и поэтому вероятно, что *Bacillus* PB6 также активна против *Helicobacter pylori*. Кроме того, в литературе можно обнаружить, что бактерии *Bacillus* (например, *Bacillus subtilis*) обладают активностью против *Helicobacter pylori*.³³

Дальнейшее исследование неочищенного экстракта показало, что молекула, ответственная за активность против *Clostridium*, представляла собой циклический липопептид сурфактин (фиг.4).

Когда активность чистого сурфактина (или очищенного из ферментации авторов, или закупленного у компании Sigma) определяли против *Clostridium*, была обнаружена более высокая МИС. Оказалось, что МИС против *C. perfringens* составила 10-25 мкг/мл. Примечательно, что чистое активное соединение менее активно, чем неочищенный экстракт ферментации. Это, вероятно, вызвано кофактором (факторами), присутствующим в экстракте, который усиливает активность сурфактина. Это было показано экспериментами, где МИС сурфактина сравнивали с МИС сурфактина в комбинации с неактивным соединением. Это неактивное соединение было выделено из того же экстракта, из которого заявители выделили сурфактин. МИС этой комбинации составляла от 1 до 10 мкг/мл.

Эксперименты показали, что, когда фильтраты *Bacillus* PB6 обрабатывали пепсином и трипсином, активность против вида *Clostridium* значительно снижалась. Поскольку пепсин и трипсин представляют собой ферменты, продуцируемые в слизистой выстилке желудка и поджелудочной железе, ясно, что пероральное введение сурфактина приведет к значительной потере активности. Другие эксперименты, где сурфактин инкубировали при 37°C в течение 30, 60 и 90 минут с 0,1 N HCl, показали, что кислотные условия (как в желудке) ведут к потере активности (таблица 2). Поэтому введение *Bacillus* PB6 (в конечном счете, в виде спор) более эффективно для получения эффективных концентраций сурфактина или других липопептидов в кишечнике.

Таблица 2
Результаты влияния кислотных условий на антибактериальную активность сурфактина против *Clostridium perfringens*

	МИС (мкг/мл) (<i>C. perfringens</i>)			
	Без HCl	30' HCl	60' HCl	90' HCl
Сурфактин	1-10	10-25	25-50	25-50

Кроме продукции противомикробных вторичных метаболитов, споры *Bacillus* PB6 способны прорасти в кишечнике и, таким образом, могут подавлять патогены конкурентным исключением.

Bacillus, конкретнее *Bacillus subtilis*, остается одной из самых сильнодействующих и благоприятных из всех укрепляющих здоровье и стимулирующих иммунитет бактерий. В соответствии с несколькими клиническими исследованиями, документированными в отчетах о медицинских исследованиях, компоненты клеточной стенки переваренной *Bacillus* способны активировать почти все системы иммунной защиты человека, включая активацию, по меньшей мере, трех

специфических антител (IgM, IgG и IgA), которые высоко эффективны против многих из вредных вирусов, грибов и бактериальных патогенов, которые регулярно пытаются внедриться и инфицировать человеческую систему. Было также показано, что *Bacillus subtilis* стимулирует В и Т-лимфоциты и макрофаги. Также было предоставлено доказательство того, что споры *Bacillus subtilis* могут оказывать иммуномодулирующий эффект *in vivo*. И была описана увеличенная реакция бляшкообразующих клеток на Т-зависимые антигены после воздействия спор, а также усиление различных функций фагоцитов.^{34,35,36,37,38,39,40,41}

В одном исследовании (таблица 3) повышенную степень фагоцитоза наблюдали у бройлерных цыплят, которым скармливали корм с различными уровнями *B. amyloliquefaciens* PB6, по сравнению с антибиотиком и отрицательными контролями.

На основании этого, можно сделать вывод, что *Bacillus amyloliquefaciens* также обладает иммуностимулирующими свойствами.

Таблица 3 Влияние <i>Bacillus</i> PB6 на иммунный ответ у самцов бройлерных цыплят	
Лечение	Фагоцитоз
Отрицательный контроль	6,59
Положительный контроль (100 мг/кг цинка бацитрацина)	6,23
PB6 (10^7 CFU/г)	11,82
PB6 (10^8 CFU/г)	8,85
CFU = колониеобразующие единицы	

Фильтраты из *Bacillus* PB6 оценивали на присутствие гемолитических, негемолитических энтеротоксинов и энтеротоксина К с использованием имеющихся в продаже иммунологических анализов (TECRA и Oxoid). Те же фильтраты, кроме того, подвергали тестам цитотоксичности на линиях клеток Vero и HEp-2. Наконец, способы на основе PCR использовали для подтверждения присутствия генов с возможной энтеротоксигенной способностью у *Bacillus* PB6. Не наблюдалась перекрестная иммунная реактивность между энтеротоксинами Hb1 или Nhe и антителами в этих двух имеющихся в продаже иммунных анализах. Не наблюдалась также цитотоксичность при анализах клеток Vero и HEp-2. Штамм *Bacillus* PB6 не продуцирует гемолитические, негемолитические энтеротоксины и энтеротоксин К в тех же условиях, которые обеспечивали возможность выявления известного токсигенного штамма *B. cereus*.

Также испытывали токсичность *Bacillus* PB6 *in vivo*. Для этого изготавливали высушенный распылением продукт, содержащий 10^{10} КОЕ/г *Bacillus* PB6.

Исследование токсичности подвергнутых распылительной сушке *B. amyloliquefaciens* у крыс Wistar

Первое исследование было структурировано и проведено для определения острой пероральной токсичности продукта *Bacillus* PB6 (10^{10} КОЕ/г) у крыс Wistar. Всего 5 самцам и 5 самкам животных вводили пероральную дозу 5000 мг/кг (в виде суспензии в дважды дистиллированной воде и с использованием объема дозы 10 мл/кг). Контрольная группа состояла из 5 самцов и 5 самок животных, которым вводили дважды дистиллированную воду в дозе 10 мл/кг. У животных, получавших 5000 мг/кг, смертность не наблюдалась. 50% животных, получавших продукт *Bacillus* PB6, были более активны, по сравнению с контрольной группой. Ни у одного из животных, получавших лечение *Bacillus* PB6, не было диареи. После некропсии ни в одном органе в обеих группах не наблюдались патологические изменения. Таким образом, было обнаружено, что максимальная не летальная доза (LD₀) и LD₅₀

перорально введенного продукта Bacillus PB6 больше чем 5000 мг/кг.

Вывод: Было обнаружено, что максимальная не летальная доза (LD_0) и LD_{50} сухого продукта В. PB6 (10^{10} КОЕ/г) у крыс Wistar при введении пероральным путем, составляет больше чем 5000 мг/кг.

Токсичность В. PB6 у крыс Wistar при введении повторных доз в течение 28 дней

Это исследование было структурировано и проведено для определения токсичности В. PB6 (10^{10} КОЕ/г) у крыс Wistar при введении повторных доз в течение (28 дней). В каждой группе 6 самцам и 6 самкам животных вводили пероральные дозы 250, 500 или 1000 мг/кг в течение 28 дней. Группа контроля носителя также состояла из 6 самцов и 6 самок животных, которым вводили дважды дистиллированную воду в дозе 10 мг/кг в течение 28 дней. Эти группы умерщвляли на 29-й день.

Исследование также состояло из двух обратимых групп для контроля носителя и высокой дозы, каждая из которых включала 6 самцов и 6 самок животных. Группе высокой дозы лекарственное средство вводили до 28-го дня, не проводили лечение с 29-го по 42-й день и умерщвляли на 43-й день. Группе контроля носителя вводили дистиллированную воду в дозе 10 мг/кг до 28-го дня, не проводили лечение с 29-го по 42-й день и умерщвляли на 43-й день.

Вывод: В 28-дневных испытаниях токсичности у крыс было обнаружено, что уровень не наблюдавшихся побочных явлений (NOAEL) для В. PB6 (10^{10} КОЕ/г) был больше чем 1000 мг/кг.

Исследование местного раздражающего действия (кожного и глазного) В. PB6 у новозеландских белых кроликов

Всего 3 новозеландских белых кролика (обоих полов) - В этом исследовании использовали одних и тех же кроликов для раздражения кожи и глаз. 1 г В. PB6 (10^{10} КОЕ/г) накладывали в виде пасты на кожу для ее раздражения, и 100 мкл 10% суспензии В. PB6 вводили в левый глаз для раздражения глаза.

Тестируемый объект пасту PB6 наносили на кожу в дорзолатеральной области после удаления волос у 3 кроликов. Суспензию 10% PB6 вводили в глаз 3 кроликов. Тестируемый объект удаляли с кожи животного через 4 часа после нанесения. После введения тестируемого объекта в левый глаз веки глаза удерживали сомкнутыми в течение 2-3 секунд.

Кроликов наблюдали и проводили балльную оценку раздражения кожи через 1, 24, 48 и 72 часа после удаления тестируемого объекта PB6. Балльную оценку раздражения глаз проводили в те же точки времени после введения суспензии PB6.

Выводы:

Кожа: Раздражение не наблюдалось при нанесении пасты 1 г PB6 (10^{10} КОЕ/г).

Глаз: Раздражение не наблюдалось при введении 100 мкл 10% суспензии PB6 (10^{10} КОЕ/г).

Анализ микроядра эритроцитов В. amyloliquefaciens PB6 у мышей

Это исследование было структурировано и проведено для выявления повреждения хромосом или митотического аппарата швейцарских белых мышей, вызванного испытуемым веществом. Всего 5 самцам и 5 самкам животных вводили пероральную дозу 2500 и 5000 мг/кг, контрольная группа носителя состояла из 5 самцов и 5 самок мышей, которым перорально вводили дважды дистиллированную воду в дозе 10 мг/кг. Группе положительного контроля (5 самцов + 5 самок) перорально вводили циклофосфамид в дозе 40 мг/кг.

Животных умерщвляли избытком CO₂ в соответствующие точки времени (контрольная группа, 2500 мг/кг РВ6 циклофосфамида через 24 часа и 5000 мг/кг РВ6 и через 24 и через 48 часов), и удаляли обе бедренные кости, и делали мазки костного мозга на предметных стеклах, окрашивали красителями Giemsa и May-Greunwald, рассматривали под микроскопом для выявления частоты микроядер подсчетом 2000 незрелых эритроцитов.

Для каждого животного определяли также процентную долю незрелых эритроцитов среди всех эритроцитов (незрелых + зрелых) подсчетом, по меньшей мере, 200 эритроцитов.

Вывод: РВ6 (10¹⁰ КОЕ/г) в дозе 2500 и 5000 мг/кг не вызывала значимого появления у мышей полихроматических эритроцитов с микроядрами.

Определение эффективности in vivo перорально введенной Bacillus РВ6 при лечении сирийских золотистых хомячков с CDAD

Структура исследования

42 самца сирийских золотистых хомячков получили из национального центра разведения лабораторных животных National Centre for Laboratory Animal Sciences, NIN (Hyderabad, India). В начале периода лечения возраст животных составлял 12-14 недель. При поступлении в лабораторию тестирования, под наблюдением ветеринара проводили полное обследование животных для подтверждения их хорошего состояния. Животные адаптировались в условиях исследования в течение периода, по меньшей мере, 7 дней. Массу тела регистрировали перед включением животных в группы исследования в начале испытания. Животных содержали отдельно в поликарбонатных клетках (290×22×140 мм, длина × ширина × высота). В помещении для содержания животных и в помещении, где проводилось тестирование, были установлены следующие параметры: температура: 22±4°C, относительная влажность: 50±20%, цикл света/темноты: 12 часов/12 часов (свет с 07.00 по 19.00) и вентиляция: приблизительно 7 циклов/час поступления фильтрованного, не рециркулирующего воздуха. Все животные имели свободный доступ к гранулированному корму для хомячков (NIN, Hyderabad) и без ограничения получали очищенную воду Aquaguard.

Животных включали в одну из 7 групп исследования (с А по G). У групп А-Е связанную с Clostridium difficile диарею вызывали пероральным введением 10000 CFU (колониеобразующих единиц) Clostridium difficile ATCC 9689 в 0-й день с последующей подкожной инъекцией в область тела непосредственно позади ушей 100 мг/кг клиндамицина в 1-й день. Группа А дополнительного лечения не получала.

Группу В лечили со 2-го по 6 день пероральным введением 50 мг/кг ванкомицина 1 раз/день. Группы С, D и E лечили РВ6 в дозе соответственно 1,5×10⁸, 1,5×10⁷ и 1,5×10⁶ CFU/кг, 3 раза/день перорально с интервалом между дозами 4 часа (первая доза в 9.30 утра) с 1-го по 6-й день. В группах F и G животным вводили РВ6 в дозе 1,5×10⁹ CFU/кг, 3 раза/день перорально с интервалом между дозами 4 часа (первая доза в 9.30 утра) с 1-го по 6-й день. 6-й день был последним днем лечения. Дважды в день до 15-го дня проводили наблюдение для выявления клинических признаков и смертности. Проводили балльную оценку признаков диареи как легкую, умеренную или тяжелую. Массу тела животных регистрировали в 0-й, 7 и 14 день. Для групп А-Е фекалии тестировали в 1, 2 и 7-й день на присутствие токсина А и В. Clostridium, используя Иммунокарты (Meridian life sciences). В 1-й день образцы фекалий брали перед введением клиндамицина. На 2-й и 7-й день образцы фекалий

брали между второй и третьей дозой лечения.

Тестируемые препараты

Культуральную петлю Culti-loop (Oxoid, Basingstoke, England), содержащую Clostridium difficile ATCC 9689, высевали в соответствии с инструкциями изготовителя и бульон разводили солевым раствором для получения 10000CFU/мл. Клиндамицин гидрохлорид (Pharmacia, Puurs, Belgium) и ванкомицин (Neon Laboratories, Bombay, India) суспендировали в дважды дистиллированной воде соответственно до концентрации 10 и 50 мг/мл. Объемы дозы составляли соответственно 10 и 1 мл/кг массы тела для клиндамицина и ванкомицина. Сухой РВ6 (Kemin Consumer Care, Des Moines, USA), ферментационный бульон Bacillus "PB6", высушенный на мальто- и циклодекстриновом носителе, суспендировали в дважды дистиллированной воде до концентраций 1,5E8, 1,5E6 и 1,5E5 CFU/мл. Объем дозы составил 10 мл/кг массы тела. Свежие препараты изготавливали перед каждым введением. Клиндамицин, ванкомицин и РВ6 вводили на основании последней полученной индивидуальной массы тела. Препараты энергично перемешивали перед каждым введением.

Результаты и обсуждение

Примерно через 6 часов после введения клиндамицина легкая диарея наблюдалась у 3 животных группы без лечения и у 1 животного из группы, подлежащей лечению ванкомицином. В группах С, D, Е, где животные получали свою первую дозу РВ6 примерно через 1 час после введения клиндамицина, ни у одного животного в тот же день не проявлялись никакие признаки диареи. В группах лечения явления в виде количества животных с диареей и тяжести диареи в течение следующих 2 дней развивались по разному (таблица 4). Во всех группах, в которых была вызвана связанная с Clostridium difficile диарея, проявлялись признаки диареи. Интенсивность диареи была меньше в группе, получавшей лечение ванкомицином, и группе, получавшей высокую дозу РВ6. В группе, не получавшей лечение, а также в группах низкой и средней дозы РВ6 стул был очень водянистый, и вся абдоминальная область была мокрой.

Таблица 4

Количество животных с диареей и их балльная оценка в дни от 1-го по 3-й в группах, у которых была вызвана CDAD

Лечение	День 1		День 2		День 3	
	количество	балльная оценка	количество	балльная оценка	количество	балльная оценка
Без лечения	3	+	6	+(1)	6	++(5)
				++(5)		+++ (1)
Ванкомицин	1	+	2	++	2	+++
Высокая доза РВ6	0		3	+(2)	4	+(1)
				++(1)		++(3)
Средняя доза РВ6	0		5	+(4)	6	+(1)
				++(1)		++(2)
						+++ (3)
Низкая доза РВ6	0		5	++	6	+(1)
						++(2)
						+++ (3)
+: легкая ++: умеренная +++: тяжелая						

В конце 3-го дня все животные из групп, в которых была вызвана CDAD, были еще живы, но у нескольких из них проявлялись признаки тяжелой диареи. На 4-й день, через 3 дня после введения клиндамицина, погибли первые животные. В конце периода лечения, на 6-й день, все хомячки в группе без лечения погибли. Выживание было самым высоким в группах лечения ванкомицином и высокой дозой РВ6, где выжили 4 из 6 животных (фиг.5).

На 7-й день наблюдалось снижение средней массы тела во всех группах, в которых была вызвана CDAD. Наблюдалась отчетливая обратная связь между реакцией и дозой РВ6 относительно этого уменьшения массы (таблица 5). Животные, получавшие низкую дозу РВ6, в среднем потеряли в 3 раза больше массы тела, чем животные, которые получали высокую дозу. Потеря массы тела была минимальной в группе лечения ванкомицином. В двух группах, в которых не была вызвана CDAD, средняя масса тела в течение того же периода времени несколько увеличилась.

Таблица 5 Средняя масса тела (г) и прибавка массы тела (%)			
Лечение	Средняя масса тела (г)		Разность средней массы тела (%)
	День 0	День 7	День 0-7
Вызванная CDAD			
Без лечения	219,0±5,1 (n=6)	*	*
Ванкомицин	218,0±4,6 (n=6)	215,8 ^b ±1,7 (n=4)	-1,7 ^b ±1,8
Высокая доза РВ6	218,8±4,0 (n=6)	206,5 ^c ±5,7 (n=4)	-5,0 ^b ±2,1
Средняя доза РВ6	217,8±3,2 (n=6)	189,0 ^d ±2,7 (n=3)	-12,9 ^c ±0,7
Низкая доза РВ6	217,2±4,5 (n=6)	176,5 ^c ±2,1 (n=2)	-17,9 ^d ±1,2
Не вызванная CDAD			
Высокая доза РВ6	217,8±2,3 (n=6)	230,0 ^a ±7,6 (n=6)	-5,6 ^a ±3,1
Высокая доза РВ6	219,2±3,9 (n=6)	225,8 ^a ±4,8 (n=6)	3,1 ^a ±3,2
*нет данных, все животные погибли a,b,c,d,e величины в пределах одной колонки, не имеющие надстрочного обозначения, являются статистически значимо отличными (P<0,05, минимальное статистически значимое различие)			

Присутствие клостридиевого токсина А и В в образцах фекалий животных, у которых была вызвана CDAD, контролировали на 1-й, 2-й и 7-й день. Как ожидалось, у групп, проявивших высокую смертность и высокое снижение средней массы тела, также имела высокая процентная доля животных, имевших положительный результат на эти токсины снова при обратной связи между реакцией и дозой РВ6.

Таблица 6 Количество животных с положительным результатом теста на присутствие токсинов А или В <i>C. difficile</i> в их фекалиях						
Лечение	День 1		День 2		День 7	
	Положительный результат	Тестируемые	Положительный результат	Тестируемые	Положительный результат	Тестируемые
Без лечения	3	6	5	6	*	*
Ванкомицин	0	6	2	6	1	4
Высокая доза РВ6	0	6	3	6	2	4
Средняя доза РВ6	0	6	3	6	2	3
Низкая доза РВ6	0	6	5	6	2	2
*нет данных, все животные погибли						

Вывод

Это исследование было предназначено и проведено для оценки эффективности В.РВ6 при лечении CDAD на модели CDAD, вызванной клиндамицином у хомячков, хорошо установленной и высоко чувствительной модели этой инфекции. У всех хомячков, которые не получали лечение после индукции CDAD, развилась тяжелая диарея, они потеряли массу тела и погибли в пределах пяти дней. Лечение РВ6 привело к связанной с дозой реакции. Диарея, снижение массы тела и смертность были минимальными при самой высокой дозе РВ6. При прекращении лечения самая высокая из доз РВ6 проявила такую же эффективность лечения как ванкомицин, помогая хомячкам выживать при CDAD, вызванной клиндамицином.

Оценка эффективных компонентов перорально вводимой Bacillus РВ6

Новая диетологическая концепция пробиотиков (таких как инулин) приобретает популярность среди специалистов по питанию, врачей, производителей пищевых продуктов и потребителей. Наиболее широко принятым определением пробиотической пищи является: «Пробиотик представляет собой селективно ферментированный ингредиент, который обеспечивает возможность специфических изменений и состава, и активности желудочно-кишечной микрофлоры, что оказывает благоприятные воздействия на благополучие и здоровье организма». Для того, чтобы классифицироваться в качестве пробиотического ингредиента в пищевых продуктах, этот ингредиент должен 1) противодействовать перевариванию (гидролизу) алиментарными ферментами в желудке и тонкой кишке; 2) поступать в ободочную кишку химически интактным и в последующем подвергаться частичной или полной ферментации и 3) стимулировать активный рост и/или активность укрепляющих здоровье кишечных бактерий. Благоприятные воздействия на здоровье роста стимулированных пробиотиками бактерий имеют широкий диапазон и включают такие благоприятные воздействия, как положительные эффекты на рак и патогены ободочной кишки, сниженный уровень триацилглицеринов, увеличенное всасывание Са и Mg и увеличенная частота дефекации и массы фекалий. Инулин представляет собой полидисперсный $\beta(2 \rightarrow 1)$ фруктан с длиной цепи в диапазоне от 2 до 60 единиц. Уникальная связь между молекулами фруктозы инулина и олигофруктозой отличает их от типичных углеводов. Они противодействуют перевариванию алиментарными ферментами человека и всасыванию в тонкой кишке, но гидролизуются и ферментируются микрофлорой ободочной кишки и поэтому классифицируются как пробиотическое пищевое волокно.^{42,43,44,45,46}

Тот факт, что пробиотики стимулируют активный рост и/или активность укрепляющих здоровье кишечных бактерий, делает их очень интересными продуктами для введения вместе с пробиотиками, такими как Bacillus РВ6.

Кроме того, Bacillus amyloliquefaciens РВ6 не ингибирует рост «здоровых» бактерий из кишечной флоры, таких как виды LactoBacillus и виды Bifidobacterium.

Материалы и методы

Идентификация изолированных бактерий РВ6

Выделенный штамм РВ6 Bacillus представляет собой грамположительную палочку и обладает каталазой. Окрашивание малахитовым зеленым подтвердило, что этот микроорганизм обладает эндоспорами и является спорообразующим. Этот микроорганизм является также «бродяжкой», так как после длительного инкубационного периода он имеет тенденцию распространяться по всей поверхности агара. С точки зрения родства с известными видами Bacillus, выделенный

штамм *Bacillus* имеет идентичность 92,0%. На основании биохимических профилей API, штамм *Bacillus* PB6 был предположительно идентифицирован как *B. subtilis*. Поэтому штамм *Bacillus* PB6 был депонирован как ATCC-РТА 6737 и назван там *Bacillus subtilis*. Заявка на патент США под серийным № 10/306365, поданная 27

Секвенирование гена 16 рРНК

Почти полная последовательность 16 рРНК *Bacillus* PB6 была составлена и выверена (SEQ ID NO:1, фиг.6).

Секвенирование GyrA

Частичные последовательности GyrA, полученные двумя различными группами, показаны на фиг.7 (SEQ ID NO:2) и фиг.8 (SEQ ID NO:3).

ДНК:ДНК гибридизация

Гибридизации выполняли в жестких условиях (при 40°C) в соответствии с модификацией способа, описанного Ezaki et al.⁴⁷ Процентные доли гомологии ДНК представляют собой среднюю величину минимум 4 гибридизаций. Величина, представленная в скобках, представляет собой разность между реципрокными величинами. При этой методике, среднее стандартное отклонение составляет 14 единиц.⁴⁸ Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 % гомология ДНК			
	% гомология ДНК		
<i>Bacillus</i> PB6	100		
<i>B. amyloliquefaciens</i> LMG 9814 ^T	75 (13)	100	
<i>B. velezensis</i> LMG 22478 ^T	90 (6)	80 (8)	100

Гомология ДНК выше 70%, общепринятый предел для очерчивания вида,⁴⁹ обнаруживается между *Bacillus* PB6, LMG 9814^T и LMG 22478^T.

По этим результатам, оказывается, что *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens* относятся к одному геновиду и поэтому являются субъективными синонимами, так что при применении номенклатурного правила 42 следует сохранить самое старое правильное название, т.е. *B. amyloliquefaciens*; и *Bacillus* PB6 (ATCC-РТА 6737) можно правильное отнести к виду *B. amyloliquefaciens*.

Тестирование антагонистических свойств *Bacillus amyloliquefaciens* анализом штриховой линии

Bacillus amyloliquefaciens PB6 высевали в виде прямой линии на чашки с триптоновым соевым бульоном с добавлением крови Tryptone Soy (Oxoid, Belgium) после 24-часовой инкубации при 37°C в аэробных условиях, различные индикаторные штаммы высевали перпендикулярно культуре *Bacillus* PB6. Пластины с посеянным видом *Clostridia* инкубировали в анаэробных условиях, используя Anaerogen Pak (Oxoid, Belgium). После инкубации в течение ночи при 37°C, антагонистические эффекты оценивали по появлению прозрачных зон, окружающих соединения штриховых линий, указывающих на ингибиторные эффекты одного организма против другого.

Экстракция и противомикробный скрининг вторичных метаболитов *Bacillus* PB6.

Bacillus PB6 выращивали на чашках с триптоновым соевым агаром с добавлением 5% бараньей крови (Oxoid, Belgium) в течение 24 часов при 37°C. Эту культуру использовали для посева в 100 мл триптонового соевого бульона с добавлением 0,6% дрожжевого экстракта (Oxoid, Belgium). После инкубации в

течение 24 часов в инкубаторе-качалке (100 об/мин) при 37°C, бульон смешивали (3 раза) с равными количествами простого диэтилового эфира (Acros, Belgium). После экстракции метаболитов, оба слоя разделяли, и эфирную фракцию собирали и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 минут.

Затем растворитель удаляли в вакууме, используя вращающийся испаритель. Остаток взвешивали и растворяли в диметилсульфокиде (Acros, Belgium), приводя к конечной концентрации 10000 мкг/мл неочищенного экстракта. Дальнейшие разведения (500, 250, 100, 50, 25 и 10 мкг/мл) производили в смеси DMSO/воды при соотношении 1/11. Наконец, 25 мкл каждого разведения переносили пипеткой в лунки титровочных микропланшет (LabSystems, Finland).

Бактериальные штаммы *Clostridium perfringens* ATCC13124 (C1600L, Oxoid, Belgium) и *Clostridium difficile* ATCC9689 (C1610L, Oxoid, Belgium) закупают в виде лиофилизированных культуральных петель и вносят в культуру в соответствии с инструкциями изготовителя. Из обеих культур готовили стандарт McFarland ($A_{625\text{nm}}=0,100$) в анаэробном основном бульоне (Oxoid, Belgium). 250 мкл этого стандарта добавляли к 10 мл свежего анаэробного основного бульона, и 225 мкл этой среды пипеткой переносили в лунки, получая конечную плотность клеток 5×10^5 КОЕ/мл в каждой лунке. Титровочные микропланшеты инкубировали в анаэробных условиях в течение 18 часов (*C. perfringens*) и 48 часов (*C. difficile*), используя Anaerogen Compact (Oxoid, Belgium) в непроницаемом для воздуха пластиковом мешочке. До и после инкубационного периода, измеряли оптическую плотность (OD) каждой лунки, используя анализатор Bioscreen C (LabSystems, Finland). Для измерения OD использовали белый свет (широкую полосу). Тесты проводили в двух повторениях, а также проводили контроль среды, среды плюс инокулята (отрицательный контроль) и положительный контроль; в тестируемую партию включали ванкомицин (Fluka, Belgium) в трех концентрациях (0,1, 0,5 и 1,0 мкг/мл). Минимальную ингибирующую концентрацию (MIC) определяли как самую низкую концентрацию, при которой не происходил рост или при которой не было выявлено увеличение OD.

Определение усиливающего эффекта кофактора на активность сурфактина

Эфирный экстракт продукта ферментации *B. amyloliquefaciens* PB6 отделяли препаративной TLC (тонкослойной хроматографией) (Kieselgel 60, 20×20 см, толщина слоя 2 мм). Используемый элюент представлял собой гексан/ацетон (30/70). Сурфактины выделяли в зоне с Rf от 0 до 0,33. MIC против *C. perfringens* сурфактинов, выделенных из этой зоны, составила от 10 до 25 мкг/мл. В другой зоне (Rf от 0,33 до 0,76) были обнаружены один или более продуктов, которые были неактивны против *C. perfringens* (MIC > 100 мкг/мл). Когда испытывали комбинацию продуктов обеих зон при конечной концентрации каждого из обоих экстрактов 10 мкг/мл, то роста *C. perfringens* не было. При объединении с этими продуктами, которые самостоятельно были неактивны, MIC сурфактинов снизилась до уровня ниже 10 мкг/мл.

Определение эффекта кислотной обработки на противомикробную активность сурфактина

Готовили раствор сурфактина 750 мкг/мл (Sigma) в ацетонитриле/0,1 N HCl (1/1; об/об). 0,5 мл этого раствора инкубировали при 37°C в течение 30, 60 или 90 минут, после чего добавляли 0,25 мл 0,1 N раствора NaHCO₃ и смесь смешивали, используя вихревую качалку. Проводили скрининг всех растворов для выявления активности против *Clostridium perfringens*.

Определение продукции энтеротоксина *Bacillus* PB6

Бактериальные штаммы и условия культуры. *Bacillus* PB6 выращивали в 100-мл объеме триптонного соевого бульона (Becton Dickenson and Company, Cockeysville, MD)

с добавлением 0,6% дрожжевого экстракта (Oxoid Limited, England) (TSBYE) и инкубировали при 37°C в инкубаторе-качалке, установленном на 100 об/мин. Один продуцирующий токсин штамм *B. cereus* ATCC 11778 также выращивали в TSBYE при 37°C в инкубаторе-качалке. Аналогичным образом, не продуцирующие токсин штаммы *B. cereus* ATCC 49064 и *Escherichia coli* ATCC 25922 также выращивали в TSBYE при 37°C в аэробных условиях. Все бактериальные штаммы, использованные в настоящем исследовании, еженедельно переносили в свежий TSBYE и затем держали в холодильнике при 4°C в качестве рабочей культуры. Свежие выращенные штаммы ресуспендировали в 40% глицерине и держали в морозильнике при -80°C для длительного хранения.

Продукция энтеротоксина. 1-мл объем выращенной в течение ночи тестируемой культуры высевали в 50 мл инфузионного сердечно-мозгового раствора (BHI) с добавлением 1% глюкозы (BHI-G) и инкубировали в инкубаторе-качалке (100 об/мин) в течение 6 часов при 32°C³¹. Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 5000×g в течение 10 минут, и супернатант собирали для исследований цитотоксичности клеток Vero³¹. Затем белки в супернатанте концентрировали в 10 раз, используя до 80% насыщенного раствора сульфата аммония (561 г на литр)³³. После центрифугирования при 10000×g в течение 20 минут супернатант удаляли и белковый осадок после центрифугирования ресуспендировали в 2,5 мл фосфатного буфера (20 мМ; pH 6,8). Остаточные соли сульфата аммония удаляли диализом против того же буфера при 4°C в течение 6 часов. Конечный объем диализованного белкового раствора доводили до одной десятой первоначального объема (5 мл), используя фосфатный буфер (20 мМ; pH 6,8)³¹.

Продукция рвотного токсина. 1-мл объем выращенной в течение ночи тестируемой культуры высевали в 50 мл инфузионного сердечно-мозгового раствора (BHI) с добавлением 1% глюкозы (BHI-G) и инкубировали в течение 6 часов при 32°C в инкубаторе-качалке, установленном на 250 об/мин. Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 2000×g в течение 10 минут при 4°C³¹. Супернатант собирали и затем автоклавировали при 121°C в течение 15 минут для удаления термолабильных энтеротоксинов²⁰. Подвергнутый термической обработке фильтрат, возможно, с устойчивым к нагреванию рвотным токсином собирали для анализа вакуолизации на клетках HEp-2²⁰.

Получение клеток Vero и HEp-2. Почечные клетки африканских зеленых мартышек (Vero) или HEp-2 (карцинома гортани человека) поддерживали в виде монослойных культур в 30 мл среды 199 с модифицированными по Earl солями (MEM), содержащей 2 мМ L-глутамин, 10 мМ бикарбоната натрия, 1% незаменимых аминокислот, 100 МЕ/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 3 мл фетальной телячьей сыворотки (10%). Лишенную лейцина среду (MEM) получали на основании минимально эссенциальной среды (Gibco), которая также содержала 1,8 мМ CaCl₂, 0,4 мМ MgCl₂, 5,0 мМ KCl, 0,12 М NaCl, 3,2 мМ NaH₂PO₄ и 20 мМ Hepes (pH 7,7). Клетки Vero или HEp-2 инкубировали в MEM при 5% CO₂ при 37°C. Слившиеся монослойные культуры клеток Vero или HEp-2 субкультивировали удалением сред перед промыванием 5 мл PBS (солевым раствором с фосфатным буфером (pH 7,7)). Затем клетки Vero или HEp-2 отсоединяли от культуральной

колбы добавлением 2 мл раствора трипсина (0,25% трипсин; 0,025% EDTA (этилендиаминтетрауксусной кислоты)). Уровни открепленных клеток Vero или HEp-2 определяли микроскопически перед добавлением среды MEM (8 мл) для предотвращения дальнейшего воздействия трипсина. Затем 5-мл аликвотное количество вновь трипсинизированных клеток Vero или HEp-2 переносили в новую культуральную колбу, содержащую 15 мл MEM, для инкубации при 37°C в среде 5% CO₂.

Визуальный иммуноанализ диарейного энтеротоксина (BDE) TECRA® Bacillus.

Все компоненты тестирующего набора (TECRA International Pte Ltd, Chatswood, NSW, Australia) держали при 20-25°C перед тестированием образцов на наличие BDE. Как указано изготовителем, титровочные микроячейки, содержащие высокоаффинные антитела, специфичные к BDE, предварительно вымачивали в промывном растворе, предоставленном в наборе, и давали возможность постоять в течение 10 минут при 20-25°C. Лунки опорожняли перед тем, как аликвотные количества, содержащие 200-мкл объем тестируемых образцов и контролей (положительных и отрицательных), переносили в отдельные лунки. Лунки инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Лунки промывали 4 раза перед добавлением в каждую лунку аликвотного количества 200 мкл конъюгата и инкубировали при 25°C в течение 1 часа. Каждую лунку промывали 5 раз перед добавлением 200 мкл субстрата в каждую лунку и инкубировали при 25°C в течение 30 минут. Через 30 минут колориметрическое проявление по каждой лунке сравнивали с цветовой картой TECRA, предоставленной в тестирующем наборе.

Обращенная пассивная латексная агглютинация энтеротоксина

оксидной Bacillus cereus (BCET-RPLA). Был разработан тест для выявления диарейного энтеротоксина Bacillus cereus обращенной пассивной агглютинацией (RPLA) (Unipath, Basingstoke, UK). Полистироловые латексные частицы сенсibilизируют очищенной антисывороткой от кроликов, иммунизированных диарейным энтеротоксином от B.cereus. Набор также предоставлял и положительный (энтеротоксин), и отрицательный (латексные частицы без специфического антиэнтеротоксина B.cereus) контроли. Аликвотные количества, содержащие 25 мкл образцы разбавителя и теста или контроля (положительного и отрицательного), последовательно вносили в 2 различных набора V-луночных титровочных микропланшет. Затем растворы, содержащие 25 мкл сенсibilизированного латекса и латексного контроля, вносили соответственно в первый и второй набор V-луночных титровочных микропланшет. Каждую лунку исследовали на наличие агглютинации через 20-24 часа инкубации при 25°C.

Измерение цитотоксичности. Вновь трипсинизированные клетки Vero ресуспендировали в 30 мл лишенной лейцина среды (MEM). 1 мл суспензии клеток Vero переносили в каждую из 24 лунок (~5×10⁴ клеток на лунку). Клетки промывали один раз 1 мл лишенной лейцина MEM и инкубировали в течение 2 часов при 37°C в среде 5% CO₂. Через 2 часа ростовую среду удаляли, и каждую лунку промывали один раз 1 мл лишенной лейцина MEM. 1-мл объем предварительно нагретой (37°C) лишенной лейцина MEM добавляли в каждую лунку с последующим добавлением сразу за ней 50 мкл супернатанта или фильтрата Bacillus amyloliquefaciens PB6, B.cereus ATCC 11778, B.cereus ATCC 49064 и E.coli ATCC 25922. Лунки с посевом инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 2 часов. После 2 часов инкубации супернатант обработанных фильтратом клеток Vero однократно промывали 1 мл предварительно нагретой (37°C) лишенной лейцина MEM. В

каждую из лунок добавляли объем 300 мкл раствора, содержащего меченный радиоактивным изотопом (16 мкл ^{14}C -лейцина в 8 мл лишенной лейцина MEM) (Perkin Elmer Asia, Singapore). Меченные ^{14}C -лейцином клетки Vero инкубировали при 37°C без CO_2 в течение 1 часа, и затем ростовую среду удаляли. В последующем, в каждую лунку, содержащую меченные ^{14}C -лейцином клетки Vero, добавляли 1-мл аликвотные количества раствора, содержащего трихлоруксусную кислоту, перед инкубацией при 25°C в течение 10 мин. После 10 минут инкубации содержимое каждой лунки промывали дважды 1 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты. Затем в каждую лунку добавляли 300-мкл объем 0,1 М КОН и инкубировали при 25°C в течение еще 10 мин. После 10-минутной инкубации, в каждую лунку добавляли 2-мл объем сцинтилляционной жидкости. Наконец, все содержимое из каждой лунки переносили в сцинтилляционные пробирки. Сцинтилляционные пробирки встряхивали в течение 1 минуты перед выполнением подсчетов радиоактивности. Ингибирование в процентах захвата ^{14}C -лейцина клетками Vero рассчитывали, используя следующую формулу.

Ингибирование в процентах захвата ^{14}C -лейцина = $\frac{[(\text{импульсов/мин для клеток Vero без добавления токсина} - \text{импульсов/мин для тестируемого образца})]}{[\text{импульсов/мин для клеток Vero без добавления токсина}]} \times 100\%$. Из количества импульсов/мин, используемого для расчета ингибирования в процентах захвата ^{14}C -лейцина клетками Vero, необходимо вычесть величину фоновых импульсов (~30-60 импульсов/мин). Токсина нет, если ингибирование захвата ^{14}C -лейцина составляет менее чем 20% после десятикратной концентрации. Каждый анализ проводили в двух повторениях. Результаты представлены в таблицах 8 и 9.

Таблица 8

Воздействие на бактериальный фильтрат на линии клеток Vero и Нер-2

Бактерии	Клетки Vero		Клетки Нер-2	
	Цитотоксический эффект		Вакуольная реакция	
	1 час	24 часа	6 часов	24 часа
Bacillus amyloliquefaciens PB6	- ^a	-	-	-
Escherichia coli ATCC 25922	-	-	-	-
Bacillus cereus ATCC 11778	-	-	-	-
Bacillus cereus ATCC 49064	++ ^b	++++	-	+++

^a “-” указывает на отсутствие цитотоксического эффекта или присутствие наблюдаемых вакуолей
^b “+” указывает на разрушение клеток Vero или произошедшую продукцию вакуолей в клетках Нер-2

Таблица 9

Ингибирование в % захвата изотопа ^{14}C -лейцина

Концентрированные фильтраты бактерий	Ингибирование в % ^a
Bacillus amyloliquefaciens PB6 ^b	1
Escherichia coli ATCC 25922 ^c	1
Bacillus cereus ATCC 11778 ^d	17
Bacillus cereus ATCC 49064 ^e	100

^a Токсин из испытанного штамма считается отрицательным, если ингибирование захвата ^{14}C -лейцина составляет менее чем 20% после десятикратной концентрации (отчет SCAN)
^b Тестируемые микроорганизмы
^c отрицательные и ^e положительные контроли и
^d штамм, не продуцирующий токсин.

Анализ вакуолизации клеток Нер-2. 25-мкл объем, содержащий фильтраты из

тестируемых и контрольных культур, серийно разбавляли (в 2 раза) в 0,15 М растворе NaCl и распределяли по лункам 96-луночной планшеты для культуры ткани (Gibco Ltd., Uxbridge, UK). Объемы, содержащие 100 мкл вновь трипсинизированных клеток Нер-2, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 24 часов при 37°C. Все анализы вакуолизации выполняли в двух повторениях. Микроскопические исследования для выявления присутствия образования вакуолей в клетках Нер-2 проводили через 6-часовые и 24-часовые интервалы.

Способы на основе PCR. Разработали затравки PCR для негемолитического энтеротоксина NheB-nheC)^{25,26}, гемолизин BL(HblD-hblA)^{10,11} и энтеротоксин К (EntK)^{27,28}. Последовательности затравок NheB-nheC представляли собой 5'CGGTTTCATCTGTTGCGACAGC3' и 3'GTCCTCGTGTTCGTCTTC-AGC5'.

Последовательности затравок HblD-hblA представляли собой 5'CGCT-CAAGAACAAGTAGG3' и 3'TCCCTAATGT-CTAAATGTTCTC5'. Прямые и обратные затравки для EntK представляли собой соответственно 5'GAATTACGTTGGCGAATC3' и 3'CGGG-CGGATGGGA5'.

Пробирки PCR образца и положительного контроля, содержащие ДНК *Bacillus amyloliquefaciens* PB6, и токсигенные штаммы *B. cereus* ATCC 11778 и *B. cereus* ATCC 49064, помещали в термический цилиндр Perkin-Elmer (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) при первоначальной точке установки температуры 90°C. Условия чередования термических циклов представляли собой 1 цикл при 94°C в течение 2 минут с последующими стандартными 38 температурными циклами 94°C в течение 15 секунд и 70°C в течение 3 минут. После амплификации, выполняли конечное удлинение цикла при 72°C до 7 минут. Стадия амплификации PCR требовала для завершения приблизительно 3 часов. Аликвотные количества (15 мкл) каждого продукта реакции и 15 мкл стандартной лестницы ДНК (500, 1031, 2000 и 3000 пар оснований) затем подвергали электрофорезу при 180 вольтах в течение 1 часа через 2% агарозный гель (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD), содержащий 0,1 мкг/мл этидия бромид (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). После электрофореза, все гели осматривали, используя УФ-просвечивающее устройство (длина волн - 302 нм) (UVP Model White/2 UV; UVP Inc., Upland, CA), и затем фотографировали, используя камеру Polaroid MP-4 (Polaroid Corp., Cambridge, MA) (см. фиг.9, фиг.10 и фиг.11).

Пример 2

Определение противомикробных свойств метаболитов различных пробиотиков и *Bacillus amyloliquefaciens* PB6 против *Clostridium perfringens* и *Clostridium difficile* посредством способа микроразведения бульона

В этом исследовании заявители изучали свойства против клостридий метаболитов из *Bacillus* PB6 и четырех имеющихся в продаже пробиотиков: Bactisubtil® (Sanofi-synthelabo), Perenterol® (Biodiphar), Bioplus 2B (Miavit GmbH) и Biosporinum (Dniprofarm).

Мелкомасштабные ферментации проводили с видами, выделенными из различных пробиотиков. Проводили скрининг эфирных экстрактов ферментационного бульона, содержащих метаболиты, против *C. perfringens* ATCC13124 (2) и *C. difficile* ATCC9689, используя способ микроразведения бульона. Метаболиты *B. PB6* проявили значительные антиклостридионные свойства. Минимальные ингибирующие концентрации находились между 2,5 и 5,0 мкг/мл в отношении *C. perfringens* и между 5,0 и 10,0 мкг/мл в отношении *C. difficile*. Эфирные экстракты ферментации из Bactisubtil®, Perenterol®, Bioplus 2B и Biosporinum не имели какой-либо значимой

противобактериальной активности против обоих видов клостридий.

Хотя виды *Clostridium* являются по природе убиквистами, их основной средой обитания являются почва и кишечные тракты многих животных и людей. ШироКОЕ распространение встречаемости *C. perfringens*, включая ее споры, в образцах почвы почти гарантирует частое присутствие этого организма на поверхностях, подвергаемых пылевому загрязнению, включая многие пищевые продукты.⁵⁰ *C. perfringens* представляет собой также вид, чаще всего выделяемый из человеческих клинических образцов, исключая фекалии. Он встречается в широком разнообразии клинических сред в диапазоне от простого загрязнения ран до травматического мышечного некроза, внутрибрюшного сепсиса, внутрисосудистого гемолиза, аспирационной пневмонии, некротизирующей пневмонии и т.д.⁵¹

C. difficile представляет собой основную причину связанной с антибиотиками диареи (AAD) и является также наиболее часто идентифицируемой причиной приобретенной в стационаре диареи. При заболевании, связанном с *C. difficile* (CDAD), первичное инициирующее явление включает разрушение защитной кишечной флоры во время лечения антибиотиками. Так как уровень антибиотика падает ниже ингибирующих концентраций, то больничные патогены, такие как *C. difficile*, способны расти. Колонизация происходит фекально-оральным путем, попавшие внутрь споры выживают в барьере желудочной кислоты и начинают расти в ободочной кишке.^{52,53} Токсигенные, а также нетоксигенные изоляты способны образовывать споры и существовать в больничной среде. В результате, любой тип может инфицировать ободочную кишку и утилизировать доступные питательные вещества ввиду отсутствия конкуренции со стороны нормальной флоры. Неясно, прикрепляется ли организм к стенке ободочной кишки, но более вероятно, что организм растет по всему просвету ободочной кишки. Токсигенные штаммы продуцируют и высвобождают токсины А и/или В по мере роста и лизиса клеток. Эта активность, наряду с воспалительной реакцией, приводит к патогистологическим явлениям, ведущим к диарее и колиту, связанным с *C. difficile*.^{54,55,56}

«Пробиотиком», по общепринятому определению, является «живая микробная» кормовая или пищевая добавка, которая благоприятно воздействует на организм путем улучшения его кишечного микробного баланса. Но как работает пробиотик? Влияние пробиотиков на кишечную экосистему каким-то благоприятным образом воздействует на потребителя. Был предложен ряд возможных благоприятных воздействий, возникающих в результате изменений кишечной среды, благодаря пробиотикам, включающих: повышенную устойчивость к инфекционным заболеваниям, в частности, кишечника, уменьшение продолжительности диареи, снижение артериального давления, снижение концентрации холестерина в сыворотке, уменьшение аллергии и т.д.⁵⁷

Сравнительное исследование, описанное в этой статье, было проведено для сравнения противомикробных свойств различных пробиотических ферментационных экстрактов в отношении видов клостридий.

Методы и материалы

Bacillus PB6 и штамм *Bacillus cereus*, выделенный из Bactisubtil® (Sanofi-synthelabo) выращивали на чашках с триптоновым соевым агаром с добавлением 5% бараньей крови (Oxoid, Belgium) в течение 24 часов при 37°C. Кормовой пробиотик Bioplus 2B содержал 2 различных вида, *Bacillus licheniformis* DSM5749 и *Bacillus subtilis* DSM5750. Оба вида также выращивали на чашках с триптоновым соевым агаром с

добавлением 5% бараньей крови (Oxoid, Belgium) в течение 24 часов при 37°C. Смесь этих культур использовали для посева в 100 мл триптинового соевого бульона с добавкой 0,6% дрожжевого экстракта (Oxoid, Belgium). Биоспорин также содержит 2 вида, т.е. *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis*. Этот продукт поступает в продажу в виде лиофилизированных культур в стеклянных флаконах. Содержимое одного флакона ресуспендировали в бульоне, эту смесь использовали для посева в 100 мл триптинового соевого бульона с добавкой 0,6% дрожжевого экстракта (Oxoid, Belgium). После инкубации всех пробиотиков в течение 24 часов в инкубаторе-качалке (100 об/мин) при 37°C, бульон смешивали (3 раза) с равными количествами простого диэтилового эфира (Acros, Belgium). После экстракции метаболитов, оба слоя отделяли и эфирную фракцию собирали и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 минут.

Затем, растворитель удаляли в вакууме, используя вращающийся испаритель. Остаток взвешивали и растворяли в диметилсульфоксиде (Acros, Belgium), получая конечную концентрацию 10000 мкг/мл неочищенного экстракта. Дальнейшие разведения (500, 250, 100, 50, 25 и 10 мкг/мл) готовили в смеси DMSO/воды при соотношении 1/12. Наконец, 25 мкл каждого разведения пипеткой переносили в лунки титровочных микропланшет (Labsystems, Finland). *Saccharomyces boulardii*, использованный в Perenterol® (Biodiphar) выращивали на декстрозном агаре Sabouraud (Oxoid, Belgium) в течение 48 часов при 37°C. Эту культуру использовали для засева 100 мл жидкой среды Sabouraud (Oxoid, Belgium). После инкубации в течение 2 дней в инкубаторе-качалке (100 об/мин) при 37°C, такую же процедуру выполняли для экстракции метаболитов.

Бактериальные штаммы *Clostridium perfringens* ATCC13124 (C1600L, Oxoid, Belgium) и *Clostridium difficile* ATCC9689 (C1610L, Oxoid, Belgium) закупают в виде лиофилизированных культуральных петель и вносят в культуру в соответствии с инструкциями изготовителя. Из обеих культур готовили стандарт McFarland ($A_{625\text{ нм}}=0,100$) в анаэробном основном бульоне (Oxoid, Belgium). 250 мкл этого стандарта добавляли к 10 мл свежего анаэробного основного бульона, и 225 мкл этой среды пипеткой переносили в лунки, получая конечную плотность клеток 5×10^5 КОЕ/мл в каждой лунке. Титровочные микропланшеты инкубировали в анаэробных условиях в течение 18 часов (*C. perfringens*) и 48 часов (*C. difficile*), используя Anaerogen Compact (Oxoid, Belgium) в непроницаемом для воздуха пластиковом мешочке. До и после инкубационного периода измеряли оптическую плотность (OD) каждой лунки, используя анализатор Bioscreen C (Labsystems, Finland). Для измерения OD использовали белый свет (широкую полосу). Тесты проводили в двух повторениях, а также проводили контроль среды, среды плюс инокулята (отрицательный контроль) и положительный контроль; в тестируемую партию включали ванкомицин (Fluka, Belgium) в трех концентрациях (0,1, 0,5 и 1,0 мкг/мл). Минимальную ингибирующую концентрацию (MIC) определяли как самую низкую концентрацию, при которой не происходил рост, или при которой не было выявлено увеличение OD.

Результаты и обсуждение

Сильное увеличение OD отмечали в отрицательном контроле для обоих видов. В лунках, содержащих 1,0 и 0,5 мкг/мл ванкомицина, рост не происходил, 0,1 мкг/мл ванкомицина не ингибировал рост *C. perfringens*. В лунках, содержащих 1 и 2,5 мкг/мл РВ6-экстракта, происходил нормальный рост *C. perfringens*. От 5 мкг/мл и выше, невозможно было отмечать рост *C. perfringens*. MIC неочищенного

ферментационного экстракта PB6 против *C. perfringens* составила от 2,5 до 5,0 мкг/мл. Также для *C. difficile* отмечалось сильное увеличение OD в лунках отрицательного контроля. В лунках, содержащих 1,0 и 0,5 мкг/мл ванкомицина, рост не происходил, 0,1 мкг/мл ванкомицина не ингибировал рост. В лунках, содержащих 1 и 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл неочищенного PB6-экстракта, происходил нормальный рост *C. difficile*. От 10 мкг/мл и выше невозможно было отмечать рост. МИС эфирного экстракта метаболитов PB6 против *C. difficile* составила от 5,0 до 10 мкг/мл. Эфирные экстракты из Bactisubtil® (*B. cereus*), Perenterol® (*S. boulardii*), Bioplus 2B (*Bacillus licheniformis* DSM5749 и *Bacillus subtilis* DSM5750) и Biosporinum (*Bacillus licheniformis* sp. и *Bacillus subtilis* sp.) не обладали какой-либо значимой противобактериальной активностью для всех испытанных концентраций. МИС составила более 50 мкг/мл для обоих испытанных видов клостридий. Эти результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 Результаты скрининга неочищенных экстрактов против <i>C. perfringens</i> и <i>C. difficile</i>					
	МИС (мкг/мл)				
	Bacillus PB6	Bactisubtil®	Perenterol®	Bioplus 2B	Biosporinum
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	2,5-5	>50	>50	>50	>50
<i>C. difficile</i> ATCC9689	5-10	>50	>50	>50	>50

Вывод

Заявители исследовали антиклостридиальные свойства эфирных экстрактов из *B. PB6*, Bactisubtil® (*B. cereus*), Perenterol® (*S. boulardii*), Bioplus 2B (*B. licheniformis* DSM5749 и *B. subtilis* DSM5750) и Biosporinum (*Bacillus licheniformis* sp. и *Bacillus subtilis* sp.). Была проведена ферментация лабораторного масштаба с этими видами, и проводили скрининг эфирных экстрактов против *C. perfringens* ATCC13124 и *C. difficile* ATCC9689, используя методики микроразведения бульона. Метаболиты *B. PB6* обладают сильными антиклостридиальными свойствами, МИС находятся в диапазоне от 2,5 до 5,0 мкг/мл в отношении *C. perfringens* и от 5,0 до 10,0 мкг/мл в отношении *C. difficile*. Эфирные экстракты из ферментаций Bactisubtil®, Perenterol®, Bioplus 2B и Biosporinum не имели какого-либо значимого эффекта против *C. perfringens* ATCC13124 и *C. difficile* ATCC9689.

Пример 3

Эффективность Bacillus PB6 против IBD

Известно, что сурфактин ингибирует активность PLA₂ (фосфолипазы A₂), фермента принимающего центральное участие во многих воспалительных процессах.⁵⁸ Ингибирование воспалительных процессов делает продуцирующие сурфактин пробиотики представляющими большой интерес для лечения воспалительных заболеваний, таких как воспалительное кишечное заболевание (IBD).

Воспалительное кишечное заболевание относится к двум хроническим заболеваниям, которые вызывают воспаление кишечника: язвенный колит (UC) и болезнь Крона (CD). Хотя эти заболевания имеют некоторые общие признаки, существуют некоторые важные различия.

CD представляет собой хроническое воспаление кишечной стенки, обычно поражающее всю толщину кишечной стенки. Обычное всего, она возникает в самой нижней части тонкой кишки (подвздошной кишке) и в толстой кишке, но она может возникнуть в любой части пищеварительного тракта от ротовой полости до анального отверстия и кожи вокруг него.

В последние десятилетия, CD стала более распространенной и в западных, и в развивающихся странах. Она возникает приблизительно одинаково у обоих полов и чаще встречается среди евреев. Большинство случаев начинаются в возрасте до 30 лет; большинство случаев заболевания начинается в возрасте от 14 до 24 лет.

У каждого человека заболевание поражает определенные области кишечника, иногда со здоровыми областями (пропущенными областями), находящимися между пораженными зонами. Примерно у 35% лиц, страдающих CD, поражена только подвздошная кишка. Примерно у 20% поражена только толстая кишка. Примерно у 45% пациентов поражена и подвздошная кишка, и толстая кишка.

Причины CD неизвестны. Исследования были сосредоточены на трех основных возможностях: дисфункции иммунной системы, инфекции и рационе.

Самыми частыми ранними симптомами CD являются хроническая диарея, боль в животе, лихорадка, потеря аппетита и потеря массы тела. Симптомы CD отличаются у разных пациентов, но имеется 4 общих типа:

- воспаление с болью и повышенной чувствительностью в правой нижней части брюшной полости;
- рецидивирующие острые кишечные обструкции, которые вызывают тяжелые болезненные спазмы кишечной стенки, вздутие живота, запор и рвоту;
- воспаление и хроническая частичная кишечная непроходимость, вызывающая алиментарную дистрофию и хроническую потерю трудоспособности;
- патологические свищи и абсцессы, которые часто вызывают лихорадку, болезненные объемные образования в брюшной полости, и тяжелая потеря массы.

UC представляет собой хроническое заболевание, при котором толстая кишка становится воспаленной и изъязвленной, приводя к эпизодам кровавой диареи, спазмам в брюшной полости и лихорадке. Заболевание может начаться в любом возрасте, но обычно начинается в возрасте от 15 до 30 лет.

В отличие от CD, UC обычно не поражает полную толщину кишечника и не поражает тонкую кишку. Заболевание обычно начинается в прямой кишке или сигмовидной кишке и, в конечном счете, распространяется частично или полностью по толстой кишке. У некоторых пациентов, уже на ранних сроках поражается большая часть толстой кишки.

Примерно у 10% пациентов, у которых, как оказывается, имеется UC, происходит один приступ. Однако часть таких пациентов может в действительности иметь не выявленную инфекцию, а не истинный UC. У большинства пациентов UC представляет собой хроническое заболевание, которое со временем появляется и исчезает. Причины UC остаются неизвестными. Этиологическими факторами считаются наследственность и избыточно активные иммунные реакции.

Определение эффективности in vivo перорально введенной Bacillus PB6 при лечении колита, вызванного TNBS у крыс (модели колита у людей)

В этом эксперименте изучали эффективность PB6 против колита, вызванного у крыс ректальным введением 2,4,5-тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS).

Структура исследования

Провели 2 последовательных испытания. Самцов крыс Wistar получали из центра выращивания лабораторных животных National Centre for Laboratory Animal Sciences (Hyderabad, India) (испытание 1) или из департамента ветеринарии Department of Animal Medicine, TANUVAS (Chennai, India) (испытание 2). В начале периода лечения, возраст животных составлял от 10 до 12 недель. После поступления животных в лабораторию для тестирования проводили их полное клиническое обследование под

наблюдением ветеринара для гарантии того, что они были в хорошем состоянии. Животные адаптировались к условиям исследования в течение периода, по меньшей мере, 7 дней. На испытание животных методом рандомизации включали в одну из групп исследования. Животных содержали по группам исследования в поликарбонатных клетках (421×290×190 мм, длина × ширина × высота). В помещении для содержания животных и помещения для испытания были установлены следующие условия: температура 22±3°C, относительная влажность: 50±20%, цикл света/темноты: 12 часов/12 часов (свет с 07.00 по 19.00) и вентиляция: приблизительно 7 циклов/час поступления фильтрованного, не рециркулирующего воздуха. Все животные имели свободный доступ (за исключением голодания в течение ночи перед введением TNBS) к гранулированному корму для крыс из Национального института питания (NIN, Hyderabad, India) и без ограничения получали очищенную воду Aquaguard. В обоих испытаниях день индукции колита обозначали как день 1. Колит после голодания в течение ночи вызывали с использованием однократного интаректального введения TNBS в дозе 100 мг/кг массы тела, на 8 см проксимальнее анального отверстия. Контрольным группам без колита в день 1 интаректально вводили солевой раствор (однократно 0,5 мл на животное). Контрольным группам без колита и с колитом перорально вводили дистиллированную воду в дозе 10 мл/кг 3 раза/день с интервалами между введениями 4 часа, начиная с 1-го дня и по 7-й день включительно. В первом испытании, группы с колитом, вызванным TNBS, лечили PB6 (соответственно, 1,5·10⁸ КОЕ/кг или 10⁹ КОЕ/кг), 3 раза/день с интервалами между введениями 4 часа, начиная с 1-го дня и по 7-й день включительно; месалазином (250 мг/кг/день), начиная с 1-го дня и по 7-й день включительно; или инфликсимабом (3 мг/кг) в виде одной дозы в 1-й день. Второе испытание частично повторяло первое относительно лечения PB6 (1,5·10⁸ КОЕ/кг), месалазином и инфликсимабом и включало дополнительное лечение *S. boulardii* (1,5·10⁸ КОЕ/кг) 3 раза/день с интервалами между введениями 4 часа, начиная с 1-го дня и по 7-й день включительно. Первую или единственную (в случае инфликсимаба) дозу лечения вводили в пределах 2 (дистиллированная вода, PB6, *S. boulardii* и месалазин) или 3 (инфликсимаб) часов после введения TNBS. За исключением инфликсимаба, который инъецировали внутривенно⁵⁹, все виды лечения проводили перорально. Для выявления клинических признаков и смертности наблюдения проводили дважды в день. Массу тела животных регистрировали в 1-й, 4-й и 7-й день. На 8-й день животных умерщвляли и иссекали сегмент ободочной кишки длиной 5 см (от 10 до 5 см проксимальнее анального отверстия). Эти сегменты продольно вскрывали. Содержимое удаляли промыванием солевым раствором и проводили балльную оценку макроскопической морфологии с использованием следующей шкалы: 0 - нет язв или воспаления, 1 - нет язв, только локальная гиперемия, 2 - изъязвление без гиперемии, 3 - изъязвление и воспаление только в одном участке, 4 - 2 или более участков изъязвления и воспаления и 5 - изъязвление, простирающееся более чем на 2 см. Регистрировали также массу каждого 5-см сегмента ободочной кишки для оценки вызванного воспалением отека.

Тестируемые препараты

5% TNBS (мас./об.) в воде (Sigma-aldrich, St Louis, USA) разбавляли до 2,5% раствора 50% этанолом. Объем дозы составлял 4 мл/кг массы тела. Сухую PB6 (Kemin Health, Des Moines, USA), ферментационный бульон *Bacillus* "PB6", высушенный на мальто- и циклодекстриновом носителе, суспендировали в

дистиллированной воде до концентрации $1,5 \cdot 10^7$ и $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Объем дозы составил 10 мл/кг массы тела. *Saccharomyces boulardii* (Enterol®, Biodiphar, Brussel, Belgium) суспендировали в дистиллированной воде до концентрации $1,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Объем дозы составил 10 мл/кг массы тела. Таблетки месалазина (Mesacol®, Sun Pharmaceutical Ind. Ltd, Mumbai, India) истирали в порошок, используя ступку и пестик, и готовили раствор в дистиллированной воде, содержащий 25 мг 5-аминосалициловой кислоты на 1 мл. Объем дозы составил 10 мл/кг массы тела. Remicade® (инфликсимаб) (Centocor B.V., Leiden, The Netherlands) сначала растворяли 10 мл воды для инъекций и затем разбавляли до концентрации 2 мг/мл, используя солевой раствор. Использованный объем дозы составлял 1,5 мл/кг массы тела. Все зависимые от массы тела дозы вводили на основании последней установленной индивидуальной массы тела. Свежие препараты получали перед каждым введением. Перед каждым введением препараты энергично перемешивали.

Результаты и обсуждение

В первом испытании одна из крыс, получавших лечение инфликсимабом, погибла на 2-й день. Этому животному ввели вторую инъекцию в 1-й день, потому что при первой инъекции раствор препарата вытек наружу. У некоторых животных после индукции колита TNBS проявлялись легкие признаки диареи. Количество зарегистрированных наблюдений диареи (и количество пораженных животных) в различных группах лечения с 1-го дня до 7-го дня включительно составило в первом испытании 0, 22(2), 4(1), 0, 0 и 8(1) соответственно для контроля без колита, контроля с колитом, PB6 $3 \times 1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/кг/день, PB6 $3 \times 1,5 \cdot 10^9$ КОЕ/кг/день, месалазина 250 мг/кг/день 3 мг/кг и одной дозы инфликсимаба, а во втором испытании 0, 42(4), 10(1), 34(3), 12(1) и 24(2) соответственно для контроля без колита, контроля с колитом, PB6 $3 \times 1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/кг/день, *S. boulardii* $3 \times 1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/кг/день, месалазина 250 мг/кг/день 3 мг/кг и одной дозы инфликсимаба. В группе с колитом проявилась существенная потеря массы тела, сопровождающая колит. В испытании 1 эта потеря была выше, чем в испытании 2, что может быть связано с различием возраста и скорости роста в момент индукции колита. Более низкая масса тела в целом в начале и более высокая прибавка массы тела в процентном выражении в течение периода испытания контрольной группы без колита в испытании 1, вероятно, указывает на то, что эти животные в среднем были несколько моложе, чем животные в испытании 2. Хотя обычные виды лечения в испытании 1 значительно подавляли отрицательный эффект колита на прибавку массы тела, в испытании 2 это наблюдалось только в случае лечения PB6 (таблица 11).

Таблица 11

Средняя масса тела (г) и средняя прибавка массы тела (%) с их стандартным отклонением

	Средняя масса тела (г)			Средняя прибавка массы тела (%)
Испытание 1	День 1	День 4	День 7	День 1-7
Контроль без колита	178±17	191±13*	203±13*	14,3±4,5*
Контроль с колитом	182±15	167±16	159±18	-13,0±4,5
PB6 $1,5 \times 10^8$ CFU/кг	180±13	186±13	195±10*	8,8±8,0*
PB6 $1,5 \times 10^9$ CFU/кг	180±16	187±15	199±17*	10,3±1,1*
Месалазин	181±11	187±10	196±10*	8,8±1,4*
Инфликсимаб	180±14	183±7	186±6*	1,3±5,4*
Испытание 2	День 1	День 4	День 7	День 1-7
Контроль без колита	207±20	210±19	214±17	3,5±1,8*

Контроль с колитом	208±21	196±21	193±19	-7,5±3,2
PB6 1,5×10 ⁸ CFU/кг	206±23	206±23	212±26	2,9±3,1*
S. boulardii	207±17	196±16	195±24	-5,7±5,6
Месалазин	207±12	199±18	201±20	-3,3±5,5
Инфликсимаб	208±15	197±14	197±13	-5,2±3,4
*Значимо отличается от группы положительного контроля (Dunnett, P<0,05).				

Большее воздействие колита на животных в испытании 1, вероятно, оставило больше возможностей для улучшения под влиянием любого из видов лечения. PB6 и месалазин всегда приводили к массе сегмента ободочной кишки и балльной оценке макроскопической морфологии стенки ободочной кишки, которые можно ясно отличить от этих показателей контрольной группы с колитом (таблица 12).

Таблица 12 Средняя балльная оценка макроскопической морфологии стенки ободочной кишки и средняя влажная масса 5 см сегмента ободочной кишки		
	Балльная оценка макроскопической морфологии	Влажная масса (г)
Испытание 1		
Контроль без колита	0,2±0,4*	0,378±0,047*
Контроль с колитом	3,8±0,8	1,406±0,209
PB6 1,5×10 ⁸ CFU/кг (после индукции)	1,0±0,0*	0,443±0,063*
PB6 1,5×10 ⁹ CFU/кг (после индукции)	0,6±0,5*	0,513±0,317*
Месалазин	0,8±0,4*	0,435±0,052*
Инфликсимаб	3,0±1,4	1,055±0,490
Испытание 2		
Контроль без колита	0,0±0,0*	0,274±0,049*
Контроль с колитом	3,4±1,1	0,832±0,216
PB6 1,5×10 ⁸ CFU/кг	0,6±0,5*	0,280±0,039*
S. boulardii	2,8±1,3	0,735±0,221
Месалазин	1,2±0,8*	0,445±0,145*
Инфликсимаб	2,0±0,7	0,657±0,076
*Значимо отличается от группы положительного контроля (Dunnett, P<0,05).		

Состояние стенки ободочной кишки у крыс с колитом, вызванным TNBS, получавших лечение PB6 и месалазином было морфологически таким же, как состояние стенки ободочной кишки у крыс без колита. По неизвестной причине, лечение месалазином было несколько менее эффективным в испытании 2, приводя к некоторому изъязвлению. Визуальное обследование вскрытых в продольном направлении сегментов ободочной кишки ясно показало изъязвления и области некротической ткани, присутствующие в группах положительного контроля, лечения S. boulardii и инфликсимабом, и их отсутствие в группах PB6 и группе месалазина в испытании 1. В испытании 1 у одной из крыс, получавших лечение инфликсимабом, балльная оценка макроскопической морфологии составила 1, а масса сегмента ободочной кишки 0,402 г. Эти данные свидетельствуют о том, что у этого конкретного животного лечение инфликсимабом было успешным или что колит не был вызван. В конце периода лечения, средняя прибавка массы тела и данные массы сегмента ободочной кишки крыс, получавших лечение инфликсимабом, были промежуточными между данными контрольной группы без колита и контрольной группы с колитом в обоих испытаниях. Это, вероятно, указывает на то, что имелся некоторый эффект инфликсимаба, хотя статистически не значимый в этих испытаниях. В аналогичном испытании у крыс, где инфликсимаб вводили в той же дозе 3 мг/кг внутривенно за 2 дня до индукции колита TNBS, было

показано, что он оказывает некоторый эффект на макроскопическую морфологию ободочной кишки, но значимо не снижает уровень отека ниже отека контрольной группы с колитом.¹⁹ В сегментах ободочной кишки крыс, получавших лечение PB6, изъязвления не было. В большинстве из этих сегментов наблюдалась только гиперемия. PB6 отчетливо ослабляет воспаление в стенке ободочной кишки крыс, вызванное интаректальным введением TNBS. Эффективность 7-дневного лечения $3 \times 1,5 \cdot 10^9$ КОЕ/кг/день после индукции, наблюдавшаяся в предыдущем испытании, была подтверждена в испытании 1.²⁰ Хотя в результате такого же предыдущего испытания был сделан вывод о неэффективности 7-дневного лечения PB6 $3 \times 8 \cdot 10^7$ КОЕ/кг/день после индукции, увеличение дозы до $3 \times 1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/кг/день оказалось в обоих текущих испытаниях достаточным для снижения воспаления в такой степени, что данные этого лечения больше нельзя было статистически отличить от данных контрольной группы без колита.

Заключение

Это исследование было предназначено и проведено для подтверждения и документирования эффективности *Bacillus* "PB6" против колита, вызванного 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS) у крыс, наблюдавшейся в предыдущем испытании, а также для сравнения ее эффективности с эффективностью *S. boulardii* (пробиотика), месалазина и инфликсимаба (стандартных лекарственных средств). Эта модель у крыс хорошо установлена, надежна и широко используется для исследования эффективности лекарственных средств, предназначенных для лечения IBD. Без какого-либо лечения после индукции колита у нескольких крыс проявлялись легкие признаки диареи, и в среднем продолжали терять массу тела в течение остающегося периода испытания. Макроскопическая морфология стенки их ободочной кишки характеризовалась воспалением, изъязвлением и даже некрозом. Лечение PB6 3 раза $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/кг/день или 3 раза $1,5 \cdot 10^9$ КОЕ/кг/день в течение 7 дней привело к состоянию стенки ободочной кишки, которое было статистически идентичным состоянию групп отрицательного контроля и состоянию у группы, получавшей лечение стандартным лекарственным противовоспалительным средством месалазином.

Пример 4

Противомикробные свойства метаболитов PB6

Методы и материалы

Антагонистические свойства *Bacillus* PB6 и *Bacillus cereus*, выделенных из *Bactisubtil* (Sanofi-synthelabo), тестировали против различных индикаторных штаммов, например, *C. perfringens* ATCC13124, *C. difficile* ATCC9689 и *Campylobacter jejuni* ATCC 33291.

Каждую из *Bacillus cereus* и *Bacillus* PB6 суспендировали в 5 мл стерильного солевого раствора. Используя тампон, делали один штриховой посев суспензий пробиотиков на чашки с триптоновым соевым агаром (Oxoid, Belgium), и чашки инкубировали при 37°C в течение 24 часов в аэробных условиях.

После этого, суспензию различных индикаторных штаммов высевали перпендикулярно обеим культурам *Bacillus* тампоном и инкубировали в течение 24 часов в аэробных условиях. Чашки, засеянные *Clostridium perfringens*, инкубировали в течение 24 часов, чашки, засеянные *C. difficile*, инкубировали в течение 48 часов в анаэробных условиях, используя Anaerogen Pak (Oxoid, Belgium). Суспензию 48-часовой культуры *C. jejuni* ATCC33291 использовали для нанесения 4 штрихов

перпендикулярно пробиотическим культурам. Чашки, засеянные
 видом *Campylobacter*, инкубировали в микроаэробных условиях (*CampyGen*, *Oxoid*)
 при 37°C в течение 48 часов. Штриховые линии не должны соприкасаться друг с
 другом. После инкубации при 37°C антагонистические эффекты оценивали по
 5 появлению чистых зон, окружающих соединения штриховых линий, указывая на
 ингибиторный эффект одного организма против другого.

Результаты и обсуждение

PB6 обладал антагонистическим эффектом против *C. perfringens* ATCC13124 и *C.*
 10 *difficile* ATCC9689. Чистую зону можно было наблюдать у пересечений штриховых
 линий на чашке для обоих видов. Антагонистический эффект против *C. perfringens*
 ясно виден вследствие гемолитических характеристик этого вида. Пример изображен
 на фиг.1. Хотя и не так ясно на этой фотографии, также отмечалась значимая чистая
 зона у пересечения культур PB6 и *C. difficile*.

15 *Bacillus cereus* (*Bactisubtil*) не оказывала антагонистического эффекта против *C.*
perfringens ATCC13124 и *C. difficile* ATCC9689. У пересечений штриховых линий на
 чашке не наблюдались чистые зоны. Пример тестируемой чашки изображен на
 фиг.12.

20 *Bacillus* PB6 оказывала антагонистический эффект против *C. jejuni* ATCC 33291.
 Чистые зоны можно было наблюдать у пересечений штриховых линий на чашке.
 Пример тестируемой чашки изображен на фиг.13.

Bacillus cereus (*Bactisubtil*) не оказывала антагонистического эффекта против *C.*
 25 *jejuni*, как видно на фиг.14.

Заключение

Bacillus PB6, выделенная в природе, отчетливо имеет сильные антагонистические
 свойства в отношении *C. perfringens* ATCC13124, *C. difficile* ATCC9689 и *C. jejuni* ATCC
 33291. Напротив, в отношении других испытанных патогенных бактерий человека
 30 эффект не наблюдался. *Bacillus cereus* (*Bactisubtil*) не проявила никакого
 антагонистического эффекта в отношении *C. perfringens* ATCC13124, *C. difficile*
 ATCC9689 и других испытанных микроорганизмов.

Жизнеспособные клетки штамма PB6 были депонированы в Американской
 Коллекции Типовых Культур («ATCC»), 10801 University Blvd., Manassas, Va., 20110-
 35 2209, U.S.A. 27 мая 2005 г, и им присвоен номер доступа PTA-6737. Депонирование
 было произведено в соответствии с 37 Сводом Федеральных Правил 1.801-1.809.

Предыдущее описание и чертежи включают иллюстративные варианты
 осуществления настоящего изобретения. Описанные выше варианты осуществления
 40 и способы могут варьироваться на основании способности, опыта и предпочтений
 специалистов в данной области. Простой перечень стадий способа в определенном
 порядке не составляет какого-либо ограничения порядка стадий способа.

Предшествующее описание и чертежи просто объясняют и иллюстрируют
 изобретение, и изобретение не ограничивается ими, за исключением ограничений,
 45 определяемых формулой изобретения. Специалисты в данной области, имея это
 описание, смогут внести в него модификации и изменения без отхода от объема
 изобретения.

ССЫЛКИ

- ¹ McFarland LV. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea. *Dig Dis*. 1998;16:292-307.
- ² Bulusu M, Narayan S, Shetler K, Triadafilopoulos G. Leukocytosis as a harbinger and surrogate marker of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:3137-3141.
- ³ McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RYY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*. 1989;320:204-210.
- ⁴ Cheng SH, Lu JJ, Young TG, Perng CL, Chi WM. *Clostridium difficile*-associated diseases: comparison of symptomatic infection versus carriage on the basis of risk factors, toxin production, and genotyping results. *Clin Infect Dis*. 1997; 25:157-158.
- ⁵ Hall, I.C., O'Tool, E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *AJDC*. 1935; 49:390-402
- ⁶ Lysterly, D.M.; Krivan, H.C., Wilkins, T.D. *Clostridium difficile* its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 1-18
- ⁷ Gerding, D.N. Disease associated with *Clostridium difficile* infection *Ann Intern Med* 1989; 110:255-257
- ⁸ McFarland, L.V. Stamm, W.E. Review of *Clostridium difficile*-associated diseases. *AM J Infect Control* 1986; 14:99-109
- ⁹ Anand, A., Glatt A.E. *Clostridium difficile* infection associated with antineoplastic chemotherapy: a review. *Clin Infect Dis*.1993;17:109-113
- ¹⁰ Sharma, A.K., Holer, F.E. *Clostridium difficile* diarrhea after use of tacrolimus following renal transplantation. *Clin Infect Dis*. 1998;27:1540-1541.
- ¹¹ Kelly, C.P. LaMont, J.T. *Clostridium difficile* infection. *Annu Rev* 1998;49:375-390
- ¹² Kelly, C.P., Pothoulakis, K., LaMont, J.T. *Clostridium Difficile* colitis. *N Engl J Med*. 1994; 330:257-262
- ¹³ Anand, A., Bashey, B., Mir, T., Glatt, A.E. Epidemiology, clinical manifestations, and outcome of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Am J Gastroenterol*. 1994;89:519-523
- ¹⁴ Kyne, L. *et al*. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med*. 2000;342:390-397
- ¹⁵ Bartlett, J.G. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. 1992. 15/573-581

- ¹⁶ Rubin, M.S. *et al* Severe *Clostridium difficile* colitis. *Dis Colon Rectum*. 1995;38:350-354
- ¹⁷ Anand, A. *et al* Epidemiology, clinical manifestations, and outcome of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Am J Gastroenterol*. 1994;89:519-523
- ¹⁸ Wilcox, M.H. *et al* Financial burden of hospital-acquired *Clostridium difficile* infections. *J Hosp Infect*. 1996;34:23-30
- ¹⁹ Riley, T.V. *et al* Community-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. 1995;20 (suppl 2):S263-S265
- ²⁰ Samore, M.H. *et al* Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. *Am J Med*. 1996;100:32-40
- ²¹ Djuretic, T. *et al* Infectious intestinal disease in elderly people. *Commun Dis Rep CDR Wkly*. 1996;19:R107-R112
- ²² Olson, M.M. *et al* Ten years of prospective *Clostridium difficile*-associated disease surveillance and treatment at the Minneapolis A Medical Center, 1982 – 1991. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994;15(6):371-381
- ²³ Teasley, D.G. *et al*. Prospective randomized trial of metronidazole versus vancomycin for *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Lancet* 1983;2(8358):1043-1046
- ²⁴ Gerding, D.N. Is there a relationship between vancomycin-resistant enterococcal infection and *Clostridium difficile* infection? *Clin Infect Dis* 1997;25 Suppl 2:S206-210
- ²⁵ Kelly, C.P. *et al*. *Clostridium difficile* colitis. *N Engl J Med* 1994;330(4):257-262
- ²⁶ Fekety, R. and Shah, A.B. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. *JAMA* 1993;269(1):71-75
- ²⁷ Pothoulakis, C. and LaMont, J.T. *Clostridium difficile* colitis and diarrhea. *Gastroenterol Clin North Am* 1993;22(3):623-637
- ²⁸ Fekety, R. *et al*. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled in a prospective, randomized, double-blinded trial. *Clin Infect Dis* 1997;24(3):324-333
- ²⁹ Carmeli, Y. *et al*. Antecedent treatment with different antibiotic agents as a risk factor for vancomycin resistant enterococcus. *Emerg Infect Dis* 2002;8:802-807
- ³⁰ Gerding, D.N. Is there a relationship between vancomycin-resistant enterococcal infection and *Clostridium difficile* infection? *Clin Infect Dis* 1997;25 Suppl 2:S206-210

- ³¹ Poduval, R.D. *et al.* *Clostridium difficile* and vancomycin-resistant enterococcus: the new nosocomial alliance. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3513-3515
- ³² Pelaez, T. *et al.* Metronidazole Resistance in *Clostridium difficile*: a new emerging problem? *38th Interscience Conference on antimicrobial agents and chemotherapy*.
 5 Sept. 24-27, San Diego, CA, American Society for Microbiology
- ³³ Pinchuk, I. *et al.* In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 3 Is Due to Secretion of Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 3156 - 3161
- ³⁴ Caruso A., Flamminio S., Folghera S., Peroni L., Foresti I., Balsari A., Turano A. Expression of activation markers on peripheral-blood lymphocytes following oral administration of *Bacillus subtilis* spores. *Intl. J. Immunopharmacol.* (1993) 15, 87-92
- ³⁵ Ciprandi G., Scordamaglia A., Venuti D., Caria M., Cannica G.W. In vitro effects of *Bacillus subtilis* on the immune response. *Chimioterapia* (1986) 5, 404-407.
- ³⁶ Grasso G., Migliaccio P., Tanganelli C., Brugo M.A., Muscettola M. Restorative effect of *Bacillus subtilis* spores on interferon production in aged mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1994) 717, 198 – 208
- ³⁷ Duc L.H., Hong H.A., Cutting S.M. Germination of the spores in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. *Vaccine* (2003) 21 (27-30), 4215 – 4224
- ³⁸ Duc L.H., Hong H.A., Uyen N.Q., Cutting S.M. Intracellular fate and immunogenicity of *Bacillus subtilis* spores. *Vaccine* (2004), 22(15-16), 1873 – 1885.
- ³⁹ Fais S., Pallone F., Nava C., Magnani M. Lymphocyte activation by *B. subtilis* spores. *Boll. Ist. Sieroter. Milan* (1987) 66(5), 391 – 394
- ⁴⁰ Prokesova L., Novakova M., Julak J., Mara M. Effect of *Bacillus firmus* and other sporulating aerobic microorganisms on in vitro stimulation of human lymphocytes: a comparative study. *Folia Microbiol* (1994) 39, 501 – 504
- ⁴¹ Kosaka T., Maeda T., Nakada Y., Yukawa M., Tanaka S. Effect of *Bacillus subtilis* spore administration on activation of macrophages and natural killer cells in mice. *Vet. Microbiol.* (1998) 60(2-4), 215 – 225.
- ⁴² Paul A.A. C. Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status. *Journal of Nutrition* (1999) 129, 1412S-1417S.

- ⁴³ Gibson G.R., Probert H.M., Loo J.V., Rastall R.A., Roberfroid M.B. Dietary modulation of the human colonic microbacteria: updating the concept of probiotics. *Nutr. Res. Rev.* (2004) 17, 259-275
- ⁴⁴ Gibson G.R., Roberfroid M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of probiotic. *J. Nutr.* (1995) 125, 1401-1412
- ⁴⁵ Roberfroid M. Dietary Fiber, Inulin, and Oligofructose: a Review Comparing their Physiological Effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* (1993) 33, 103-148
- ⁴⁶ Van Loo J., Coussement P., De Leenheer L., Hoebregs H., Smits G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (1995) 35, 525-552
- ⁴⁷ Ezaki, T., Hashimoto, Y. and Yabuuchi, E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989; 39: 224-229
- ⁴⁸ Goris, J., Suzuki, K., De Vos, P., Nakase, T. and Kersters, K. Evaluation of a microplate DNA-DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Can. J. Microbiol.* 1998; 44: 1148-1153
- ⁴⁹ Wayne *et al.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987; 37: 463-464
- ⁵⁰ Smith L.D.S., Williams B.L. 1984. *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*, 3rd ed. Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
- ⁵¹ Gorbach S.L. 1998. Gas gangrene and other clostridial skin and soft tissue infections, p. 915-922. In Gorbach S.L., Bartlett J.G., and Blacklow N.R. (ed.), *Infectious Diseases*, 2nd ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pa.
- ⁵² Anand A., Glatt A.E. 1993. *Clostridium difficile* infection associated with antineoplastic chemotherapy: a review. *Clin. Infect. Dis.* 17:109-113.
- ⁵³ Sharma A.K., Holder F.E. 1998. *Clostridium difficile* diarrhea after use of tacrolimus following renal transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 27: 1540-1541.
- ⁵⁴ Johnson S., Gerding D.N. 1998. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 26:1027-1034.
- ⁵⁵ Bartlett J.G. 2002. Clinical practice Antibiotic-associated diarrhea. *N. Eng. J. Med.* 346:334-339.
- ⁵⁶ Dzink J., Bartlett J.G. 1980. *In vitro* susceptibility of *C. difficile* isolates from patients with antibiotic-associated diarrhea or colitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17:695-698.
- ⁵⁷ Tannock G.W. 1999. *Probiotics: A critical review*. Horizon Scientific Press.
- ⁵⁸ Kim, K. *et al.* Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A₂. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 55: 975 – 985.

Формула изобретения

1. Способ профилактики желудочно-кишечных заболеваний у животных или людей, таких как диарея, диарея, связанная с антибиотиками, воспалительное кишечное заболевание и диарея, вызванная *Clostridium difficile*, включающий стадию введения эффективного количества штамма *Bacillus subtilis* ATCC РТА-6737, продуцирующего липопептид сурфактин, в качестве пробиотика.

2. Способ лечения желудочно-кишечных заболеваний у животных или людей, таких как диарея, диарея, связанная с антибиотиками, воспалительное кишечное

заболевание и диарея, вызванная *Clostridium difficile*, включающий стадию введения эффективного количества штамма *Bacillus subtilis* ATCC РТА-6737, продуцирующего липопептид сурфактин, в качестве пробиотика.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что штамм вводят в комбинации с инулином.

4. Способ по п.2, отличающийся тем, что штамм вводят в комбинации с инулином.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что штамм вводят в комбинации с пробиотиком.

6. Способ по п.2, отличающийся тем, что штамм вводят в комбинации с пробиотиком.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что штамм продуцирует синергическое соединение при введении в организм.

8. Способ по п.2, отличающийся тем, что штамм продуцирует синергическое соединение при введении в организм.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что штамм имеет ген с по меньшей мере 90% гомологией к последовательности 16S rPHK SEQ ID NO:1.

10. Способ по п.2, отличающийся тем, что штамм имеет ген с по меньшей мере 90% гомологией к последовательности 16S rPHK SEQ ID NO:1.

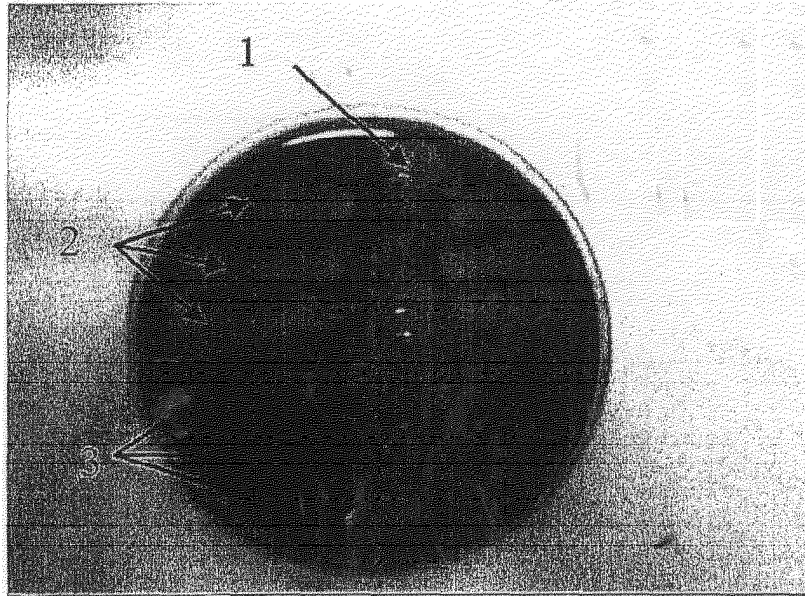
11. Способ по п.1, отличающийся тем, что штамм имеет ген с по меньшей мере 90% гомологией к частичной последовательности *gyrA* SEQ ID NO:2.

12. Способ по п.2, отличающийся тем, что штамм имеет ген с по меньшей мере 90% гомологией к частичной последовательности *gyrA* SEQ ID NO:2.

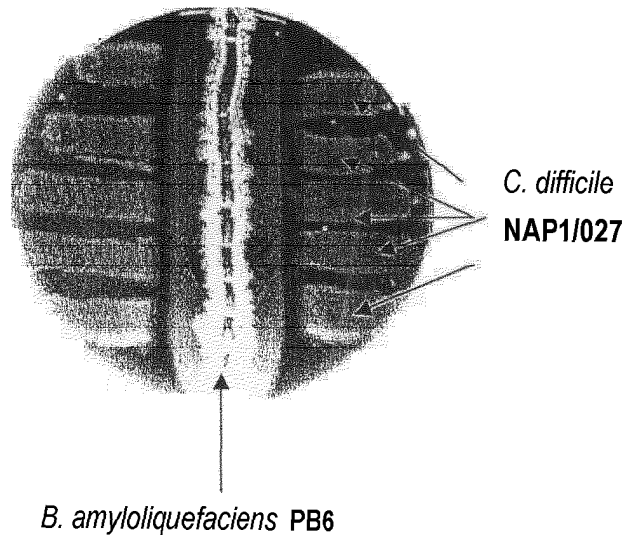
13. Способ по п.1, отличающийся тем, что штамм имеет ген с по меньшей мере 90% гомологией к частичной последовательности *gyrA* SEQ ID NO:3.

14. Способ по п.2, отличающийся тем, что штамм имеет ген с по меньшей мере 90% гомологией к частичной последовательности *gyrA* SEQ ID NO:3.

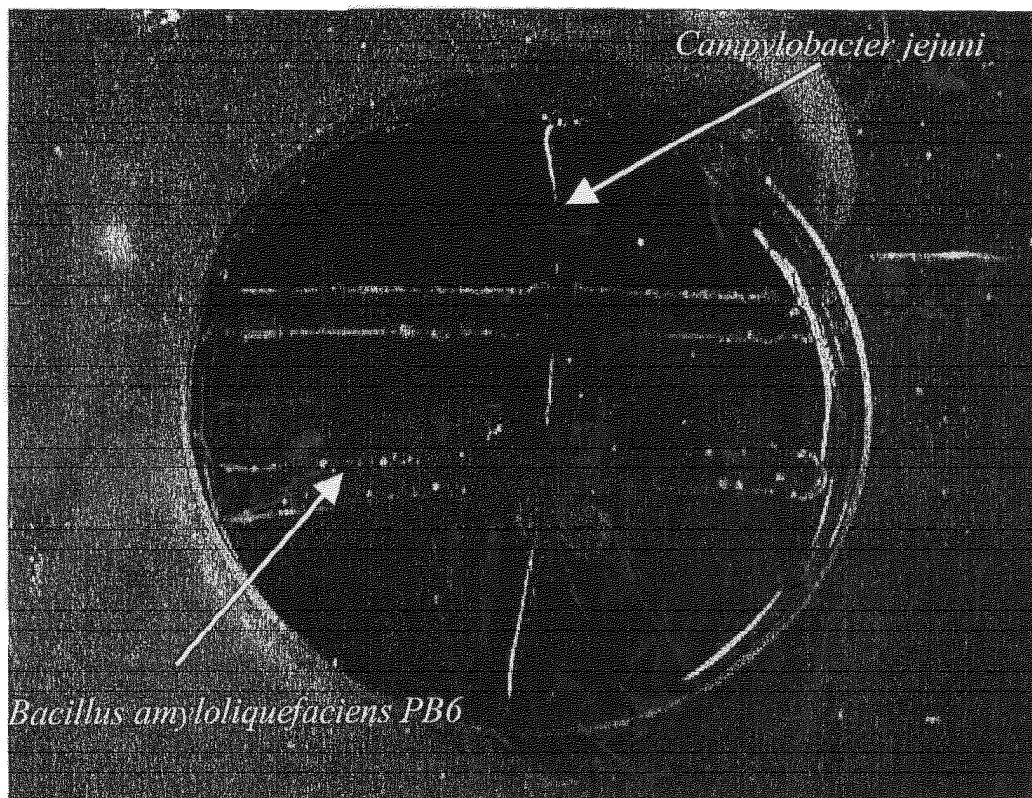
15. Лекарственное средство для лечения или профилактики желудочно-кишечных заболеваний у животных или людей, таких как диарея, диарея, связанная с антибиотиками, воспалительное кишечное заболевание и диарея, вызванная *Clostridium difficile*, представляющее собой штамм *Bacillus subtilis* ATCC РТА-6737.



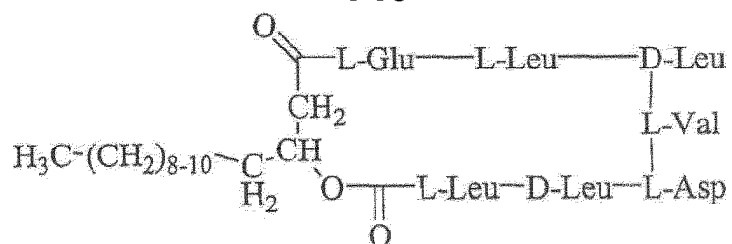
ФИГ.1



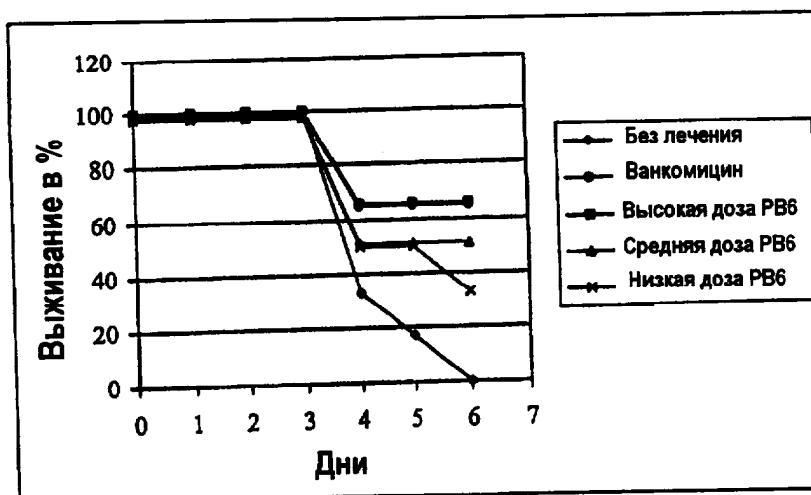
ФИГ.2



ФИГ.3



ФИГ.4



ФИГ.5

Секвенирование 16S рPHK (SEQ ID NO:1)

AAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGT
ACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAG
CTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGC
TTAACCTCGCGGTTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGG
TCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTTGTCACCGGCAG
TCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTC
TGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAG
GTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCA
ATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAG
CTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGA
CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACA
GACCAGAGAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTA
CACGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCC
CCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGC
CCAATAATTCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT
AGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTT
CTTCCCTAACACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTC
CGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCT
TGGTGAGCCGTGACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGTCCATCTGTAAGTGGTAG
CCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCC
GGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
GCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCAATGTATTAGGCAC
GCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGCCATGGATCAA

ФИГ.6

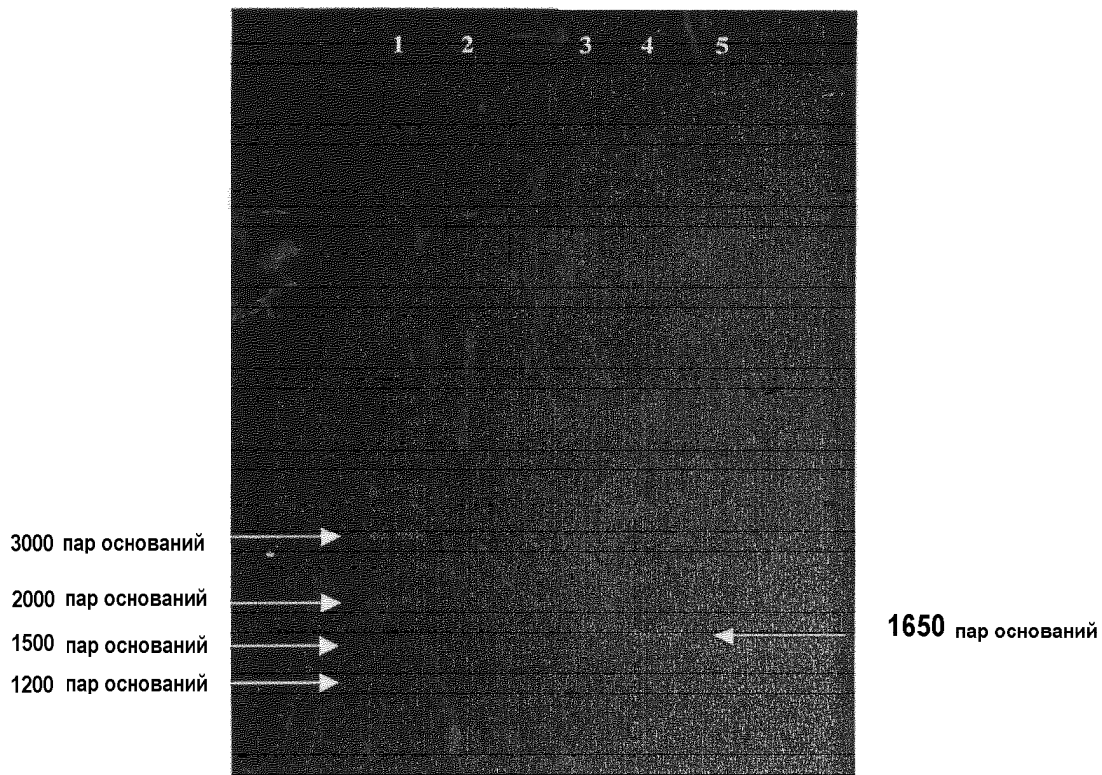
Частичное секвенирование gyrA (SEQ ID NO:2)

GTCAGGAAATGCGTACGTCCTTCCTGGACTATGCAATGAGCGTTATCGTATCCCGGGCG
 CTTCCGGATGTGCGTGACGGTCTGAAGCCGGTTCACAGACGGATTTTGTACGCAATGAA
 TGATTTAGGCATGACCAGTGACAAACCATATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCGGTGAAG
 TTATCGGTAAGTACCAACCCGACGGTGACTCAGCGGTTTACGAATCAATGGTCAGAATG
 GCGCAGGATTTTAACTACCGCTACATGCTTGTTGACGGACACGGCAACTTCGGTTCGGT
 TGACGGCGACTCAGCGGCCGCGATGCGTTACACAGAAGCGAGAATGTCAAAAATCGCAA
 TGGAAATTCTGCGTGACATTACGAAAGACACGATTGACTATCAAGATAACTATGACGGT
 TCAGAAAGAGAGCCTGCCGTCATGCCTTCGAGATTTCCGAATCTGCTCGTAAACGGGGC
 TGCCGGTATTGCGGTGCGAATGGCGACAAACATTCCCCCGCATCAGCTTGGAGAAGTCA
 TTGAAGGCGTGCTTGCCGTAAGTGAGAATCCTGAGATTACAAACCAGGAGCTGATGGAG
 TACATCCCGGGCCCGGATTTTCCGACTGCAGGTCAGATTTTGGGCCGGAGCGGCATCCG
 CAAGGCGTATGAATCCGGACGGGGATCAATCACAATCCGGGCTAAGGCTGAAATCGAAG
 AGACTTCATCGGGAAGAAAGAATTATTGTACCGGAACCTTCCTTATCAGGTGAACAAA
 GCGAGATTAATTGAAAAATCGCGGATCTTGTCCGGGACAAAAAATCGAAGGAATTAC
 CGATCTGCGAGACGAATCCGACCGTAACGGAATGAGAATCGTCATTGAGATCCGCCGTG
 ACGCCAATGCTCACGTCAATTTTGAATAACCTGTACAAACAAACGGCCCTGCAGACGTCT
 TTCGGGATCAACCTGCTGGCGCTCGTTGACGGACAGCCGAAGGTACTAAGCCTGAAGCA
 ATGCCTGGAGCAT

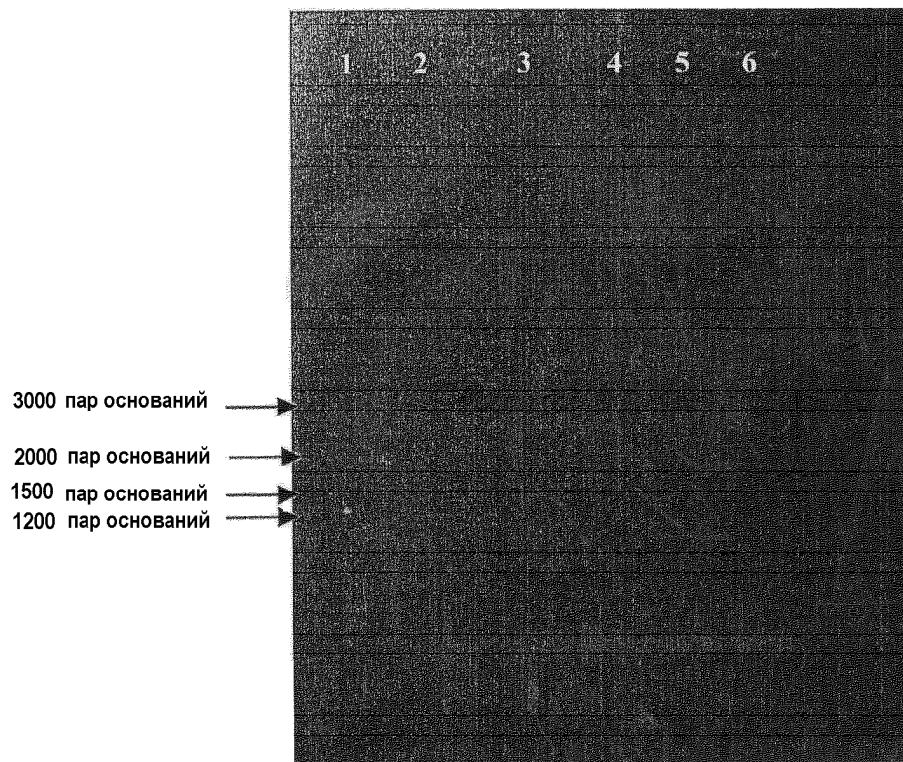
ФИГ.7**Частичное секвенирование gyrA (SEQ ID NO:3)**

ATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCGGTGAAGTTATCGGTAAGTACCAACCCGACGGTGACTCAGC
 GGTTTACGAATCAATGGTCAGAATGGCGCAGGATTTTAACTACCGCTACATGCTTGTTGACGGA
 CACGGCAACTTCGGTTCGGTTGACGGCGACTCAGCGGCCGCGATGCGTTACACAGAAGCGAGAA
 TGTCAAAAATCGCAATGGAAATTCTGCGTGACATTACGAAAGACACGATTGACTATCAAGATAA
 CTATGACGGTTCAGAAAGAGAGCCTGCCGTCATGCCTTCGAGATTTCCGAATCTGCTCGTAAAC
 GGGGCTGCCGGTATTGCGGTGCGAATGGCGACAAACATTCCCCCGCATCAGCTTGGAGAAGTCA
 TTGAAGGCGTGCTTGCCGTAAGTGAGAATCCTGAGATTACAAACCAGGAGCTGATGGAGTACAT
 CCCGGGCCCGGATTTTCCGACTGCAGGTCAGATTTTGGGCCGGAGCGGCATCCGCAAGGCGTAT
 GAATCCGGACGGGGATCAATCACAATCCGGGCTAAGGCTGAAATCGAAGAGACTTCATCGGGAA
 AAGAAAGAATTATTGTACCGGAACCTTCCTTATCAGGTGAACAAAGCGAGATTAATTGAAAAAT
 CGCGGATCTTGTCCGGGACAAAAAATCGAAGGAATTACCGATCTGCGAGACGAATCCGACCGT
 AACGGAATGAGAATCGTCATTGAGATCCGCCGkGACGCCAATGCTCACGTCAATTTGAATAACC
 TGTACAAmCAAACGGCCCTGCAGAySTCTTTCG

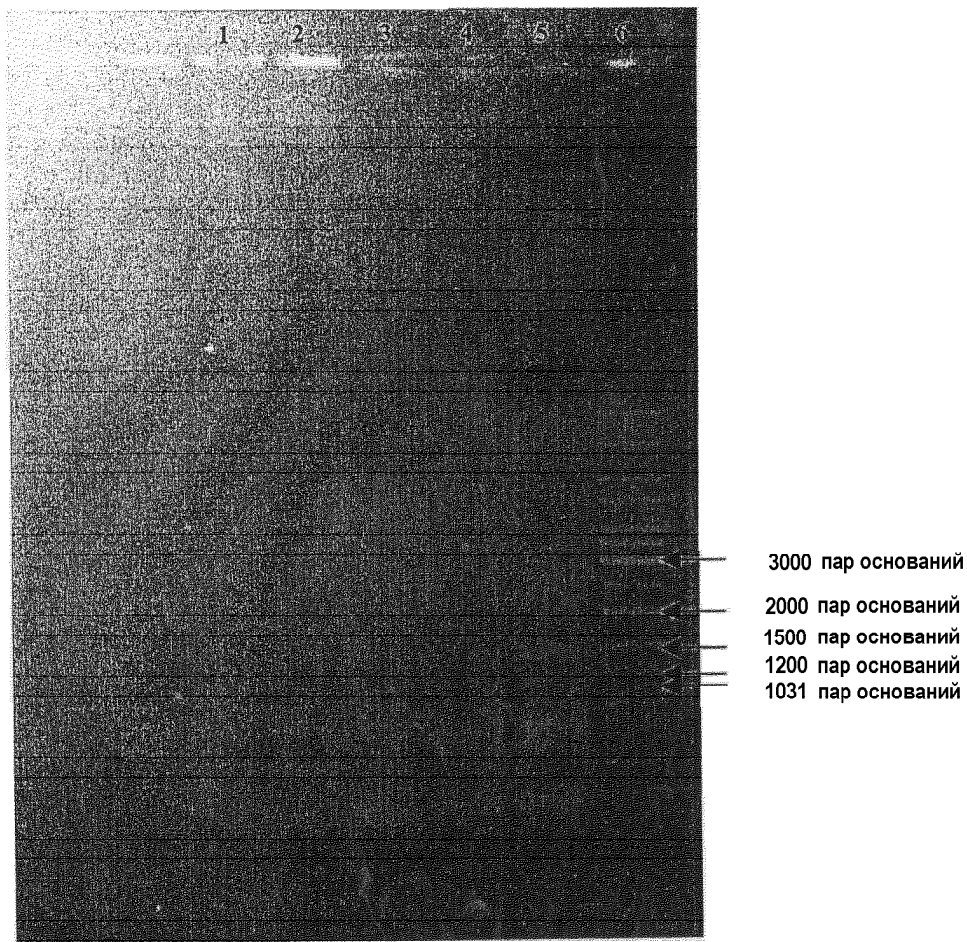
ФИГ.8



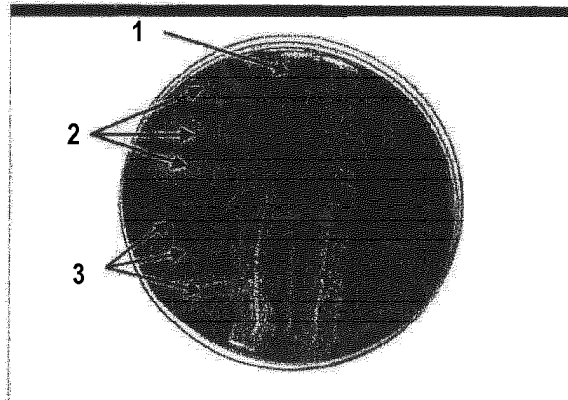
ФИГ.9



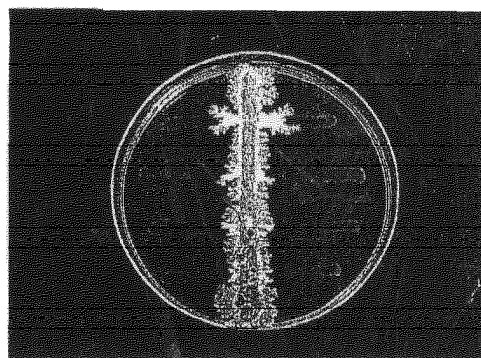
ФИГ.10



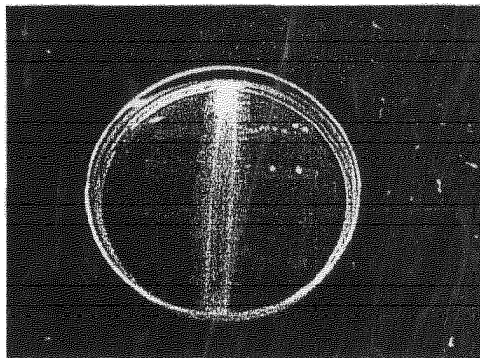
ФИГ.11



ФИГ.12



ФИГ.13



ФИГ.14