



Új *Lactobacillus* törzsek patogén baktériumok és
rotavírusok okozta hasmenés megelőzésére

K I V O N A T

A találmány tárgyát képezi *Lactobacillus* nemzetségbe tartozó tejsavbaktérium, amely akadályozza hasmenést okozó patogén baktériumok bélcsatornában történő kolonizációját és akadályozza a bél epitéliális sejtjeinek rotavírussal történő fertőzését. A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti *Lactobacillus* törzs vagy tenyésztete felülúszójának alkalmazása táplálkozási segédanyag készítésére, és a segédanyag alkalmazása hasmenéssel kapcsolatos rendellenességek kezelésére és/vagy megelőzésére.

A találmány szerinti *Lactobacillus* törzs vagy tenyésztetének felülúszója élelmiszer vagy gyógyászati készítményben alkalmazható.

F. K. K.



Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A 1

**Új *Lactobacillus* törzsek patogén baktériumok és
rotavírusok okozta hasmenés megelőzésére**

A találmány tárgyát képezik *Lactobacillus* nemzetségbe tartozó, új mikroorganizmusok, amelyek mind patogén baktériumok, mind rotavírusok okozta hasmenés megelőzésére alkalmazhatók. Közelebbről, a találmány tárgyát képezi a mikroorganizmusok alkalmazása táplálkozási segédanyag („ingestable support material”) készítésére és az ezeket tartalmazó készítmények.

Tejsavat fő anyagcseretermékként előállító szervezettek már régóta ismertek. Ilyen baktériumok tejben vagy tejfeldolgozó gyárakban, élő vagy bomló növényekben, de állati vagy emberi bélben is találhatók. Ezek a "tejsavbaktériumok" névvel összefoglalható mikroorganizmusok nagyon heterogén csoportot alkotnak, ide tartoznak például a *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, stb. nemzetségek.



A tejsavbaktériumokat fermentáló ágensekként használják élelmiszer megőrzésére, a fermentatív aktivitásuk során előállított fermentációs termékek alacsony pH-ját és működését felhasználva a romlást okozó baktériumok szaporodásának gátlására. A tejsavbaktériumokat emiatt alkalmazzák sokféle, különböző élelmiszer, például sajt, joghurt és más, tejből készült, fermentált tejtermék készítésére.

A tejsavbaktériumok mostanában kerültek az érdeklődés középpontjába, mivel néhány fajról kiderült, hogy emberi vagy állati fogyasztás esetén értékes tulajdonságokkal bírnak. Konkrétan, *Lactobacillus* vagy *Bifidobacterium* nemzetség bizonyos törzseiről derült ki, hogy bélnyálkahártyában kolonizációra képesek, és hozzájárulnak az ember és az állat közérzetének megőrzéséhez.

Ebben a vonatkozásban az EP 0768375 számú európai közzétételi iratban *Bifidobacterium* nemzetség konkrét törzseit tárják fel, amelyek a bélflórába beilleszkednek és hozzátapadnak a bélsejtekhez. Ezekről a bifidobaktériumokról leírták, hogy segítik az immunmodulációt azáltal, hogy kompetitív módon kizárják a patogén baktériumok tapadását a bélsejtekhez, ezáltal segítik az egyed egészségének megőrzését.

Az utóbbi néhány évben a tejsavbaktériumok probiotikus ágensekként történő alkalmazására összpontosult a kutatás. A probiotikumok élő mikrobiális készítmények, amelyek elősegítik az egyed egészségének megőrzését a bélben lévő természetes mikroflóra fenntartásával. Egy mikrobiális készítményt általában abban az esetben tekintünk probioti-



kumnak, ha annak hatásos mikrobái és a hatás módja ismert. A probiotikumokról feltételezik, hogy a bél nyálkahártyájához tapadnak, a bélcsatornában kolonizálnak, és a káros mikroorganizmusok tapadását is akadályozzák. Hatásuk fontos előfeltétele, hogy a bél nyálkahártyáját megfelelő és élő formában kell elérniük, és nem szabad tönkremenniük a gyomor-bélrendszer felső részében, különösen a gyomorban uralkodó alacsony pH hatására.

Ebben a vonatkozásban a WO 97/00078 számú nemzetközi közzétételi iratban egy bizonyos, *Lactobacillus* GG-nek (ATCC53103) nevezett törzsre, mint probiotikumra adnak kitanítást. A mikroorganizmust előnyösen élelmiszer által kiváltott hiperszenzitivitási reakciók kezelésére vagy megelőzésére alkalmazzák, amely során egy egyednek pepszinnel és/vagy tripszinnel hidrolizált élelmiszerrel együtt adagolják. A kiválasztott *Lactobacillus* törzsről azt állítják, hogy adhezív és kolonizáló tulajdonságú és proteáz-enzimrendszere van, így a beadandó élelmiszerben lévő fehérje tovább hidrolizálódik a konkrét *Lactobacillus* törzs által kiválasztott proteázok segítségével. A szabadalmi iratban tárgyalt eljárás adott esetben a bélcsatornában olyan fehérje felvételét eredményezi, amely már nem tartalmazza allergén anyag lényeges mennyiségét.

Továbbá, az EP 0577903 számú európai közzétételi iratban olyan tejsavbaktérium alkalmazására hivatkoznak, amely helyettesíteni tudja *Helicobacter pylori*t, a fekély kifejlődésének ismert okozóját, egy olyan készítményben,



amely *Helicobacter pylori* működésével kapcsolatos fekély gyógyászati vagy megelőző kezelésére alkalmazható.

Egy időközben nyilvánosságra jutott dokumentumban, a W099/29833 számú nemzetközi közzétételi iratban egy bizonyos törzset, az LMG P 17806-ot ismertetik, amely három, meghatározott méretű plazmidot hordoz. A törzsről azt állítják, hogy megakadályozza *Salmonella typhimurium* behatolását bélsejtekbe.

Bizonyos tejsavbaktériumok kedvező tulajdonságainak ismeretében a technika állása szerint kívánatosak lennének további olyan tejsavbaktérium-törzsek, amelyek jótékonyan hatnak az ember és/vagy az állat közérzetére.

Következésképpen a találmány szerinti megoldás kidolgozásával célunk volt további olyan baktériumtörzsek előállítás, amelyek az ember és/vagy az állat számára kedvező, új tulajdonságokat mutatnak.

Az előzőekben ismertetett problémát új mikroorganizmusokkal, nevezetesen *Lactobacillus* nemzetségbe tartozó olyan tejsavbaktériumokkal oldjuk meg, amelyek hasmenést okozó patogén baktériumok bélben történő kolonizációját és a bél epiteliális sejtjeinek rotavírusokkal történő fertőzését meg tudják akadályozni. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a *Lactobacillus* törzsek a gazdaszervezet bélnyálkahártyájához kötődnek és alapvetően kolonizálják.

Egy további előnyös megvalósítási mód szerint a *Lactobacillus* törzsek epesavas sók akár 0,4%-os koncentrációjának jelenlétében is képesek szaporodni, így könnyen



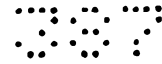
keresztüljutnak a gyomor-bélrendszeren, és alapvetően aktívak maradnak.

Egy további előnyös megvalósítási mód szerint a tejsavbaktérium *Lactobacillus rhamnosus* vagy *Lactobacillus paracasei*, előnyösen *Lactobacillus paracasei* és még előnyösebben *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116.

A találmány szerinti mikroorganizmusoknak többek között a következő tulajdonságokkal jellemezhetők: Gram-pozitívak, kataláz negatívak, ammóniaképzés argininből negatív, CO₂-termelés negatív. L(+)-Tejsavat termelnek, epe-savas sók akár 0,4%-os koncentrációjának jelenlétében is képesek szaporodni és alapvetően gátolják epitéliális sejtek rotavírusokkal történő fertőzését.

Az új mikroorganizmusok sokféle táplálék-segédanyag készítésére alkalmazhatók, például tej, joghurt, aludttej, fermentált tejek, tejalapú fermentált termékek, fermentált, gabonaalapú termékek, tejalapú porok, csecsemők számára történő kiegészítések készítésére, és a segédanyagban körülbelül 10⁵ CFU/g mennyiségtől körülbelül 10¹¹ CFU/g mennyiségben lehetnek. A találmányi leírás szerint a CFU rövidítés a "kolóniaképző egység ("colony forming unit")" kifejezést jelenti, amelyet a baktériumsejtek számának agar-lemezekon történő mikrobiológiai számolásával határozzunk meg.

A találmány tárgyát képezi az olyan élelmiszer vagy gyógyászati készítmény, amely legalább egy, az előzőekben ismertetett tulajdonságokkal bíró *Lactobacillus* törzset tartalmaz.



A találmány szerinti élelmiszerkészítmény előállításánál legalább egy, találmány szerinti *Lactobacillus* törzset viszünk be egy megfelelő segédanyagba, körülbelül 10^5 CFU/g mennyiségtől körülbelül 10^{11} CFU/g mennyiségig, előnyösen körülbelül 10^6 CFU/g mennyiségtől körülbelül 10^{10} CFU/g mennyiségig, előnyösebben körülbelül 10^7 CFU/g mennyiségtől körülbelül 10^9 CFU/g mennyiségig.

Gyógyászati készítmény esetében a termék tablettá, folyékony baktériumszuszpenzió, szárított, orálisan beadható kiegészítő, nedves orálisan beadható kiegészítő, száraz tubusos táplálék vagy nedves tubusos táplálék formájában készülhet, és a bevitt *Lactobacillus* törzsek mennyisége elérheti egészen a körülbelül 10^{12} CFU/g mennyiséget, előnyösen körülbelül 10^7 CFU/g mennyiségtől körülbelül 10^{11} CFU/g mennyiségig terjedhet, előnyösebben körülbelül 10^7 CFU/g mennyiségtől körülbelül 10^{10} CFU/g mennyiségig terjed.

Az új mikroorganizmusok aktivitása az egyed bélcsatornájában természetesen dózisfüggő. Ez azt jelenti, hogy minél több új mikroorganizmus jut be az előzőek szerinti élelmiszer vagy gyógyászati készítmény felvételével, annál nagyobb a mikroorganizmusok védő és/vagy gyógyító aktivitása. Mivel az új mikroorganizmusok emberekre és állatokra nem károsak, és adott esetben csecsemő székletéből izolálhatók, nagy mennyiség vihető be belőlük, így lényegében az egyed bélcsatornájának nagy része kolonizálható az új mikroorganizmusokkal.



A következőkben az ábrákat ismertetjük.

Az 1. ábrán baktériumtörzsek rotavírussal szembeni védőhatásának kiértékelésére, sejttenyészetben végzett szűrővizsgálat vázlatát mutatjuk be.

A 2. ábrán *L. casei* CNCM I-2116 törzs (jelölése ST11) savasítását mutatjuk be különböző tápközegekben.

A 3. ábrán *L. casei* ST11 törzs túlélési arányát mutatjuk be 10°C-on, 30 napon keresztül mérve.

A 4. ábrán IL-12- és IL-10-mRNS mintázatát mutatjuk be egéreredetű, csontvelőből származó, adherens sejtekben a sejteknek ST11 sorozathígításával történő inkubációja után.

Az 5. ábrán Th2-differentáció eredményét mutatjuk be, amely csökkent IL-4-termelődést eredményez.

A 6. ábrán sejtkultúra-kísérlet eredményeit mutatjuk be, amelyben tenyésztett ST11-sejteket alkalmaztunk patogén *E. coli* baktériumok epiteliális sejtekhez történő tapadásának gátlási vizsgálatára.

A 7. ábrán sejtkultúra-kísérlet eredményeit mutatjuk be, amelyben ST11-tenyészet felülúszóját alkalmaztuk patogén *E. coli* baktériumok epiteliális sejtekhez történő tapadásának gátlási vizsgálatára.

A 8. ábrán sejtkultúra-kísérlet eredményeit mutatjuk be, amelyben tenyésztett ST11-sejteket alkalmaztunk *Salmonella typhimurium* epiteliális sejtekbe történő behatolásának gátlási vizsgálatára.



A 9. ábrán sejtkultúra-kísérlet eredményeit mutatjuk be, amelyben ST11-tenyészet felülúszóját alkalmaztuk *Salmonella typhimurium* epitéliális sejtekbe történő behatolásának gátlási vizsgálatára.

A találmányi gondolathoz széleskörű vizsgálatok alapján jutottunk, amely során csecsemők székletét vizsgáltuk és nagyszámú, különböző baktériumtörzset izoláltunk belőlük. Ezeknek a törzseknek azután megvizsgáltuk azon képességét, hogy akadályozzák epitéliális sejtek rotavírusokkal és hasmenést okozó patogén baktériumokkal történő fertőzését.

Számos baktériumnemzetség, többek között *Lactobacillus*, *Lactococcus* és *Streptococcus* nemzetség gátló tulajdonságait vizsgáltuk. A gátlási vizsgálatokat az érintett egyedben hasmenést okozó patogén mikroorganizmusok képviselőjeként lényegében három, emberekben a víruseredetű hasmenés fő etiológiai kórokozóját képviselő rotavírus-szerotípussal (G1-, G3- és G4-szerotípusokkal), patogén *E. colival* és *Salmonella typhimuriummal* végeztük.

A különböző tejsavbaktériumokat alkalmas tápközegeken, például MRS-en, Hugo-Jago- vagy M17-tápközegeken szaporítottuk körülbelül 30°C és 40°C között, az optimális szaporodási hőmérsékletüknek megfelelően. A stacioner szaporodási fázis elérése után a baktériumokat centrifugálással összegyűjtöttük és fiziológiás sóoldatban szuszpendáltuk. A vizsgálatok között a baktériumsejteket fagyasztva tároltuk (-20°C).



Rotavírus-vizsgálatok

A különböző rotavírus-törzseket egybefüggő, egyrétegű sejtek fertőzésével készítettük. A rotavírusokat a fertőzés előtt inkubáltuk. A sejteket 20 szövettenyészet fertőző dózissal fertőztük. A rotavírusellenes tulajdonság kiértékelésére két különböző módszert alkalmaztunk. Az egyik módszer szerint a különböző baktériumtörzseknek a rotavírussal történő közvetlen kölcsönhatásba lépését vizsgáltuk, míg a másik módszer szerint a baktériumoknak a sejtes rotavírus-receptorokkal történő kapcsolatba lépését vizsgáltuk. Az első módszer szerint a baktériumszuszpenziók mindegyikét különböző rotavírus-törzsszel hoztuk kapcsolatba és megfelelő tápközegben inkubáljuk. Ezt követően a vírus-baktérium keveréket egyrétegű, HT-29 jelű, differenciálatlan, humán, vastagbél-adenomasejtekhez adtuk. Ezután kiértékeljük a vírusreplikációt. A másik módszer szerint a baktériumszuszpenziókat először egyrétegű, HT-29 jelű, differenciálatlan, humán, vastagbél-adenomasejtekkel inkubáltuk és csak ezután adtuk hozzá a vírust. A tovább folytatott inkubáció során kiértékeljük a vírusreplikációt. A rotavírus replikációja a fertőzött sejtekben a rotavírus-fehérjék hisztoimmunológiai festésével könnyen kiértékelhető. Az adott baktérium akkor mutat a rotavírussal szemben gátló hatást, ha a fertőzött sejtek száma 90%-kal csökkent a rotavírussal és a szóban forgó baktériummal beoltott sejtenyészetben a csak rotavírussal oltott tenyészetekhez képest.



Az először izolált, összesen 260 különböző baktérium-törzs közül csupán 9 gátolta alapvetően a rotavírus-replikációt. A különböző baktériumokról bebizonyosodott, hogy *Lactobacillus* nemzetség *rhannosus* vagy *paracasei* alfajába tartoznak. Az egyik, *Lactobacillus casei* ST11-nek jelölt törzs, amelyet a Budapesti Egyezmény értelmében NCC 2461 (I-2116) letéti számon letétbe helyeztünk, különösen hatékonynak bizonyult humán sejtek rotavírussal történő fertőzésének megelőzésében. Ez a bizonyos törzs ezen kívül kedvező szaporodási tulajdonságokkal is rendelkezik, amelyet a különböző tápközegekben mutatott savasítás jellemez. A törzs a körülbelül 10°C-os alacsony hőmérsékleteken történő tárolás alatti túlélési arány tekintetében is jónak bizonyult, amely előnyös jelöltté teszi hűtőszekrényben tárolandó élelmiszeranyagokba vagy gyógyászati készítményekbe történő beépítésre.

Patogén baktériumokkal szembeni vizsgálatok:

Az antibakteriális tulajdonságok kiértékelésére a következő megközelítési módokat választottuk. Az egyik módszer szerint a találmány szerinti, tenyésztett *Lactobacillus* törzsek azon képességét vizsgáltuk, hogy akadályozzák hasmenést okozó, patogén baktériumok tapadását a bélsejtekhez és behatolásukat a bélsejtekbe. Ennek érdekében a bélsejteket kapcsolatba hoztuk a patogén baktériumokkal és a találmány szerinti, tenyésztett *Lactobacillus* törzsekkel, és kiértékeltek a tapadás és a behatolás arányát. Egy másik módszer szerint a találmány szerinti *Lactobacillus* törzsek sejttenyészetének felülúszóját adtuk



a patogén mikroorganizmusokkal együtt a bélsejtekhez és kiértékeljük a tapadás vagy a behatolás arányát. A kísérletek során kimutatható volt, hogy a tenyésztett *Lactobacillus*ok és a felülúszó bélsejteknel különösen hatékonyak bizonyult mind a tapadás, mind a behatolás akadályozásában, amely jelzi, hogy valószínűleg az új mikroorganizmusok által kiválasztott anyagcseretermékek felelősek a hasmenéssel szembenes aktivitásért patogén baktériumok esetében.

Az előzőekben ismertetett eredményeken kívül kimutatható volt, hogy a találmány szerinti törzsek antiallergén tulajdonságúak is, amennyiben a törzsek szerepet játszanak különböző, immunológiai közvetítők szintézisében.

Általánosan elismert tény, hogy a humorális immunválaszokat és az allergiás reakciókat a 2-típusú fenotípusú $CD4^+$ T-sejtek (Th2) közvetítik. A Th2-sejtek interleukin-4 (IL-4), az IgE - az allergiás reakciókban szerepet játszó, fő ellenanyagosztály - szekréciójához szükséges citokin magas szintű termelődésével jellemezhetők.

A Th2-sejtek differenciációját gátolja az IFN- γ , egy olyan citokin, amelyet a $CD4^+$ T-sejtek (a Th2-sejtekkel) kölcsönösen kizárólagos Th1-alosztálya állít elő. A Th1-sejteket viszont hatékonyan indukálja az interleukin-12 (IL-12). Ezzel szemben az IL-10-ről, egy másik citokinről kimutatták, hogy erős gátló hatást gyakorol Th1-sejtek szaporodására, és ezáltal valószínűleg szerepet játszik az immunszuppresszív mechanizmusokban.



Összefoglalva, mind az IL-12, mind az IL-10 erősen befolyásolja a $CD4^+$ T-sejtek fejlődését a Th1-alosztály fejlődésének befolyásolásával. Az IL-12 kulcsfontosságú szabályozó citokin a Th1-differentiáció indukálásához, és így gátolja a Th2-válaszok kiváltását. A Th2-sejtek gátlásának egy fontos útvonala tehát az IL-12 szintézisének stimulálása járulékos sejtekkel.

Jól ismert, hogy Gram-negatív baktériumok bizonyos komponensei, például az LPS IL-12 magas szintjét eredményezik adherens sejtekben, például makrofágokban és dendrites sejtekben. Következésképpen azt tapasztaltuk, hogy Gram-negatív baktériumok a $CD4^+$ T-sejtek differentiációját erősen eltolják a Th1-fenotípus felé.

A találmány szerinti *Lactobacillus* törzsek egy példaként az ST11-mikroorganizmusnál vizsgáltuk, hogy szerepet játszik-e a $CD4^+$ T-sejtek differentiációjának szabályozásában részt vevő citokinek indukciójában. Konkrétan, az ST11 hatását vizsgáltuk a Th2-differentiáción keresztülmenő $CD4^+$ T-sejtek fenotípusára.

Ebben a vonatkozásban 4 másik *Lactobacillus* törzzsel és egy kontroll, Gram-negatív baktériummal (*E. coli* K12) hasonlítottuk össze az ST11-nek azt a képességét, hogy csontvelőből származó, egérreredetű adherens sejtekben ezt a két szabályozó citokint kódoló mRNS szintézisét indukálja. Az mRNS-t félkvantitatív RT-PCR-rel mértük a sejteknek 10^7 - 10^9 CFU/ml baktérium sorozathígításaival 6 órán keresztül történő inkubációját követően.



Habár valamennyi *Lactobacillus* törzs indukálja IL-12-mRNS transzkripcióját bizonyos mértékben, az ST11 bizonyult a legerősebb indukálószernek, mivel a legerősebb PCR-jelet lehetett kimutatni, még a legalacsonyabb baktériumdózis esetében is. Gyakorlatilag az ST11-nek az IL-12-mRNS transzkripcióját indukáló képessége ugyanolyan erős, mint *E. coli*-é. Az IL-10-mRNS indukciója általában gyengébb volt, mint az IL-12-mRNS-é, mivel csak magasabb baktériumdózisoknál lehetett jelet kimutatni. Az ST11 tehát a legerősebb IL-10-mRNS indukálószer, összehasonlítva más *Lactobacillus*szal és az *E.coli* kontrollal.

Az ST11 feltehetőleg hatékony a CD4⁺ T-sejt-differentációban szerepet játszó immunregulátoros citokinek indukálásában. Az IL-12-t hatékonyan indukáló képessége Th2-válaszok gátlásának lehetséges jelöltjévé teszi, és IL-10 kimutatható indukciója akadályozhatja a gyulladásos folyamatokat.

Az előzőekben ismertetett eredményeken kívül azt is meghatároztuk, hogy az ST11 gátló hatást gyakorol-e Th2-differentáción keresztülmenő CD4⁺ T-sejtekre és pozitív hatása van-e a Th1-működésekre. Jól kidolgozott sejtdifferentációs tenyészetet alkalmaztunk, ahol a prekursor CD4⁺ T-sejteket poliklonálisan aktiváltuk, és úgy alakítottuk, hogy a tápközegben biztosított kostimulus típusától függően akár Th1-, akár Th2-differentáción menjenek keresztül. A Th1/Th2-differentációt 7 napos elsődleges tenyészetben indukáltuk, miután a sejteket 2 napon keresztül újra stimuláltuk egy másodlagos tenyészetben, amely csak a tápközeget



tartalmazta, és a specifikus fenotípus (Th1 vagy Th2) kialakulását a felülúszóba kiválasztott citokinek típusával (IFN- γ vagy IL-4) mértük.

Általánosan ismert, hogy BALB/c háttérű egerekből származó prekursor CD4⁺ T-sejtek semleges körülmények között történő aktiváció után (csak a tápközeg az elsődleges tenyészetben) elsődlegesen predomináns Th2-fenotípussá differenciálódnak (magas IL-4, alacsony IFN- γ a másodlagos tenyészet felülúszójában). Ez a fenotípus teljes mértékben Th1-mintává alakulhat (magas IFN- γ , alacsony IL-4) az elsődleges tenyészetben az IL-4-hez gátló monoklonális ellenanyag hozzáadása után.

Az ST11 Th2-gátlásban betöltött lehetséges szerepének vizsgálata érdekében BALB/c-egerekből származó, prekursor CD4⁺ T-sejteket aktiváltunk csontvelő eredetű adherens sejtek, mint járulékos sejtek jelenlétében az elsődleges tenyészetben. Ezeket a sejteket együtt tenyésztettük akár csak a tápközegben, akár 1 mg/ml LPS, vagy 10⁸ CFU/ml ST11 vagy 10⁸ CFU/ml más *Lactobacillus* jelenlétében. Ezután a sejteket mostuk és a CD4⁺ T-sejteket még egyszer tisztítottuk, majd a másodlagos tenyészetben csak tápközeggel újra stimuláltuk. A differenciált CD4⁺ T-sejtek által termelt citokineket 2 nap múlva mértük. Amint vártuk, azok a sejtek, amelyek csak a tápközeg jelenlétében differenciálódtak, domináns Th2-fenotípust mutattak. ST11 hozzáadása az elsődleges tenyészetekhez erősen befolyásolta a Th2-differentáció kimenetelét, mivel nyolcadrészt csökkentette az IL-4 termelődését. Ez a gátlás hasonló nagyságrendű,



mint amely az LPS jelenlétében differenciálódott sejtekből származó tenyészeteknél megfigyelhető. Ezzel szemben a másik *Lactobacillus* törzsnek nem volt kimutatható hatása az IL-4-szintre. Érdekes módon az IFN- γ -szint nem növekedett ST11-nek az elsődleges tenyészetekhez történő hozzáadása során.

Összefoglalva, ST11 specifikusan gátolta a Th2-differenciáción keresztülmenő CD4⁺ T-sejtek IL-4 termelését, de szignifikánsan nem növelte az IFN- γ szekréciót. Az a tény, hogy ST11 nem növeli az IFN- γ -termelődést valószínűleg annak a képességének tulajdonítható, hogy az IL-10-et indukálja, aminek az a következménye, hogy anti-Th2-aktivitása ellenére alacsony gyulladásos hatást fejt ki.

Következésképpen kimutatható, hogy az ST11 olyan *Lactobacillus* törzs, amelynek jó az anti-Th2-profilja, amely kiváló lehetőséget nyújt antiallergén, probiotikus aktivitású baktériumként történő alkalmazására.

A találmányt a példák segítségével írjuk le.

Tápközegek és oldatok:

MRS (Difco)

Hugo-Jago [tryptone 30 g/l (Difco), élesztőkivonat 10 g/l (Difco), laktóz 5 g/l (Difco), kálium-dihidrogénfoszfát 5 g/l, húskivonat (Beef extract) 2 g/l (Difco), agar 2 g/l (Difco)]

M17 (Difco)

M199 (Seromed)

Ringer-oldat (Oxoid)



PBS (nátrium-klorid 8 g/l, kálium-klorid 0,2 g/l, dinátrium-hidrogénfoszfát 1,15 g/l, kálium-dihidrogénfoszfát 0,2 g/l)

Tryptose-foszfát-tápleves (Flow)

Tripszin-EDTA-oldat (Seromed)

A humán rotavírus WA (G1-szerotípus) és *Simian* rotavírus SA-11 (G3-szerotípus) törzseket P. A. Offittól kaptuk, Gyermekkorház, Philadelphia, USA. A DS-1xRRV újraválogató („reassortant”) vírust A. Kapikiantól kaptuk, NIH Bethesda, USA. A 4-es szerotípusú, humán Hochi rotavírust P. Bachmanntól kaptuk, Münchener Egyetem, Németország. Az *E. coli* DAEC C 1845 törzset Washington Egyetemtől kaptuk, Seattle és az *E. coli* JPN15 törzset Maryland Egyetem, USA, Vakcinafejlesztési központjától kaptuk. A *Salmonella typhimurium* SL1344 törzset Stanford Egyetem, CA, USA Mikrobiológiai osztályától szereztük.

1. példa

Tejsavbaktériumok izolálása csecsemők székletéből

Tizenhat egészséges, 15-27 napos csecsemő pelenkájából friss székletet gyűjtöttünk. A friss széklet 1 grammját a laboratóriumba történő átvitelhez anaerob körülmények közé helyeztük, és a mikrobiológiai vizsgálatokat a mintázástól számított 2 órán belül végeztük el Ringer-oldatban történő sorozathígításokkal és szelektív tápközegekre történő terítéssel. A tejsavbaktériumok izolálására antibiotikumokkal (foszfomicin 80 µg/ml, szulfametoxazol 93 µg/ml, trimetoprim 5 µg/ml) kiegészített MRS-agart inkubáltunk 37°C-on 48 órán keresztül. Véletlenszerűen telepeket szed-



tünk le és tisztítottunk. A fiziológiai és genetikai jellemzést az izolátumokon végeztük.

2. példa

A törzsek rotavírusellenes aktivitásának vizsgálata sejttenyészetben

Számos baktériumnemzetséget, például *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* nemzetségeket választottuk ki és sejttenyészetben végzett gátlási teszttel kerestük azon képviselőiket, amelyek rotavírusellenes aktivitást mutatnak. A *Lactococcus* nemzetséget egyetlen faj képviselte két alfajjal (*Lc. lactis* subsp. *lactis* és *cremoris*). Összesen 30 törzset vizsgáltunk. A *Streptococcus* nemzetséget egyetlen faj képviselte (*S. thermophilus*) 45 törzzsel. A *Leuconostoc* és *Propionibacterium* nemzetségeket csak egyetlen faj képviselte (6 törzs), míg az *Enterococcus* és *Staphylococcus* nemzetségeket két-két faj képviselte összesen 17 törzzsel.

Összesen 260 baktériumtörzs rotavírusellenes aktivitását vizsgáltuk.

1. számú módszer

Baktériumszuszpenzió 30 µl-ét (átlagosan 3×10^6 baktériumot tartalmaz) összekevertük 70 µl, 10% tryptose-foszfát-táplevessel (Flow) és 5% tripszin-EDTA-oldattal (Seromed) (HT-29-sejtek esetében 1:4 arányban hígítva) kiegészített M199-tápközeggel és 100 µl, kiegészített M199-tápközegben lévő vírussal. A vírus-baktérium-keveréket 1 órán keresztül 4°C-on és 1 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. A 96-lyukú mikrotiterlemezeken egybefüggő, egyrétegű



sejtek formájában szaporodott, HT-29 jelű, humán, differenciálatlan, vastagbél-adenomasejteket háromszor mostuk foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS, pH 7,2). A vírus-baktérium-keveréket hozzáadtuk a sejtekhez, és a mikrotiterlemezeket 18 órán keresztül inkubáltuk szén-dioxid-inkubátorban (Heraeus). A vírusreplikációt a következőkben ismertetettek szerint értékeltük.

2. számú módszer

Baktériumszuszpenzió 30 μ l-ét (lásd fent) összekevertük 70 μ l, 10% tryptose-foszfát-táplevessel (Flow) és 5% tripszin-EDTA-oldattal (Seromed) (HT-29-sejtek esetében 1:4 arányban hígítva) kiegészített M199-tápközzeggel és közvetlenül a mikrotiterlemezekben lévő sejtekhez adtuk. Egy órán keresztül 37°C-on történő inkubációt követően 100 μ l, kiegészített M199-tápközzegben lévő vírust adtunk a mikrotiterlemezekben lévő sejtekhez. Az inkubációt 18 órán keresztül folytattuk szén-dioxid-inkubátorban (Heraeus). A vírusreplikációt a következőkben ismertetettek szerint értékeltük.

A rotavírus-replikációt a következőkben ismertetett módszer szerint, a fertőzött sejtekben a rotavírus-fehérjék hisztoimmunológiai festésével értékeltük.

A fertőzést követő napon a sejttenyészet táptalaját leöntöttük a mikrotiterlemezekről, a sejteket abszolút etanollal rögzítettük 10 percen keresztül. Az etanolt leöntöttük, és a lemezeket háromszor mostuk PBS-pufferrel. Ezután 50 μ l, PBS-ben 1:2000 arányban hígított, nyúlban termelt, rotavírus elleni szérumot (elsősorban VP6-fehérjével szem-



ben) (ISREC Egyetemtől kaptuk, Lausanne) adtunk a lyukakba, és 1 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on, lefedve, hogy megakadályozzuk a lyukak kiszáradását. Az antiszérumot ezután leöntöttük, a lemezeket háromszor mostuk PBS-sel. Ezután 50 µl, kecskében termelt, peroxidázzal kapcsolt, PBS-ben 1:500 arányban hígított, nyúl elleni immunglobulin-G antiszérumot (GAR-IgG-PO, Nordic) adtunk a lyukakhoz, és a lemezeket 1 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. A szérumot leöntöttük és a lemezeket még háromszor mostuk PBS-sel. Ezután a következő szubsztrátkeverékből 100 µl-t adtunk a lyukakba: 10 ml 0,05 M Tris-HCl (pH 7,8), 1 ml hidrogén-peroxid (30% Suprapur, vízben 1:600 arányban hígítva, Merck) és 200 µl 3-amino-9-etilkarbazol (0,1 g/10 ml etanol 200 µl-es adagokban tárolva -80°C-on, Sigma A-5754). A lemezeket legalább 30 percen keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten. A szubsztrátot leöntöttük, a reakciót 200 µl víz hozzáadásával állítottuk le. A fertőzött sejtcsoportokat inverz mikroszkóppal számoltuk meg (Diavert, Leitz).

Csak nagyon kevés olyan baktériumtörzset találtunk, amely rotavírusokkal kapcsolatba lépett. Az először kiválasztott 260 baktériumsejt közül csupán 9 gátolta a rotavírus replikációját legalább az egyik módszer szerint. *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (ST11) különösen erős aktivitást mutatott 1-szerotípusú rotavírus, 3-szerotípusú rotavírus SA-11 és 4-szerotípusú Hochi rotavírussal szemben.



3. példa

Caco-2-sejtek tenyésztése

A (patogén) baktériumok gátlási vizsgálataihoz Caco-2-sejtvonalat alkalmaztunk a bélcsatorna modelljeként. Ez a sejtvonal bélsejtekre jellemző vonásokat mutat, például polarizáció, bélcsatornaenzimek expressziója, bizonyos szerkezeti polipeptidek termelődése, stb.

A sejteket három különböző hordozón szaporítottuk, nevezetesen műanyag csészékben (25 cm², Corning) a szaporodáshoz, zsírtalanított és sterilizált 6-lyukú üveglemezeken (22 x 22 mm, Corning) a tapadási teszthez, és 24-lyukú üveglemezeken (Corning) a gátlási tesztekhez.

A tenyészet második napja után a tápközeget (DMEM) naponta cseréltük. Használat előtt a tápközeget 100 U/ml penicillin/sztreptomocinnal, 1 µg/ml amfoterinnel és 56°C-on 30 percen keresztül inaktivált, 20% FCS-sel egészítettük ki. A tenyésztést 37°C-on végeztük 90% levegőt és 10% széndioxidot tartalmazó légkörben. A sejteket hatnaponként szétosztottuk. A sejteket a lyukak faláról 0,25% tripszint és 3 mM EDTA-t tartalmazó PBS-ben, pH 7,2 végzett kezeléssel választottuk le. A tripszin hatásának közömbösítéséhez azonos mennyiségű FCS-t adtunk az így nyert sejtszuspenzióhoz, a keveréket centrifugáltuk (10 perc 1000 rpm), és az üledéket újra tenyészetbe helyeztük. Körülbelül $3,5 \times 10^5$ sejtet új tenyésztőedénybe vittünk át és addig szaporítottuk, amíg egybefüggő, egyrétegű sejteket nem kaptunk.



4. példa

Baktériumok tenyésztése

ST11:

A baktériumtörzset -20°C -on 15% glicerint tartalmazó MRS-tápközegben tároltuk. A törzset anaerob körülmények között szaporítottuk MRS-ben és a gátlási vizsgálatokra történő felhasználás előtt 24 órás időközökben kétszer új tápközegbe vittük át. A vizsgálatokhoz 2×10^9 CFU/ml sejtkoncentrációt alkalmaztunk.

A felülúszót 1 órán keresztül 20000 rpm fordulatszámmal történő centrifugálással gyűjtöttük össze, és az így nyert felülúszóban ellenőriztük a baktérium jelenlétét.

E. coli

Két *E. coli* törzset alkalmaztunk: *E. coli* DAEC C 1845 ("Diffuse Adhesion *E. coli*") és *E. coli* JPN15 (EPEC, Enteropathogenic *E. coli*).

A felolvasztás utáni első átoltást CFA-Müller-Hinton agarra végeztük, amely alkalmas a baktérium által termelt adhéziós faktorok expressziójára.

Mindegyik kísérlet előtt a baktériumsejteket 37°C -on inkubáltuk új tápközegbe történő átvitelével, amelyet kétszer végeztünk 24-24 óra elteltével. Mivel a JPN15 ampicillin-rezisztenciagént tartalmaz, ezt az antibiotikumot alkalmaztuk szelekcióra a szaporítás alatt.

Salmonella

A kísérletekhez *Salmonella typhimurium* SL1344 törzset alkalmaztuk, amelyet felhasználás előtt LB-tápközegben szaporítottunk.



5. példa

E. coli gátlási vizsgálat

A második, új tápközegre történő átoltás után a patogén baktériumtörzseket radioizotóppal jelöltük 10 $\mu\text{Ci/ml}$ aktivitású C^{14} -ecetsav LB-tápközegben történő alkalmazásával. A törzset 18 órán keresztül 37°C -on inkubáltuk ebben a tápközegben.

A baktériumszuszpenziót ezután centrifugáltuk (1041 g, 15 perc), hogy a felülúszóból eltávolítsuk a maradék C^{14} -ecetsavat. Az üledéket PBS-ben szuszpendáltuk és mostuk, majd a sejteket körülbelül 10^8 sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk 1% steril mannózban. A mannózzal ismert, hogy gátolja a nem specifikus tapadást.

A különböző patogén baktériumtörzseket (*E. coli*) 3 órán keresztül kapcsolatba hoztuk Caco-2 egy rétegben lévő sejtjeivel (37°C , 10% CO_2 , 90% levegő). Ugyanezen kísérleteket a felülúszó alkalmazásával is elvégeztük (amelyet 20000 rpm-mel 40 percen keresztül történő centrifugálással nyertünk).

Kontrollként a patogén baktériumokat Caco-2 egy rétegben lévő sejtjeivel ST11-nek vagy a tenyészet felülúszójának hozzáadása nélkül hoztuk kapcsolatba.

A tápközéget 3 órás inkubáció után kicseréltük, és az egyrétegű sejteket PBS-sel háromszor mostuk. Mindegyik mosási lépés alkalmával a PBS oldatot 20-szor megkevertük a nem specifikus tapadás lényegében teljes kiküszöbölése érdekében. A sejteket ezután 1 ml nátrium-karbonát hozzáadásával és 37°C -on 40 percig történő inkubálással lizáltuk.



Homogenizálás után egy kis részt (250 µl) 5 ml szcintillációs folyadékban hígítottunk (Hionic-Fluor Packard) és számoltunk (Packard 2000). A patogén sejteknek Caco-2-sejtekhez tapadt százalékát a kontrollal szemben számoltuk, amelyet 100%-nak vettünk (tapadás, vagy behatolás az 5. példában).

6. példa

Gátlási vizsgálat *Salmonellára*

A *Salmonella* olyan baktérium, amely behatol az epitéliumsejtekbe és szaporodik bennük. Az ST11 gátló aktivitásának meghatározása érdekében *Salmonella typhimurium* SL1344 törzset inkubáltuk az előzőekben ismertetettek szerint ^{14}C -ecetsavat tartalmazó tápközegekben, és az 5. példa szerinti kísérletet végeztük el.

Az inkubációt követően a Caco-2-sejteket PBS-sel mostuk, hogy a nem tapadt sejteket eltávolítsuk. Ezt követően gentamicint (20 µg/ml) tartalmazó tápközeget adtunk hozzá, és az inkubációt 1 órán keresztül 37°C-on folytattuk. A gentamicin antibiotikum nem hatol be a bélsejtekbe, ezért minden extracelluláris mikroorganizmus elpusztul, míg a bélsejtekbe behatolt *Salmonella* életben marad. A sejteknek kétszer PBS-sel történő mosása után a sejteket steril desztillált víz hozzáadásával lizáltuk, és a radioaktivitást a 4. példában ismertetettek szerint mértük.

Az 5. és 6. kísérlet eredményeit a 6-9. ábrákon mutatjuk be. Látható, hogy a tenyésztett ST11-sejtek és a tenyészet felülúszója különösen hatékony a hasmenést okozó



patogén mikroorganizmusoknak a bélsejtekhez történő tapadásának és behatolásának akadályozásában.

7. példa

ST11 tulajdonságai

Az ST11-et a gyomortartalmat utánzó keverékben inkubáltuk. A gyomorkeverék utánzatát pepszinnek (3 g/l) steril sóoldatban történő szuszpendálásával (0,5% súly/térfogat) készítettük, a pH-t 2,0-ra, illetve 3,0-ra állítottuk koncentrált sósavval. Az ST11-et az előzőekben ismertetett tápközegeken szaporítottuk különböző mennyiségekben, és meghatároztuk a mikroorganizmusok rezisztenciáját.

Az eredményeket az I. táblázatban foglaljuk össze.

I. táblázat

pH	CFU/ml a 0. perc- ben	CFU/ml az 1. perc- ben	CFU/ml a 15. perc- ben	CFU/ml a 30. perc- ben	CFU/ml a 60. perc- ben
2,0	$2,0 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$3,7 \times 10^8$	$7,0 \times 10^3$
3,0	$2,0 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$8,4 \times 10^8$

Az ST11 következő tulajdonságait a tejsavbaktériumok nemzetségére közzétett eljárások szerint határoztuk meg [szerk.: Wood, B. J. B. és Holzapfel, W. H., Blackie, A&P.]



- Gram-pozitív
- kataláz negatív
- argininből ammóniaképzés negatív
- CO₂-termelés negatív
- L(+)-tejsav termelődése
- szaporodás akár 0,4% koncentrációjú epesavas sók jelenlétében

8. példa

ST11 szaporodása különböző körülmények között

Az ST11-et 37°C-on különböző ideig inkubáltuk szacharózzal (0%, 0,5%, 1% vagy 2%) vagy szójapeptonnal (0,5%) vagy glükózzal (0,5%) kiegészített paradicsom alapú tápközegen (4% paradicsompör desztillált vízben oldva). Az eredményeket a 2. ábrán mutatjuk be.

Az ST11-et 2,5% mennyiségben rizsliszt (3%), búzaliszt (2%) és szacharóz (3%) tartalmú tápközeghez is hozzáadtuk, és 37°C-on inkubáltuk, amíg a pH 4,4-et el nem érte. A termék hűtése után C-vitamin hozzáadásával vagy anélkül csomagoltuk és 10°C-on tároltuk.

9. példa

IL-12 és IL-10 mRNS-ei szintézisének indukciója ST11-gyel egéreredetű adherens sejtekben

Csontvelősejteket izoláltunk 8 hetes, specifikus, patogénmentes C57BL/6 egerek combcsontjából és sípcsontjából, és 2×10^6 sejt/ml koncentrációban inkubáltuk 10% magzati borjúsérumot, 1 mM L-glutamint, 12 mM Hepes, 0,05 mM 2-merkaptóetanolt, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml sztreptomocint (valamennyi reagens Gibcotól származik) tar-



talmazó RPMI-tápközegben (Gibco) 12 órán keresztül 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú légkörben. A nem tapadt sejteket meleg tenyésztő tápközeggel történő három egymást követő mosással távolítottuk el, és a megmaradt, tapadt sejteket összegyűjtöttük és 10⁶ sejt/ml koncentrációban 6 órán keresztül inkubáltuk baktériumok jelenlétében vagy anélkül. Korábban már meghatároztuk, hogy a 6 óra optimális időpont LPS-re adott válaszul citokin-mRNS szintézisére egérezetű, adherens sejtekben. A baktériumokat különböző, 10⁹ CFU/ml koncentrációtól 10⁷ CFU/ml koncentrációig adtuk. A baktériumokat az előzőekben ismertetettek szerint szaporítottuk és tároltuk (6. oldal).

A 6 órás tenyésztési időszak végén a sejteket centrifugálással izoláltuk és TRIzol reagenskészlet (GibcoBRL, kat. szám: 15596-018) alkalmazásával lizáltuk a gyártó útmutatásai alapján. Izopropanollal történő kicsapással teljes RNS-t izoláltunk és reverz transzkripcióval cDNS-be írtuk át 90 perc alatt, 42°C-on, 200 U reverz transzkriptáz enzimmal (Superscript II, BRL) 40 µl-es reakciótérfogatban, amely 200 mM Tris-t pH 8,3, 25 mM kálium-kloridot, 1 µg/ml oligo d(T)₁₅-öt (Boehringer Mannheim), 1 mM DTT-t (Boehringer Mannheim), 4 mM-t mindegyik dNTP-ből (Boehringer Mannheim) és 40 U/ml Rnasint (Promega) tartalmazott. A PCR-láncindítók és a reakciókörülmények ugyanazok voltak, mint amelyet Kopf és munkatársai ismertetettek [Kopf és mtsai., *Journal of Experimental Medicine* 184(3), 1127-36 (1996)]. A cDNS mennyiségét a mintán belül egy létfontosságú ("housekeeping") génre (β-2-mikroglobulin) specifikus



láncindító alkalmazásával normalizáltuk. A PCR-termékeket 2% agarózgélen választottuk el és a sávokat UV alatt értékeltük.

Mint a 4. ábrán bemutatjuk, az ST11 mutatta IL-12 és IL-10 mRNS-einek legerősebb indukcióját, amely összehasonlítható volt a pozitív kontrollnál (*E. coli*) tapasztalt szinttel. A különbségek leginkább a legalacsonyabb baktériumkoncentrációknál (10^7 CFU/ml) figyelhetők meg.

10. példa

IL-4-szintézis gátlása ST11-gyel

A $CD4^+$ T-sejteket specifikus, patogénmentes BALB/c egerek lépéből tisztítottuk MiniMACS reagenskészlettel (Miltenyi Biotec, kat. szám: 492-01). A $CD4^+$ T-sejteket 2×10^5 sejt/ml koncentrációban tenyésztettük 10% magzati borjúsérumot, 1 mM L-glutamint, 12 mM Hepes, 0,05 mM 2-merkaptoetanolt, 100 U/ml penicillint és 100 μ g/ml sztreptomomicint tartalmazó RPMI-tápközegben, és egy héten keresztül aktiváltuk lemezhez kötött, CD3-mal (2C11-klón) és CD28-cal (37.51-klón, mindkét ellenanyag Pharmingentől származott) szembeni monoklonális ellenanyagokkal történő kötéssel. Az elsődleges tenyészetben a $CD4^+$ T-sejteket csontvelőeredetű, adherens sejtekkel (amelyeket az előzőek szerint izoláltunk), mint járulékos sejtekkel és 10^8 CFU/ml ST11-gyel vagy 10^8 CFU/ml L1-gyel vagy 1 mg/ml LPS-sel vagy csak a tápközeggel tenyésztettük együtt. Ezután a sejteket mostuk és a $CD4^+$ T-sejteket még egyszer tisztítottuk MiniMACS reagenskészlettel és újra stimuláltuk a csak a tápközeget tartalmazó másodlagos tenyészetben. A differen-

ciált CD4⁺ T-sejtek által termelt citokineket 2 nap elteltével a felülúszóban mértük szendvics-ELISA-módszerrel (a reagenskészletek Endogentől és Pharmingentől származtak).

Az eredményeket az 5. ábrán mutatjuk be. A csak a táptalaj jelenlétében differenciálódott sejtek IL-4 magas szintjével jellemezhető, domináns Th2-fenotípust mutattak. ST11-nek az elsődleges tenyészetekhez történő hozzáadása erősen befolyásolta a Th2-differenciáció kimenetelét, mivel az IL-4 termelődését nyolcadrészt csökkentette. A gátlás hasonló nagyságrendű, mint amely az LPS jelenlétében differenciálódott sejtekből származó tenyészetekben figyelhető meg. Ezzel szemben a másik *Lactobacillus* törzsnek nem volt kimutatható hatása az IL-4 szintjére. Érdekes módon az IFN- γ -szint nem emelkedett ST11-nek az elsődleges tenyészethez történő hozzáadására.

Mint az előzőekből látható, a találmány szerinti törzsek a mikroorganizmusok előnyös tulajdonságait kihasználva jól alkalmazhatók élelmiszer és/vagy gyógyászati hordozó előállítására.

11. példa

Guatemala város külső kerületeinek közösségében klinikai kísérletekben vizsgáltuk az ST11-törzs azon képességét, hogy befolyásolja az akut, esős évszakbeli hasmenéses betegség terjedését és kimenetelét, amely a gyermekek többségét érinti ezen a területen. Összesen 203, 35 és 70 hónapos kor közötti gyermeket vizsgáltunk a kísérletben, és 29 napos betáplálási időszak alatt céldózisként 10^{10} élő szervezetet (ST11) vagy semmit (placebo) nem kaptak. Mind a

mintát, mind a placebo mintát kapó gyermekek alultápláltság miatt jellemzően korukhoz képest alacsonyabbak és könnyebbek voltak.

Az iskoláskor előtti gyermekekkel történő etetés megkezdése előtt mind *in vitro*, mind *in vivo* biztonsági vizsgálatokat végeztünk. Az *in vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy az antibiotikumrezisztencia-mintájuk más, élelmiszer céljára történő felhasználásoknál alkalmazott *Lactobacillusok*éhoz hasonló, biogén aminok képzésére, mucin bontására és epesavas sók bontására nem képesek. A kontroll, placebo vizsgálatokban 42 önkéntes felnőtt vett részt, az ST11-et jól tolerálták, és a vizsgált, lehetséges megnyilvánulások között, például szélszorulás, naponkénti széklet száma és állaga, semmilyen káros hatás nem mutatkozott, a szérumban lévő akutfázis-fehérjék szintje nem adott okot aggodalomra egy lehetséges gyulladásos folyamat tekintetében.

A mintákat és placebo anyagokat a Nestlé Product Technology Center gyártósorán Konolfingenben, Svájcban zacskókba csomagolták, és hűtött állapotban szállították Guatemalába. Mindegyik 10 grammos csomag csokoládé ízesítésű hordozót és vagy 0,2 g ST11-et (10^{10} CFU) vagy placebo esetében 0,2 g tejport tartalmazott. A csokoládé ízesítésű hordozó kakaóporból, cukorból, szójalecitinből, vaníliából és fahéjból állt. A zacskókat 4-6°C között tároltuk, és a felhasználás előtt két órával kivettük a hűtőből. Felhasználás előtt a zacskókat 100 ml, a Nestlé által biztosított, mindenféle baktériumtól mentes vízben kellett feloldani.



Az alkalmazott módszer szerint hasmenést akkor állapítottunk meg, ha 24 óra alatt három vagy ennél több, folyékony vagy nem formált székletürítés történt. A hasmenéses esetet olyan eseményként határoztuk meg, amikor hasmenés jelei mutatkoztak (3 hasmenéses ürítés 24 óra alatt). A teljes időtartamát órákban határoztuk meg a három jelzésértékű székletürítés közül az elsőnek az időpontjától kezdve az első, megfelelően formált széklet megjelenéséig vagy 24 órás, székletmentes időszakig. Gyermekes esetében egy "új" esemény bekövetkezte előtt 48 óra kell, hogy elteljen az előző esemény befejeződése után. Amennyiben ez nem következik be, ugyanazon esemény folytatásának kell tekintetni, és az értékelésnél a teljes időszakot kell figyelembe venni. Esetnek azt a gyermeket nevezzük, aki egy vagy több, dokumentált hasmenéses eseményen ment keresztül a 29 napos megfigyelési időszak alatt. A hasmenéses esemény intenzitása a nem szilárd széklet teljes számán alapul. Az esemény súlyosságának elemei a székletben vér, nyálka vagy genny jelenléte, valamint láz vagy hányás tünetei. Napi 7 széklet vagy egészségügyi szakember klinikán, egészségügyi központban vagy kórházban történő beavatkozása szintén súlyosnak minősülő esemény.

Ha a hasmenéses eseményt felügyeleti rendszeren keresztül diagnosztizálták, a hasmenéses székletből mintát gyűjtöttünk mikroszkópos vizsgálatra, valamint tenyésztésre az eseményt okozó, valószínű, kórokozó patogének azonosítására. A mintát rotavírus-antigénre, *Giardiára* és *E. histolyticára* vizsgáltuk, dizentériás minta esetében



Shigella, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas Shigelloides*, *E. coli* és esetlegesen *V. cholerae* bakteriális patogéneket is vizsgáltuk.

A vizsgálat alatt termékmintákat gyűjtöttünk, hogy vizsgáljuk az adagolási időszakban részt vevő mikroorganizmusok életképességét. Kimutatható volt, hogy a mikroorganizmusok a zacskókban életképesek maradtak az egész vizsgálat alatt, oly módon, hogy a vizsgálat végén a zacskókban vízzel történő feloldás után 10^{10} életképes mikroorganizmus volt.

A vizsgálat kimutatta, hogy a probiotikus mikroorganizmust tartalmazó minta körülbelül 30%-kal csökkenti a hasmenés előfordulását a kontrollcsoporthoz (placebo) képest. Sőt, még a kontrollcsoportban is kisebb számban fordult elő hasmenés a sem mintát, sem placebót nem kapó normális populációhoz képest. Ez utóbbi eredmény részben azzal magyarázható, hogy a gyermekek kiegészítő, értékes táplálékokat tartalmazó és szennyezéstől mentes vizet fogyasztottak. Mivel azonban a vizsgálatot természetes közegben végeztük, nyilvánvaló, hogy az ST11 bizonyosan csökkenti a hasmenés előfordulását *in vivo*.



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. *Lactobacillus* nemzetségbe tartozó tejsavbaktérium, amely akadályozza a hasmenést okozó patogén baktériumok bélcsatornában történő kolonizációját és akadályozza a bél epitéliális sejtjeinek rotavírussal történő fertőzését.

2. Az 1. igénypont szerinti *Lactobacillus* törzs, amely a gazdaszervezet bélnyálkahártyájához képes tapadni és alapvetően kolonizálni képes.

3. Az 1. vagy a 2. igénypont szerinti *Lactobacillus* törzs, amely legfeljebb mintegy 0,4% epesavas só jelenlétében képes szaporodni..

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti *Lactobacillus* törzs, amely *Lactobacillus rhamnosus* vagy *Lactobacillus paracasei*.

5. A 4. igénypont szerinti *Lactobacillus* törzs, amely *Lactobacillus paracasei*.

6. Az 5. igénypont szerinti *Lactobacillus* törzs, amely *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (NCC 2461).

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti *Lactobacillus* törzs alkalmazása táplálkozási segédanyag készítésére.

8. A 7. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a *Lactobacillus* törzs a segédanyagban körülbelül 10^5 CFU/g segédanyag mennyiségtől körülbelül 10^{12} CFU/g mennyiségig van jelen.



9. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti *Lactobacillus* törzs tenyésztete felülúszójának alkalmazása táplálkozási segédanyag készítésére.

10. A 7-9. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a segédanyag az alábbi élelmiszer-készítmények bármelyike: tej, joghurt, aludttej, sajt, fermentált tej, tejalapú fermentált termékek, jégkrémek, fermentált, búza-alapú termékek, tejalapú porok, csecsemőkészítmények.

11. A 7-10. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a segédanyag hasmenéssel kapcsolatos rendellenességek kezelésére és/vagy megelőzésére alkalmas.

12. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti, legalább egy *Lactobacillus* törzset vagy a tenyésztetének felülúszóját tartalmazó élelmiszer- vagy gyógyászati készítmény.

13. A 12. igénypont szerinti készítmény, amely az alábbiak bármelyike: tej, joghurt, aludttej, sajt, fermentált tej, tejalapú fermentált termékek, jégkrémek, fermentált, búzaalapú termékek, tejalapú porok, csecsemőkészítmények, tabletták, folyékony baktériumszuszpenziók, szárított orálisan beadható kiegészítő, nedves orálisan beadható kiegészítő, száraz tubusos élelmiszer vagy nedves tubusos élelmiszer.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

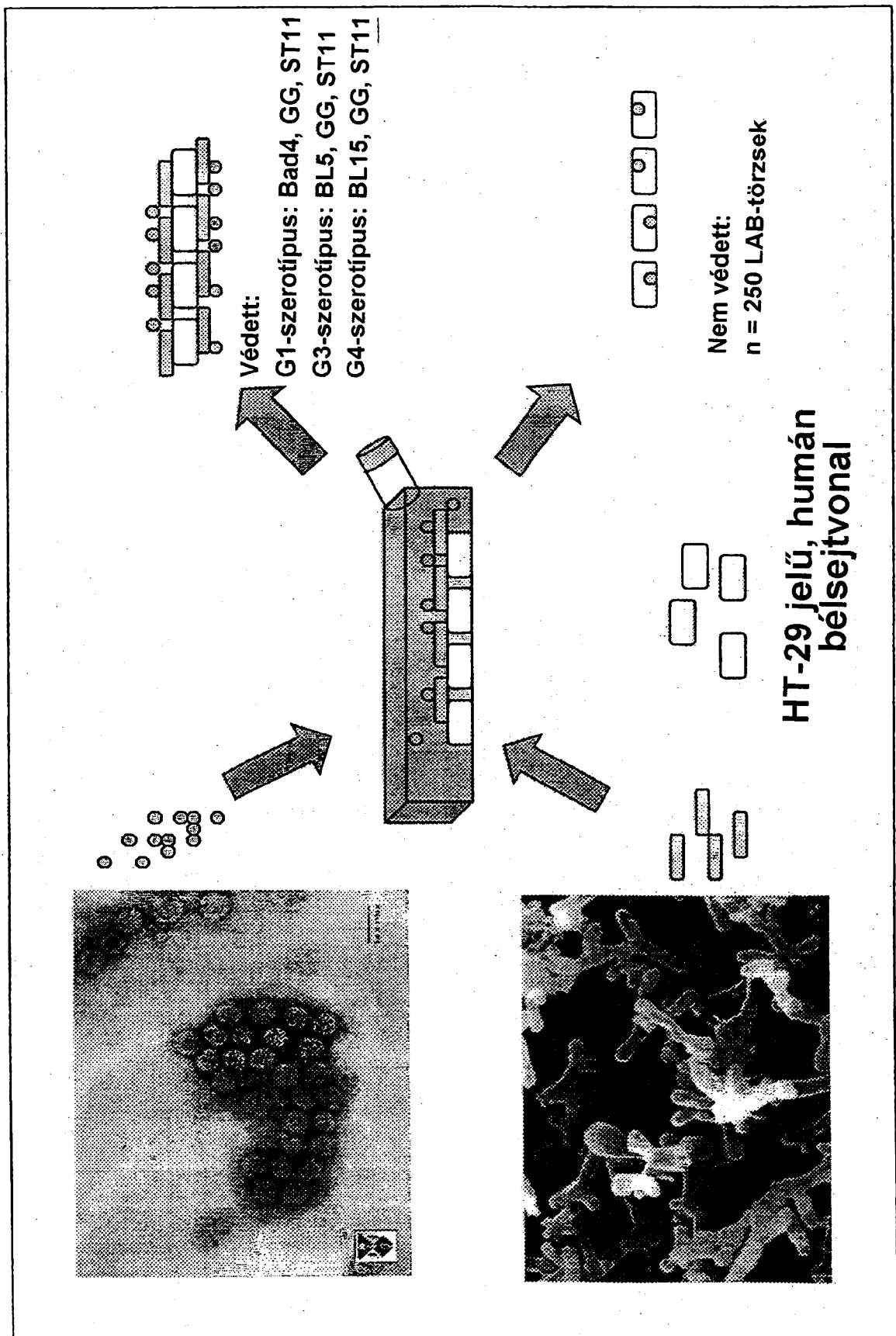
Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivőjelölt

Főfeladat



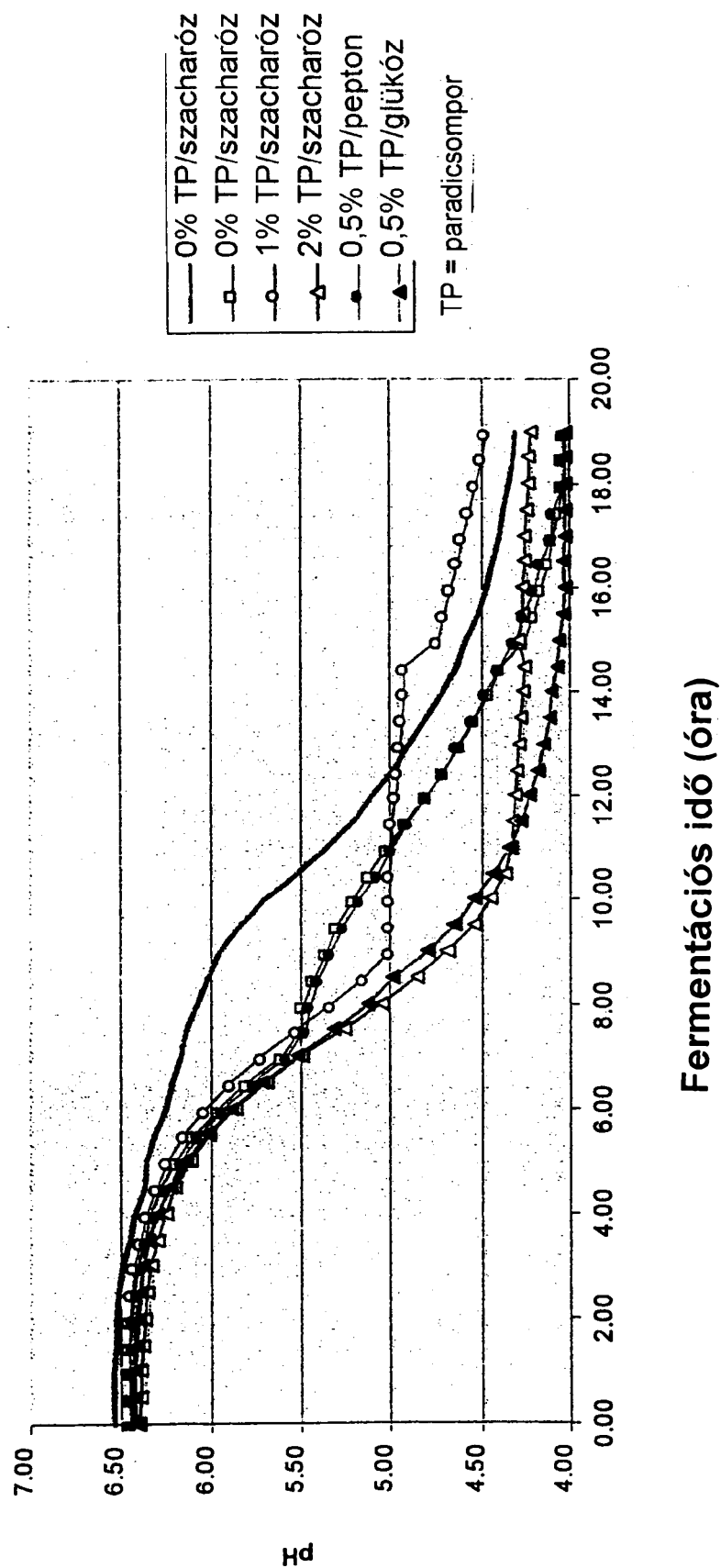
1. ábra





2. ábra

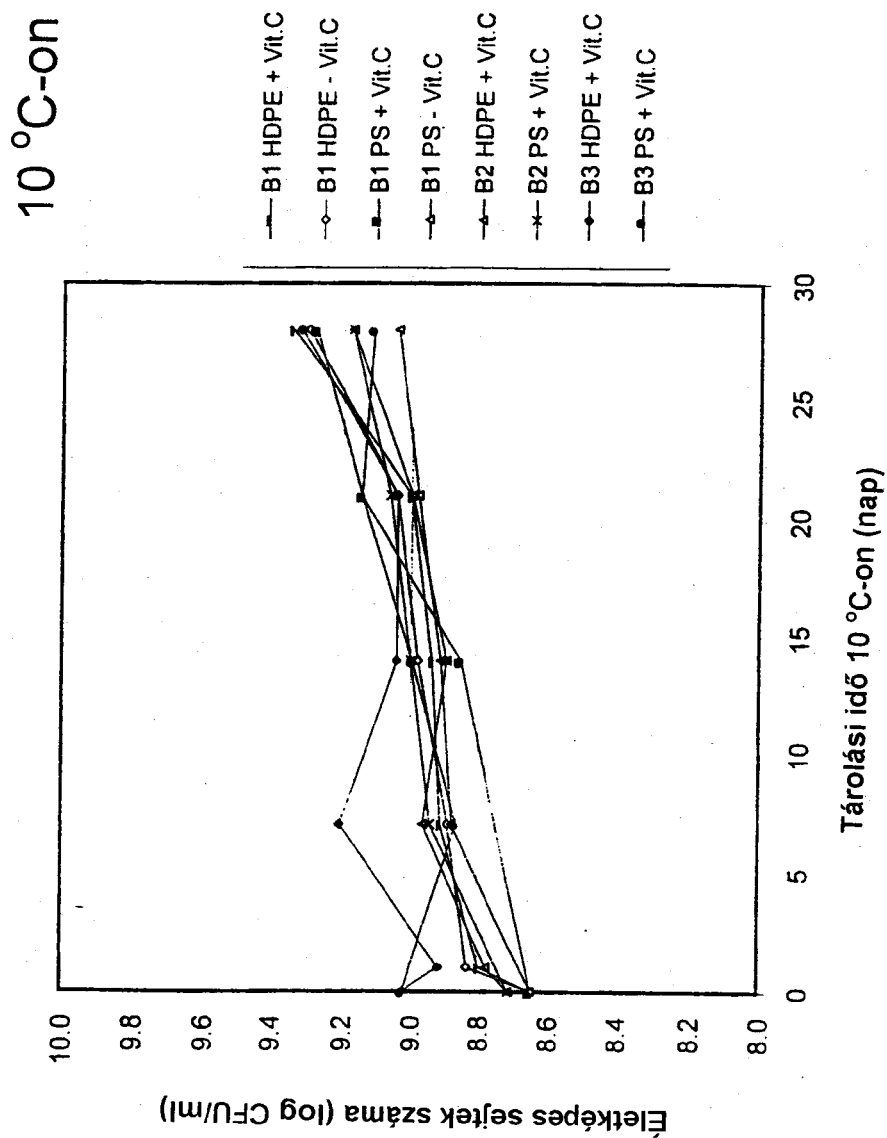
L- casei ST11 savasítása különböző szaporító tápközegekben





3. ábra

Túlélés gabonáitálban



HDPE: nagy sűrűségű polietilén

PS: polisztiirén

VitC: C-vitamin

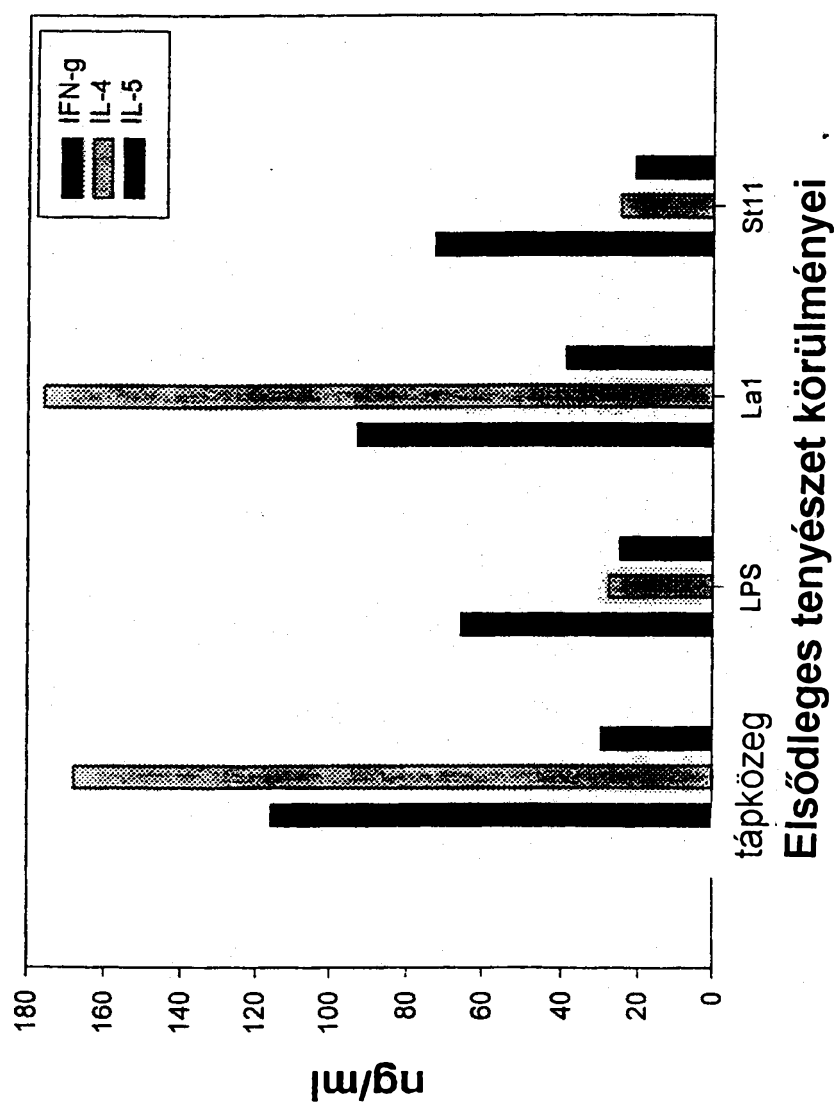
IL-12



IL-10

β-2m

5. ábra
Citokinfelszabadulás IVD-980916-ban
(ELISA 981103 & 980925)

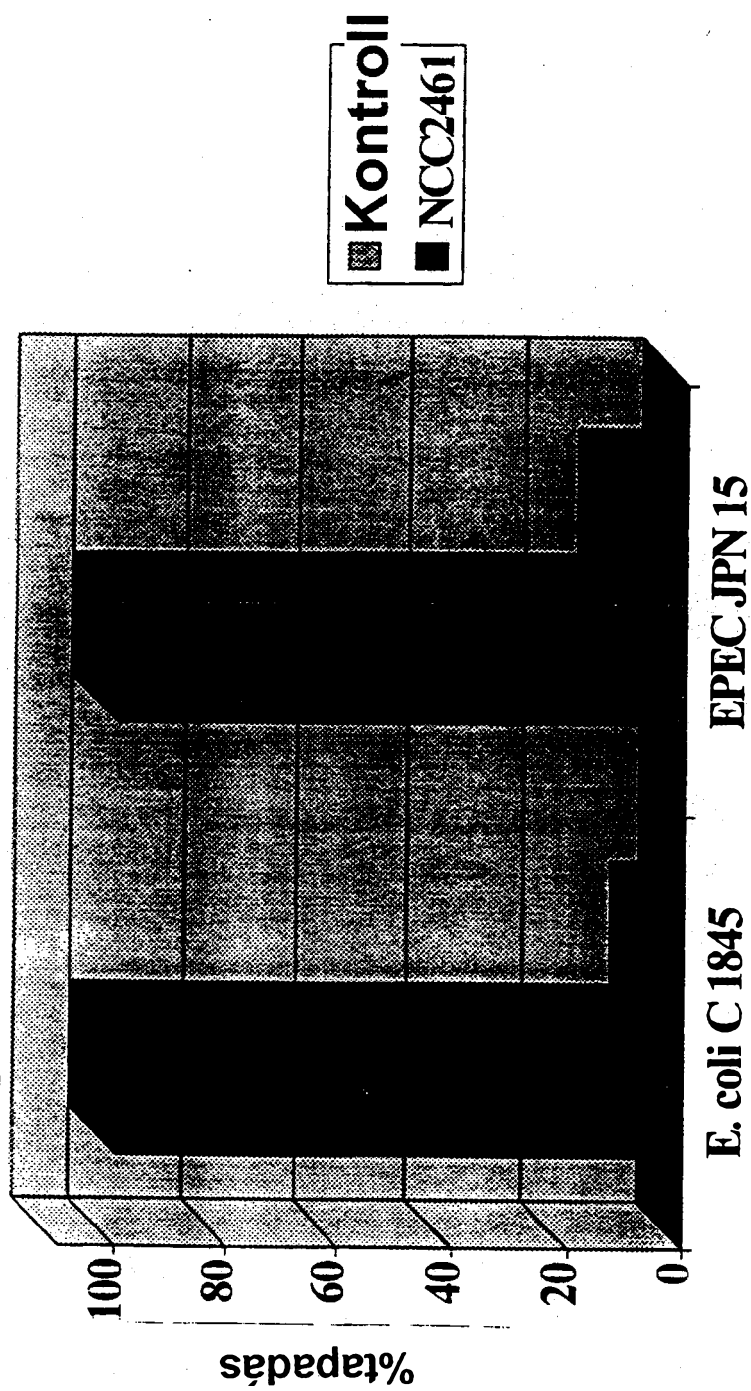


Elsődleges tenyészet körülményei

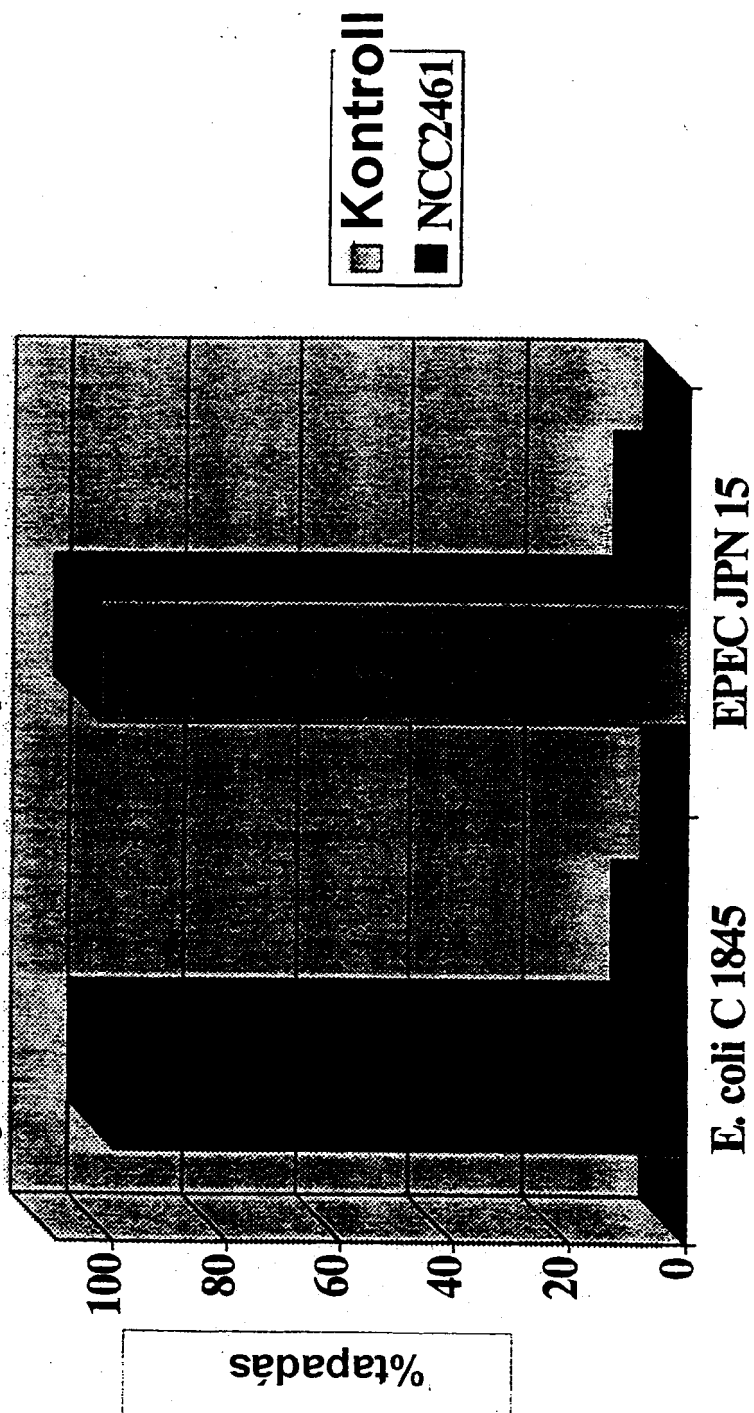


6. ábra

Enterovirulens *E. coli* tapadásának gátlása NCC 2461 baktériumtenyésztéssel történő kapcsolatba kerülés esetén

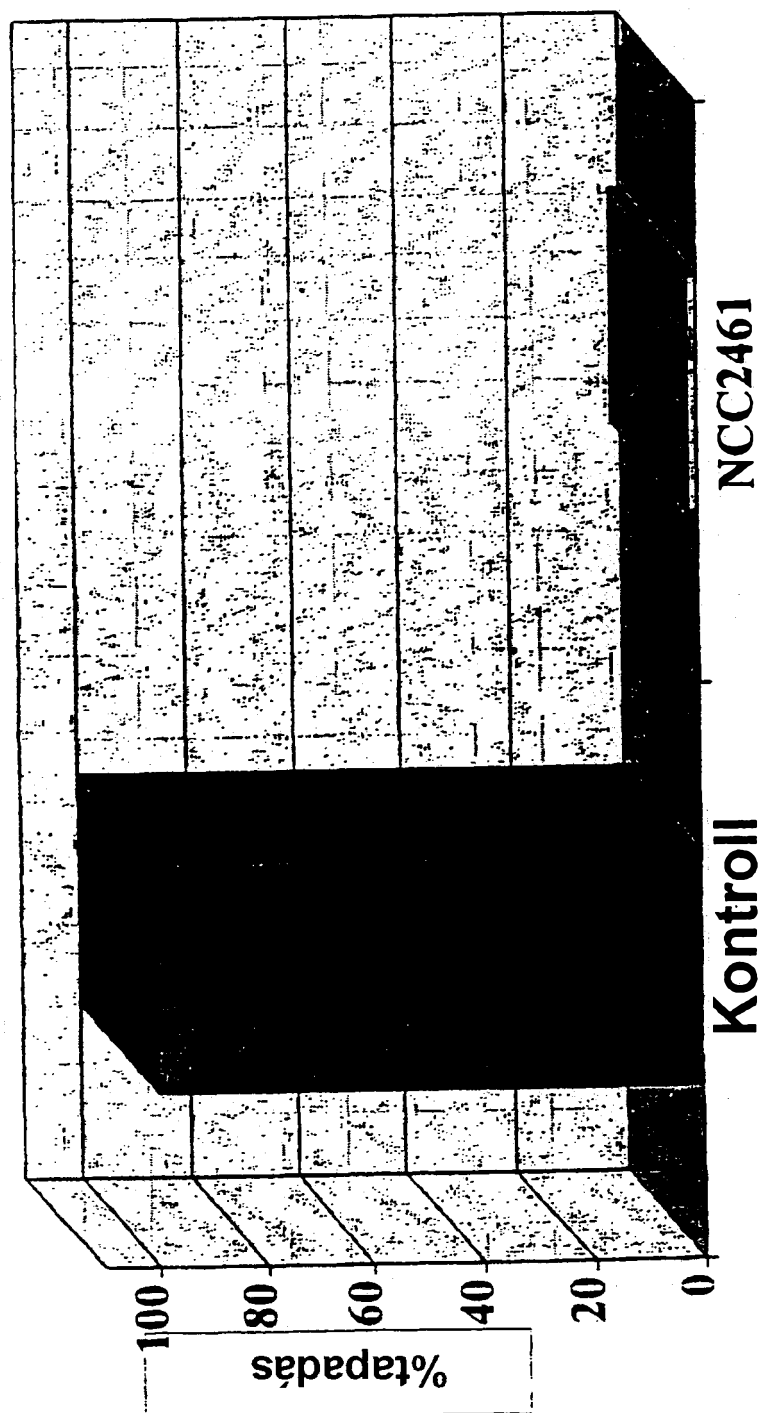


7. ábra
Enterovirulens *E. coli* tapadásának gátlása NCC 2461
felülcszójával történő kapcsolatba kerülés esetén



8. ábra

***Salmonella* behatolásának gátlása NCC 2461
baktériumtenyésztéssel történő kapcsolatba kerülés esetén**



9. ábra

Salmonella typhimurium behatolásának gátlása NCC 2461 felülírójával történő kapcsolatba kerülés esetén

