

P03 01271

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

Exogén tejsavbaktérium-törzs alkalmazása *Actinomyces*
naeslundii által okozott betegségek ellen

KIVONAT

A találmány a száj mikroflórája szempontjából exogén,
5 olyan tejsavbaktérium törzsnek az emlősök szájüregében a
plakk-képződés csökkentésére vagy a fogszuvasodás és más,
az *Actinomyces naeslundii* fajnak tulajdonított egyéb beteg-
ségek megelőzésére szolgáló készítményekben történő alkal-
mazására vonatkozik. A tejsavbaktériumokat a fogakon való
10 megtapadási és növekedésgátló hatóanyagot termelő képessé-
gük alapján választották ki.

Jellemező alv. 0
Zolika Andra

P03 01271

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNYExogén tejsavbaktérium-törzs alkalmazása *Actinomyces*
naeslundii által okozott betegségek ellen

A jelen találmány olyan, exogén baktériumoknak a száj mikroflórájába történő bejuttatására vonatkozik, melyek képesek befolyásolni az *Actinomyces naeslundii* megtelepedését, valamint mérsékelni az *Actinomyces naeslundii* által előidézett betegségek súlyosságát.

A találmány háttere

A szájüreg mikroflórájában egyaránt előfordulnak rezidens és nem-rezidens fajok. Előbbiek közé tartoznak azok a mikroorganizmusok, amelyek képesek többé-kevésbé állandó jelenlétet kialakítani a szájüreg felületein. Ezek a baktériumok főleg a nyelven, a száj nyálkahártyáján és a fogakon helyezkednek el, míg a fogíny, az ajkak, a fal, a szájpaddás és a szájalap csak szerény mikroflóra kialakulását teszi lehetővé.

A fogakon kialakuló plakk tulajdonképpen egy film, mely a fogak felszínén alakul ki, és olyan baktériumsejtek alkotják, melyek az extracelluláris poliszacharidokban és a nyálból képződő anyagokban vannak jelen. Közvetlenül a nyálképződés után a fogakat beborítja a nyál amorf rétege, a szerzett zománchártya (AEP), amely mintegy 1,3 μ m vastagságú, és nem távolítható el közönséges fogmosással. Az AEP kialakulását azonnal követi a baktériumok megtelepedése, és a plakk-képződés sokrétegű szerkezetként 8-12 órán belül nyilvánvalóvá válik. Ennek első rétege olyan baktériumokból (az elsőként megtelepedőkből) áll, melyek főleg specifikus adhezin-receptor felismerés révén kötődnek a fogakhoz. Ez a réteg ad tápot a másodlagosan megtelepedő fajoknak, melyek analóg módon, specifikus kötődéssel vagy egyszerű hozzákapcsolódással tapadnak egymáshoz.

A nyelven és a száj nyálkahártyáján a természetes

mikroflóra *Streptococcus*, *Veillonella*, *Bacteroides* és *Haemophilus* fajokból áll. A fogakon a *Streptococcus* és *Actinomyces* fajok vannak fölényben, de mellettük egy sor Gram-pozitív és -negatív coccus és pálca is előfordul.

5 Ezek a mikroorganizmusok zömmel ártalmatlan együttélők, de szép számmal akadnak köztük jó néhány betegség kórokozói is [Hill, M.J. & Marsh, P.D. eds. *Human Microbial Ecology*, CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A. (1990)].

Közelebbről, az *Actinomyces naeslundii* 1 (korábban
10 *Actinomyces naeslundii*) és 2 (korábban *Actinomyces viscosus*) genotípusú fajok szokásosan előfordulnak az emberi fogakon képződő plakkokban. Ezek a fajok a legerősebb plakkképző törzsek közé tartoznak, mert képesek szorosan hozzátapadni a fogakhoz, és aggregálódni sok más baktériumfajjal,
15 elősegítve ezáltal jelenlétüket a szájüregben. Ezen túlmenően ezek a fajok rendszerint izolálhatók az idősebb emberek szuvas fogairól, és e betegség fő kóroki tényezőjeként tartják őket számon [Bowden, G.H. et al., „The diversity and distribution of the predominant ribotypes of
20 *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2 in samples from enamel and from healthy and carious root surfaces of teeth”, *J. Dent. Res.*, **78**:1800-1809 (1999)].

Az átmeneti mikroflóra olyan exogén baktériumokból áll, melyek alkalmanként jelen lehetnek a szájban, de nem
25 telepsznek meg állandó jelleggel (még az ezekkel a baktériumokkal végzett ismételt orális kezelés esetén sem). Valamennyi, az élelmiszerekben előforduló baktérium, különösen pedig a tejsavbaktériumok, részét képezhetik ennek az átmeneti mikroflórának.

30 Az ilyen exogén tejsavbaktériumok némelyikéről kimutatták, hogy képesek hozzátapadni a fogakon lévő hártványhoz. A WO 00/09080 számú irat (Société des Produits Nestlé) olyan tejsavbaktérium-törzsekre vonatkozik, melyek nem ré-

szei a száj rezidens mikroflórájának, mérsékelten savanyítanak, és képesek közvetlenül hozzátapadni a fogakon lévő hárttyához. Ezek a baktériumok különösen alkalmasak a fogszuvasodás és a periodontális fertőzések kezelésére és megelőzésére, melyet a kariogén mikroorganizmusok, így például a *Streptococcus mutans* és a *Streptococcus sobrinus* okoz.

Az exogén baktériumok olyan faktorokat is képesek termelni, amelyek gátolják a száj rezidens mikroflórájának szaporodását. Az EP-759469 számú irat (Société des Produits Nestlé) például *Micrococcus varians* által termelt bakteriocin alkalmazását ismerteti a szájüregben előforduló patogén mikroorganizmusok, így a *Streptococcus sobrinus*, a *Streptococcus sanguis*, a *Streptococcus mutans* és az *Actinomyces viscosus* fejlődésének gátlására. A bakteriocinok alkalmazása a fogszuvasodás elleni stratégiák egyike. Ezek a molekulák komoly figyelmet vontak magukra, mint lehetséges fogszuvasodás elleni hatóanyagok és a mikroorganizmusoknak a szájüregben való megtelepedését befolyásoló faktorok.

Fontos megjegyezni, hogy korábban semmilyen információ nem áll rendelkezésre olyan törzsekkel kapcsolatban, amelyek képesek lennének megtelepedni a szájüregben oly módon, hogy közvetlenül tapadnak a fogakon képződő hárttyához, és ugyanakkor olyan növekedésgátló faktorokat is termelnek, melyek befolyásolni tudják az *Actinomyces naeslundii* megtelepedését, és ezáltal mérsékelni az *Actinomyces naeslundii* fajjal kapcsolatba hozható betegségek súlyosságát.

A találmány rövid ismertetése

Fentiek alapján a jelen találmány tárgya a száj mikroflórája szempontjából exogén, a fogak felületén való megtapadási képességük, valamint növekedésgátló faktort termelő képességük alapján kiválasztott tejsavbaktériumok alkalmazása olyan készítmények előállítására, melyek alkalmasak a fogakon képződő plakkok képződésének mérséklésére valamint

a fogszuvasodás és más, az *Actinomyces naeslundii* fajnak tulajdonítható betegségek megelőzésére, illetve kezelésére emlősökben.

A tejsavbaktériumokat a *Streptomyces thermophilus*,
5 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* és *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* által alkotott csoportból, közelebbről a CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986 és CNCM I-1987 jelű törzsek által alkotott csoportból választjuk ki.

10 Ezek a tejsavbaktériumok a fogak felszínén megtelepedve és növekedésgátló faktorokat termelve az *Actinomyces naeslundii* jelenlétét erőteljesen mérséklük, ezáltal csökkentve a fogakon a plakk-képződést, valamint a fogszuvasodás és más, az *Actinomyces naeslundii* fajjal kapcsolatos
15 fertőzések előfordulási gyakoriságát vagy súlyosságát.

A találmány továbbá olyan készítményekre vonatkozik, amelyek az *Actinomyces naeslundii* megtelepedésének mérséklése révén megőrzik a szájüreg egészségét. Ezek a készítmények olyan exogén tejsavbaktériumokat tartalmaznak, amelyeket
20 ket a fogak felületén való megtapadási képességük valamint növekedésgátló faktort termelő képességük alapján választottunk ki.

Az ilyen készítmények grammonként legalább 10^4 - 10^9 telepképző egységnyi (cfu) mennyiségben tartalmaznak tejsavbaktériumokat.
25

A jelen találmány szerinti készítmények az *Actinomyces naeslundii* által emlősökben előidézett fertőzések, közelebbről a fogakon való plakk-képződés és a fogszuvasodás megelőzésére vagy kezelésére alkalmazhatók, melynek során a
30 szóban forgó emlős szervezetet olyan készítménnyel tápláljuk, amely legalább egy, a fogak felületén való megtapadási képessége, valamint növekedésgátló faktort termelő képessége alapján kiválasztott tejsavbaktérium törzset tartalmaz,

és mérsékli az *Actinomyces naeslundii* megtelepedését a szájüregben.

A találmány részletes ismertetése

5 Az alábbiakban következő részletes leírás során a száj kifejezés az emberek vagy más emlős szervezetek, például háziállatok szájüregére vonatkozik, melynek része a száj nyálkahártyával borított felülete (fogíny, ajak, szájfal, szájpadlás és szájalap), a nyelv és a fogazat (ideértve a mesterséges szerkezeteket is).

10 A „növekedésgátló faktor” kifejezés bármely olyan, a megtapadt exogén tejsavbaktériumok által termelt extracelluláris hatóanyagot jelent, amely képes gátolni az *Actinomyces naeslundii* szaporodását.

15 A jelen találmány - elsődleges tárgyának megfelelően - a száj mikroflórája szempontjából exogén, a fogak felületén való megtapadási képességük valamint növekedésgátló faktort termelő képességük alapján kiválasztott tejsavbaktériumok alkalmazására vonatkozik, olyan készítmények előállítására, melyek alkalmasak a fogakon a plakk-képződés mérséklésére, 20 valamint a fogszuvasodás és más, az *Actinomyces naeslundii* fajnak tulajdonítható betegségek megelőzésére, illetve kezelésére.

A találmány szerinti megoldásban a tejsavbaktériumokat a *Streptomyces thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. 25 *lactis* és *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* által alkotott csoportból, közelebbről a *Streptomyces thermophilus* (NCC 1529) (CNCM I-1984), *Streptomyces thermophilus* (NCC 1561) (CNCM I-1985), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (NCC 2211) (CNCM I-1986) 30 és *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (NCC 2225) (CNCM I-1987) törzsek által alkotott csoportból választhatjuk ki.

Előnyösen tejtermékből (pl. tejből vagy sajtból) szár-

mazó tejsavbaktériumot alkalmazunk.

A találmány szerinti tejsavbaktériumok „mérsékelten savanyítanak”, ami azt jelenti, hogy kevésbé savanyítanak, mint a patogén törzsek. Ennek megfelelően közreműködnek abban, hogy a szájüreg pH értéke 5,5 - 7,0 legyen.

Ezeket a törzseket azon képességük alapján választottuk ki, hogy képesek hozzátapadni a fogakon képződő hártya-hoz, optimális szaporodási hőmérsékletük 37°C körüli, mely a szájüreg normális hőmérséklete. Ezen túlmenően a szóban forgó tejsavbaktériumok képesek növekedésgátló faktorokat termelni, aminek révén - megtapadási képességükkel együttesen - képessé válnak arra, hogy számottevően mérsékeljék az 1 és 2 genotípusba tartozó *Actinomyces naeslundii* fajok megtelepedésének mértékét.

A szóban forgó törzsek ezen túlmenően erjesztik a glükózt és a szacharózt, nem szintetizálnak glukánokat, melyek a kariogén törzsek patogenitására jellemző faktorok.

A találmány értelmében lehetőség van például arra is, hogy csupán egy tejsavbaktériumot alkalmazzunk, egy baktériocinnel kombinálva.

A tejsavbaktériumokat például élelmiszerben, hobbi-állat-tápban, kozmetikumban vagy gyógyszerkészítményben egyaránt alkalmazhatjuk. Ennek megfelelően a találmány szerinti készítmény előnyösen például fogkrém, szájvíz, dezodor, ital, édesség, gyermektápszer, fagylalt, jégkrém, édes salátaöntet, tejkészítmény, sajt, túró, joghurt, savanyított tejkészítmény, kávétejszín vagy tejszínhab lehet.

Az exogén tejsavbaktériumokat a készítményben grammonként legalább 10^4 - 10^9 telepképző egységnyi (cfu) mennyiségben alkalmazhatjuk.

A szóban forgó tejsavbaktériumoknak a száj mikroflórájába való beépülését és ennek hatását patkány modellben vizsgáltuk. A CNCM I-1985 és CNCM I-1986 jelű törzsek képe-

sek voltak befolyásolni a száj mikrobiális ökológiáját, számottevően mérsékelve az összes telepképző egység (cfu) számát. Ezek a törzsek közelebbről képesek voltak arra, hogy jelentős mértékben csökkentsék a 2 genotípusba tartozó

5 *Actinomyces naeslundii* megtelepedésének mértékét, mellyel a kísérleti állatokat megfertőztük (lásd a példákat).

AZ ALKALMAZOTT TEJSAVBAKTÉRIUM-TÖRZSEK BIOKÉMIAI JELLEMZÉSE

Erjesztési tulajdonságok: 49 egyszerű cukrot vizsgáltunk meg api 50 CH bioMérieux tesztcsík alkalmazásával

10 (bioMérieux S.A., 69280 Marcy-l'Étoile, Franciaország). Az eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat

A *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNCM I-1987 (A), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNCM

15 I-1986 (B), *Streptomyces thermophilus* CNCM I-1984 (C) és *Streptomyces thermophilus* CNCM I-1985 (D) cukorerjesztése

Cukor	A	B	C	D	Cukor	A	B	C	D
Adonit	+++				Laktóz	+	++++	+++	++++
Aeszkulin	++	++++			D-lixóz				
Amigdalín	++++				Maltóz	++			
D-arabinóz					Mannit	+++	++		
L-arabinóz					D-mannóz	+	++++		
D-arabit					Melezitóz				
L-arabit	+++				Melibióz				
Arbutin	+++	+++			α -metil-D-glükózid				
Cellobióz	+++	++++			α -metil-D-mannózid				
Dulcit					d-raffinóz				
Eritrit					Ramnóz				
D-fruktóz	+	++++			Ribóz	++	++		
D-fukóz					Szalicin	+++	+++		
L-fukóz					Szorbit				
Galaktóz	++	++++			L-szorbóz				

Cukor	A	B	C	D	Cukor	A	B	C	D
β -gencio-bióz	+++				Keményítő				
Glükonát					Szacharóz			+++	++++
2-keto-glükonát					D-tagatóz				
5-keto-glükonát					Trehalóz	++			
GlkNac	+	++++			D-turanóz	++			
D-glükóz	+	++++	+	++	Xilit	+++			
Glicerín					D-xilóz				
Glikogén					L-xilóz				
Inozit					L-xilóz				
Inulin					β -metil-xilozid				

+, ++, +++, +++++ mutatja, hogy az erjesztés 3, 6, 24 vagy 48 óra elteltével indul meg.

A *Streptomyces thermophilus* (NCC 1529), *Streptomyces thermophilus* (NCC 1561), *Lactococcus lactis subsp. lactis* (NCC 2211) és *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* (NCC 2225) törzseket a Budapesti Egyezmény értelmében 1998. március 3-án letétbe helyeztük a Collection Nationale des Cultures des Microorganismes gyűjteményben (25 rue de docteur Roux, 75724 Paris, Franciaország), ahol azok a CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986 illetve CNCM I-1987 nyilvántartási számot kapták.

A jelen találmány tárgya másrészt a szájüreg egészségének megőrzésére szolgáló készítmény, mely mérsékli az *Actinomyces naeslundii* megtelepedését emlősök esetében, és olyan exogén tejsavbaktériumokat tartalmaz, melyeket a fogak felületén való megtapadási képességük, valamint növekedésgátló faktort termelő képességük alapján választottunk ki.

Ezek a készítmények közelebbről a fogakon végbemenő plakk-képződésnek és más, az *Actinomyces naeslundii* fajjal

kapcsolatos fertőzésnek tulajdonítható betegségeknek, például a fogszuvasodásnak a megelőzésére, illetve kezelésére szolgálnak.

A találmány szerinti tejsavbaktériumokat a *Streptomyces thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* és *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* által alkotott csoportból, előnyösen a CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986 és CNCM I-1987 jelű törzsek által alkotott csoportból választjuk ki.

10 Ezek a készítmények grammonként legalább 10^4 - 10^9 telepkepző egységnyi (cfu) tejsavbaktériumot tartalmaznak.

Előállíthatók szinergisztikus készítmények is, melyek adalékként legalább egy, a Gram-pozitív szájbaktériumok elleni aktivitással rendelkező bakteriocint tartalmaznak. Ebben az esetben a szájhigiéné fenntartására szolgáló készítmények 0,00001% és 50% közötti mennyiségben, előnyösen pedig 0,00001% és 15% közötti mennyiségben tartalmaznak tisztított bakteriocint. Az alkalmazott bakteriocin előnyösen variacin (EP 0759469).

20 Annak érdekében, hogy a készítményt megóvjuk a lebomlástól, zsíroldékony antioxidánst is alkalmazhatunk. Alkalmas zsíroldékony antioxidánsok például egyebek között a tokoferolok, a butil-hidroxianizol (BHA), a butil-hidroxitoluol (BHT) és az aszkorbil-palmitát. A zsíroldékony antioxidáns 0,005% és 0,5% közötti mennyiségben, előnyösen pedig 0,005% és 0,01% közötti mennyiségben van jelen a készítményben, annak tömegére vonatkoztatva.

A jelen találmány szerinti fogápoló készítményekben használt alkalmas súrolószerek közé tartozik a kalciumkarbonát, a kalcium-aluminoszilikát, az alumínium-oxid és hidrátjai, a cink-ortofoszfát, műanyag részecskék és a szilícium-dioxid, ezek közül előnyösen szilícium-dioxidot alkalmazunk.

A jelen találmány szerinti készítmények pH értéke olyan, amely a szájüregben elfogadható, és abba a tartományba esik, amely a szóban forgó tejsavbaktériumok számára is megfelelő. Ez a pH érték a 3,0 és 9,5 közötti tartományban, előnyösen a 3,5 és 6,5 közötti tartományban van.

Ezek a készítmények előállíthatók hagyományos eljárásokkal, például az egyes komponensek megfelelő arányban történő összekeverésével, és végül - szükség esetén - az elegy pH-jának a kívánt értékre történő beállításával.

10 Az *Actinomyces naeslundii* 1 genotípusába (korábban *A. naeslundii*) és 2 genotípusába (korábban *A. viscosus*) tartozó fajok a legerőteljesebb plakk-képző orális törzsek közé tartoznak. Szokásosan izolálhatók a fogszuvasodási helyekről, különösen 40 év feletti emberek esetében, és e fajokat
15 tartják a fogszuvasodás fő kóroki tényezőjének.

A fentiek alapján a jelen találmány tárgya az *Actinomyces naeslundii* fajjal kapcsolatos emlős fertőzések, közelebbről a plakk-képződés és a fogszuvasodás megelőzésére vagy kezelésére szolgáló módszer is, melynek értelmében
20 a szóban forgó emlős szervezetet olyan készítménnyel tápláljuk, amely legalább egy, olyan tejsavbaktériumot tartalmaz, melyet a fogak felületén való megtapadási képessége, valamint növekedésgátló faktort termelő képessége alapján választottunk ki.

25 A kezelésre szolgáló készítmények grammonként legalább 10^4 - 10^9 telepképző egységnyi (cfu) tejsavbaktériumot tartalmaznak.

A következő példák a találmány jobb megértését szolgálják, anélkül, hogy annak tárgykörét bármi módon korlátozni kívánnák. A találmány bármely módosítása, kiegészítése a következőkben leírtakhoz képest, nyilvánvaló a szakmában jártasak számára. Az ilyen módosítások vagy kiegészítések a találmány nem esnek kívül a találmány tárgykörén. Az

idézett hivatkozások olyan mértékben vonatkoznak az eredeti közleményekre, amennyire ez a találmány jobb megértéséhez szükséges.

1. példa

5 In vitro vizsgálatok

A *Streptococcus thermophilus* NCC 1561 (CNCM I-1985) és *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCC 2211 (CNCM I-1986) (a továbbiakban *L. lactis* NCC 2211) törzsek felhasználásával biofilmet készítettünk a fogakon képződő plakk in vitro mo-
10 dellezésére.

Az *Actinomyces naeslundii* 1 genotípusába (korábban *A. naeslundii*) és 2 genotípusába (korábban *A. viscosus*) tartozó, OMZ 745 és OMZ 105 törzsek az Institute für Orale Mikrobiologie und Allgemeine Immunologie, University of Zü-
15 rich gyűjteményéből származnak, tenyésztésük FUM tápközegekben, anaerob körülmények között (GasPack System, BBL), 37°C-on történt.

Mindegyik törzset -20°C hőmérsékleten, glicerinben tároltunk, és előtenyésztésüket alkalmazásukat megelőző 14
20 órán át, a rájuk jellemző optimális növekedési hőmérsékleten végeztük.

A két kiválasztott, *L. lactis* NCC 2211 és *S. thermophilus* NCC 1561 törzssel olyan in vitro biofilmet oltottunk be, amely a 40 év feletti emberek szájában szokásosan elő-
25 forduló baktériumokból, nyállal bevont hidroxí-apatit korongokon alakítottunk ki. A tenyésztéshez használt FUM (Fluid Universal Medium) tápközeget oly módon alakítottuk ki, hogy pufferhatása révén kompenzálja a tesztelt törzsek savanyító hatását, és ilyen módon lehetővé tegye a szájban
30 honos baktériumok folyamatos növekedését (plakk-képződést), csakúgy, mint ahogyan az bekövetkezik a szájüregben uralkodó körülmények között (Gmur & Guggenheim, 1983). A vizsgálatokat három párhuzamosban végeztük, egymás mellett tesz-

telve a tejtermék eredetű törzseket tartalmazó és az ezek nélküli elegyeket. A kipróbált törzseket a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat

5 Az *in vitro* plakk-képződési kísérletekben felhasznált baktériumtörzsek és körülmények

Törzs	Jellemző tulajdonság	Tenyésztési körülmények
<i>S. thermophilus</i> NCC 1561	S-HA megtapadás	FUM, Belliker; 37°C
<i>L. lactis subsp. lactis</i> NCC 2211	S-HA megtapadás	FUM, M17-laktóz; 37°C
<i>S. sobrinus</i> OMZ 176	Kariogenitás	FUM; 37°C
<i>S. oralis</i> OMZ 607	Plakk-képzés	FUM; 37°C
<i>A. naeslundii</i> OMZ 745	Plakk-képzés, kariesz okozó	FUM; 37°C
<i>V. dispar</i> OMZ 493	Plakk-képzés	FUM; 37°C
<i>F. nucleatum</i> OMZ 596	Plakk-képzés	FUM; 37°C

Nyálhártya képződés: 10 mm átmérőjű szintetikus hidroxipapatit korongokat (HY-APATITE^R, Euro-Crystals, Landgraaf, Hollandia) bevonunk 800 µl emberi nyállal, és rázatás közben 4 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk 24 lyukú steril Nunclon lemezen.

Bakteriális konzorcium készítése: *S. thermophilus* NCC 1561, *L. lactis subsp. lactis* NCC 2211, *S. sobrinus* OMZ 176, *S. oralis* OMZ 607, *A. naeslundii* OMZ 745, *V. dispar* OMZ 493, és *F. nucleatum* OMZ 596 törzseket tenyésztettünk FUM-glükóz (*S. thermophilus* esetében FUM-laktóz) tápközegben, anaerob körülmények között, egy éjszakán át, 37°C-on. Az így kapott tenyészetek OD550 értékét FUM hozzáadásával 1 értékre állítottuk be, majd a szájban honos baktériumok 2 ml térfogatú mintáihoz 2 ml térfogatú *S. thermophilus* NCC 1561, illetve

L. lactis subsp. lactis NCC 2211 tenyészetet adtunk. Kontrollként az orális baktériumok tenyészetéből nyert mintát önmagában használtuk.

Biofilm kialakítása és feldolgozása: a Guggenheim és munkatársai által leírt módszert követtük [Validation of a new biofilm model, *J. Dent. Res.*, 77 (Spec. Iss. A.): 110 (Abstract No. 38) (1998)].

A biofilm-tenyészet analízise: a biofilmből nyert tenyészetet Columbia Blood Agaron (5% birkavér, Becton-Dickinson, Meylan Cedex, Franciaország) spirál alakban szélesztettük az *A. naeslundii* teljes sejtszámának és differenciálódásának meghatározása érdekében. A lemezeket anaerob körülmények között, 37°C-on, 48 órán át inkubáltuk.

A szájbán honos és a tejtermék eredetű törzsek szaporodási antagonizmusa

A törzseket és a tenyésztési körülményeket a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat

A szaporodási antagonizmus vizsgálata során alkalmazott baktériumtörzsek és tenyésztési körülmények

Törzs	Jellemző tulajdonság	Tenyésztési körülmények
<i>S. thermophilus</i> NCC 1561	S-HA megtapadás	Belliker; 42°C
<i>L. lactis subsp. lactis</i> NCC 2211	S-HA megtapadás	M17-laktóz; 37°C
<i>S. thermophilus</i> NCC 1536	Nem megtapadó	Belliker; 42°C
<i>A. naeslundii</i> OMZ 745	Plakk-képzés	BHI, 37°C; anaerobiózis
<i>A. viscosus</i> OMZ 105	Plakk-képzés	BHI; 37°C

A *Streptococcus thermophilus* NCC 1561, *Streptococcus thermophilus* NCC 1536 és *Lactobacillus lactis* NCC 2211 gát-

ló törzseket vizsgáltuk az *Actinomyces naeslundii* OMZ 745 és *Actinomyces viscosus* OMZ 105 céltörzsekkel szemben mutatott szaporodási antagonizmusuk szempontjából.

Módszer

- 5 - A gátló törzseket egy éjszakán át anaerob körülmények között BHI agarlemezeken tenyésztettük, amíg növekedésük a középső stacionárius fázist elérte.
- A céltörzsek 20 µl térfogatú szuszpenzióját 3 ml térfogatú, glükózt és laktózt tartalmazó BHI lágyagarral hígítottuk, alaposan összekevertük, majd haladéktalanul BHI agarlemezre öntöttük.
- 10 - A lemezeket szobahőmérsékleten egy órán át szilárdulni hagytuk, majd kereszt alakban átoltottuk rájuk az M17 táptalajon növesztett gátló törzseket. Ezzel párhuzamosan csak
- 15 gátló sejteket, illetve csak célsejteket tartalmazó kontroll tenyészeteket is készítettünk.
- Az lemezeket anaerob körülmények között, 37°C hőmérsékleten, 24 órán át inkubáltuk.

A szaporodási antagonizmust a kereszt körül megjelenő

20 kioltási zóna jelezte. A kontroll és a vizsgált tenyészetek közötti különbséget Student t-próba alkalmazásával határoztuk meg.

Eredmények

A *Streptococcus thermophilus* NCC 1561 és *Lactococcus*

25 *lactis* NCC 2211 törzsek képesek voltak megtelepedni és növekedni az S-HA korongokon kialakult plakk-szerű biofilmben, a 40,5 óra után mért korongonkénti teljes sejtszámukat a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat

A két tejtermék eredetű törzs beépülésének mértéke a
biofilmbe (cfu/korong)

(A megadott értékek három kísérlet átlagos adatai, a standard deviációval)

5

Beoltás módja	<i>S. thermophilus</i> NCC 1561 ($\times 10^6$)	<i>L. lactis</i> NCC 2211 ($\times 10^6$)
Az orális törzsekkel együtt	4,08 $\pm$ 1,78	5,76 $\pm$ 3,64
Az orális törzsek előtt	5,03 $\pm$ 2,21	3,87 $\pm$ 4,01

A tejtermékből származó törzsek szájban honos fajok biofilmjébe történő beépülésének hatását az 5. és 6. táblázat adatai mutatják. *Streptococcus thermophilus* NCC 1561 megtelepedése esetén (5. táblázat) általános csökkenés mutatkozott a teljes mikroflórában, amit a Columbia Blood Agar (CBA) lemezekén mért sejtszám jellemez, és a szájban honos törzsek között négynek az esetében figyelhető meg.

10

Midőn *Lactococcus lactis* NCC 2211 épült be a szájban honos törzsek közé (6. táblázat), a teljes mikroflórára jellemző, CBA lemezekén mért cfu jelentősen megfogyatkozott. A csökkenés mértéke szignifikáns volt az *Actinomyces naeslundii* OMZ 745 esetében, mely törzs jelenléte szignifikánsan gyengült ($p = 0,021$). Ez a csökkenés még jelentősebb volt, ha a gátló törzseket előbb oltottuk a korongokra, mint a szájban honos céltörzseket.

15

20

5. táblázat

Streptococcus thermophilus NCC 1561 hatása a szájbán honos törzsek jelenlétére (cfu/korong)

Kezelés	CBA ($\times 10^8$)	<i>A. naeslundii</i> OMZ 745 ($\times 10^6$)	MS ($\times 10^8$)
Kontroll	2,86 $\pm$ 2,14	5,29 $\pm$ 2,58	2,02 $\pm$ 1,68
+ NCC 1561	1,63 $\pm$ 0,55	4,75 $\pm$ 1,45	1,21 $\pm$ 0,81
Előinkubálás NCC 1561 törzsszel	2,32 $\pm$ 0,38 $^{\circ\circ}$	4,78 $\pm$ 2,29	1,48 $\pm$ 0,29

N = 3. *: p-értékek a kontrollra számolva (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$); $^{\circ}$: p-értékek a „+NCC 1561” kezelés adataira számolva ($^{\circ}$: $p < 0,05$; $^{\circ\circ}$: $p < 0,01$).

6. táblázat

Lactococcus lactis NCC 2211 hatása a szájbán honos törzsek jelenlétére (cfu/korong)

Kezelés	CBA ($\times 10^8$)	<i>A. naeslundii</i> OMZ 745 ($\times 10^6$)	MS ($\times 10^8$)
Kontroll	2,77 $\pm$ 2,16	6,07 $\pm$ 2,70	3,04 $\pm$ 2,88
+ NCC 2211	0,65 $\pm$ 0,33	4,59 $\pm$ 2,81	0,65 $\pm$ 0,33*
Előinkubálás NCC 2211 törzsszel	0,27 $\pm$ 0,11** $^{\circ}$	3,91 $\pm$ 3,29* $^{\circ}$	0,27 $\pm$ 0,11** $^{\circ\circ}$

10 N = 3. *: p-értékek a kontrollra számolva (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$); $^{\circ}$: p-értékek a „+NCC 2211” kezelés adataira számolva ($^{\circ}$: $p < 0,05$; $^{\circ\circ}$: $p < 0,01$).

Vizsgálatokat végeztünk annak igazolására, hogy a szájbán honos céltörzsek jelenlétének csökkenése a tejtermék eredetű törzsek velük szembeni szaporodási antagonistá hatásának tudható be (7. táblázat). Az *Actinomyces viscosus*

15

OMZ 105 és *Streptococcus thermophilus* NCC 1536 törzseket is bevontuk a vizsgálatba, mivel ezeket az *in vivo* modellben (2. példa) is szerepeltek.

Mind a négy tejtermék eredetű törzs gátolta a Gram-negatív *Actinomyces viscosus* OMZ 105 törzs növekedését. Ez a gátlás nem tulajdonítható a tejsav képződésének. Az *Actinomyces viscosus* ugyan csak aerob körülmények képes hasznosítani a tejsavat [van der Hoeven et al., *Oral Microbiol. Immunol.*, 5:223-225 (1990)], de nagy mértékben savtűrő. Ezt a megfigyelést igazoltuk, midőn az *Actinomyces viscosus* törzset 1% tejsavat tartalmazó táptalajon szélesztve nem tapasztaltunk növekedés gátlást.

7. táblázat

A *Streptococcus thermophilus* NCC 1561, *Streptococcus thermophilus* NCC 1536 és *Lactococcus lactis* NCC 2211 törzsek gátló hatása a szájban honos törzsek növekedésére

Céltörzs	Gátló törzsek			1% tejsav
	NCC 1561	NCC 1536	NCC2211	
<i>A. naeslundii</i> OMZ 745	+	+	+	-
<i>A. viscosus</i> OMZ 105	+	+	+	-

Következtetések

A *Streptococcus thermophilus* NCC 1561 és *Lactococcus lactis* NCC 2211 törzsek be tudnak épülni a fogakon képződő plakkokat modellező biofilmbe, és képesek befolyásolni a száj mikroflóráját, szignifikánsan csökkentve annak összes telepképző egység számát, és közelebbről, ezek a törzsek képesek szignifikánsan mérsékelni a 2. genotípusú *Actinomyces naeslundii* megtelepedésének mértékét. Ezen túlmenően ezek a tejtermék eredetű törzsek együttes tenyésztés

esetén képesek gátolni az 1. és 2. genotípusú *Actinomyces naeslundii* fajok szaporodását is.

2. példa

In vivo vizsgálatok

5 *In vivo* vizsgálatot végeztünk patkány modellben. A vizsgálat során a kiválasztott törzsek megtelepedését a kísérlet teljes időtartama alatt naponta elősegítettük, hűtött tejterméket tartalmazó táp alkalmazásával.

10 A vizsgálat időtartama 58 nap volt. Annak érdekében, hogy a kísérletet a nap folyamán végezhesük, az állatok aktív periódusát összesen 7 óra időtartamra kellett növelnünk. Ezt három lépésben valósítottuk meg, a 16., 17. és 18. napon a későbbiekben részletezett módon. A kariogén törzsekkel a 21. és 23. napon végeztünk kezelést, a tejtermék eredetű törzseket pedig a 23. naptól az 57. napig alkalmaztuk. A kísérleti állatok a tejtermék eredetű törzseket joghurt alapú tápkiegészítő formájában kapták, melyet a szokásos táp tartalmazott, a későbbiekben leírtak szerint. A patkányok fogairól az 58. napon, a vizsgálat végén tampo-
15 nálással mintát vettünk.
20

Kísérleti állatok és étrend

10 10 darab, egyenként négy kölyökpatkányt (Institute für Orale Mikrobiologie und Allgemeine Immunologie, University of Zürich, Zürich, Svájc)) tartalmazó almot használtunk a
25 kísérlet során. Valamennyi állat testtömegét megmértük a kísérlet kezdetén és végén. 13 napos korukban a kölyköket és az anyaállatokat alom nélküli saválló acél ketrecbe telepítettük át, és alacsony fluoridtartalmú porított (0,2 µm) Nafag tápon tartottuk őket, hogy az elválasztás
30 hatását kiküszöböljük (Rat Checkers No. 184, NAFAG, Gossau SG, Svájc). Az állatok vízfogyasztását nem korlátoztuk. Az állatok aktív fázisa, vagyis az időszak, amikor a patkányok táplálkoznak, az éjszaka, azaz a 18:00 és 06:00 óra közötti

időszak.

Annak érdekében, hogy az etetőedények feltöltésére a szokásos munkaidő alatt kerülhessen sor, az állatok 24 órás bioritmusát az aktív periódus megnyújtásával fokozatosan átállítottuk a 16. és 18. nap között, a világítást három alkalommal automatikusan szabályozva.

A 16/17. napon az aktív periódus kezdetét előrehoztuk 18:00 órától 15:00 órára, azaz az éjszakát a 15:00 és 03:00 óra közötti időszakra helyeztük át, és ezt folytattuk napról napra. A 17/18. napon az aktív periódus kezdetét előrehoztuk 15:00 órától 12:00 órára, hogy az éjszaka 12:00 és 00:00 óra közé essen, majd ezt kövesse a nappal.

Végül a 18/19. napon az aktív periódust 12:00 órától 10:00 órára hoztuk előre, így az éjszakára 10:00 és 22:00 óra között került sor, a nappal pedig 22:00 órakor kezdődött.

Ilyen módon a 19. napra befejeztük a patkányok aktív fázisának átállítását az éjszakáról a szokásos munkaidőre (10:00 - 22:00).

A 20. napon az anyaállatokat eltávolítottuk, és megkezdtek az állatok korlátozás nélküli táplálását 40 tömeg% szacharózt, 28 tömeg% tejpótlót (39,4 tömeg% SVPRO-PP 1611 szójafehérje kivonat, 49,3 tömeg% laktóz, 0,6 tömeg% L-metionin, 0,3 tömeg% L-lizin hidroklorid), 24 tömeg% búzaliszt, 5 tömeg% szeszélesztő, 2 tömeg% Gevral^R Instant Protein (Whitehall-Robins SA, 6301 Zug, Svájc) és 1 tömeg% nátrium-klorid tartalmú táppal.

A megtelepítési időszak alatt (21. és 22. nap) az ivóvizet a baktériumok megtelepedése érdekében 2 tömeg% glükózzal és 2 tömeg% szacharózzal egészítettük ki. A 23. napon az almokat a kezelésnek megfelelően három csoportra osztottuk, és minden állatot külön ketrecben helyeztünk el. Az állatoknak ettől kezdődően programozott etető berendezés

segítségével a 10. táblázat szerinti összetételű tápot adtuk. A kísérleti táplálást joghurt tartalmú készítménnyel 18-szor végeztük, melyek felváltva tartalmazták a kipróbálandó törzseket, a korábban leírt, módosított 2000a táp formájában.

Az állatok ivóvíz fogyasztását nem korlátoztuk. Az 58. napon, a tamponálásos mintavételt követően a kísérleti állatokat túlادagoltuk tiopentál-nátriummal (100 mg/kg testtömeg), majd a kómás állapot bekövetkezésekor dekapitáltuk őket.

A vizsgálat során a 8. táblázatban felsorolt törzseket használtuk.

8. táblázat

A vizsgálat során használt baktérium törzsek

Törzs	Jellemző tulajdonság	Tenyésztési körülmények
<i>S. thermophilus</i> NCC 1561	S-HA megtapadás	Belliker; 42°C
<i>S. thermophilus</i> NCC 1536	Nem megtapadó kontroll	Belliker; 42°C
<i>L. lactis subsp. lactis</i> NCC 2211	S-HA megtapadás	M17-laktóz; 37°C
<i>A. viscosus</i> OMZ 105	Plakk-képzés, S-HA megtapadás	BHI; 37°C

15 A vizsgált LAB törzsek előkészítése

Előkísérleteket végeztünk a növekedési paraméterek vizsgálatára, különös tekintettel a stacionárius növekedési fázis eléréséhez szükséges időtartamra, a későbbiekben megadott specifikus körülmények között. Ennek alapján megállapítottuk, hogy a *Streptococcus thermophilus* törzseket 7 órán át, a *Lactococcus lactis* törzset pedig 6 órán át kell növesztetni. Megvizsgáltuk a tejtermék eredetű törzsek fogyasztás utáni életképességét is, oly módon, hogy ugyanazt

a sejtszuszpenziót fagyasztás előtt, illetve az után szilárd táptalajra szélesztettük. A kísérleti állatokban való megtelepedés elősegítésére a tejtermék eredetű törzseket az alábbi előkezelésnek vetettük alá.

5 Előkezelés

- a törzsek 1% térfogatnyi mennyiségű glicerines törzstenyészetével alkalmas tápközeget oltottunk be, melyet egy éjszakán át inkubáltunk;
- ennek a tenyészetnek 5% térfogatnyi mennyiségével 10 adag 4 liter térfogatú, az optimális növekedési hőmérsékletre melegített, alkalmas tápközeget oltottunk be, és a késői exponenciális/korai stacionárius növekedési fázis eléréséig növesztettük őket;
- az elért cfu/ml értéket mind a négy vizsgált törzs esetén oly módon határoztuk meg, hogy két, véletlenszerűen kiválasztott tenyészet mintáját M17-laktóz-agaron szélesztettük. Az agarlemezeket anaerob körülmények között egy éjszakán át inkubáltuk;
- a tenyészeteket 10 percen át 6000 rpm-mel centrifugáltuk, a kiülepedett sejteket 150 ml térfogatú friss tápközegben szuszpendáltuk, és egy éjszakán át 4°C hőmérsékleten tartottuk;
- a sejtszuszpenziót ismét centrifugáltuk, majd a sejteket a fagyasztó közegben (15 térfogat% glicerinnel tartalmú Belliker, illetve M17 tápközeg) szuszpendáltuk;
- az elegyeket a fagyasztás alatt bekövetkező sejtpusztulást figyelembe véve oly módon mértük szét kisebb tételekre, hogy egy fiolába 2×10^{11} sejt jusson, majd felhasználásig -20°C hőmérsékleten tároltuk őket.

30 A kísérleti állatok kezelése a baktériumtörzsekkel

A kísérleti állatokat három kezelési csoportba osztottuk be (9. táblázat). Az egyes kezelési csoportokba 10 - 10 kölyökpatkány tartozott, melyek mindegyikét külön ketrecben

helyeztük el.

9. táblázat

A kezelési csoportok

Csoport	Kezelés
1	<i>A. viscosus</i> OMZ 105; <i>S. thermophilus</i> NCC 1536
2	<i>A. viscosus</i> OMZ 105; <i>S. thermophilus</i> NCC 1561
3	<i>A. viscosus</i> OMZ 105; <i>L. lactis</i> NCC 2211

Az állatok mindegyikét előbb a 21. és a 22. napon meg-
5 fertőztük *Actinomyces viscosus* OMZ 105 törzsszel.

A vizsgált tejsavbaktériumokkal naponta végeztünk ke-
zelést (mivel ezeket a joghurt alapú táp tartalmazta), a
23. naptól kezdődően. 200 ml térfogatú joghurthoz 2 fiolá-
nyi fagyasztott tenyészetet adtunk, melyek mindegyike a
10 vizsgált törzsek 2×10^{11} sejtjét tartalmazta, hogy a sej-
tek végkoncentrációja legalább 10^9 cfu/ml legyen. Negatív
kontrollként a S-HA megtelepedésre nem képes *Streptococcus*
thermophilus NCC 1536 törzset használtuk.

Az 1 ml térfogatú joghurtot, illetve a 400 mg tömegű
15 2000a tápot 20 percenként felváltva kínáltuk fogyasztásra a
kísérleti állatoknak, naponta 18 alkalommal (10. táblázat).
Ilyen módon az állatok összesen 18 ml joghurtot és 7,2 g
porított tápot kaptak.

Az egyes tápok programozható adagolókészülék etető-
20 edényeibe mértük be, mely a megfelelő tápot a megfelelő
időben automatikusan kínálta fogyasztásra a kísérleti álla-
toknak.

10. táblázat
Etetési protokoll

Sorszám	Erősen kariogén táp	Joghurt alapú táp	Sorszám
1	10:00	10:20	2
3	10:40	11:00	4
5	11:20	11:40	6
7	12:00	12:20	8
9	12:40	13:00	10
11	13:20	13:40	12
13	14:00	14:20	14
15	14:40	15:00	16
17	15:20	15:40	18
19	16:00	16:20	20
21	16:40	17:00	22
23	17:20	17:40	24
25	18:00	18:20	26
27	18:40	19:00	28
29	19:20	19:40	30
31	20:00	20:20	32
33	20:40	21:00	34

Bakteriológiai kiértékelés

A kísérlet eredményének bakteriológiai kiértékeléséhez az 58. napon kezelési csoportonként 5 - 5 patkány fogzatán tamponálásos mintavételezést végeztünk. A tamponokról készült szuszpenziót egyrészt Petri-csészében lévő szilárd táptalajra szélesztettük a telepképző egységek (cfu) számának meghatározására, másrészt üvegből készült tárgylemezre vittük a teljes sejtszám (TCN) immunfluoreszcenciás meghatározására.

A cfu meghatározás menete a következő volt:

- a patkányok fogának felületét vattás végű pálcikával át-

töröltük, melyet haladéktalanul 5 ml térfogatú, 0,9 tömeg% koncentrációjú steril nátrium-klorid oldatba merítettünk;

- az oldatot alaposan megkevertük, majd 5 másodpercen át
5 50 W energiájú ultrahangos kezelésnek vetettük alá;
- a megfelelően hígított szuszpenziót spirál alakban CBA, MS és HJL agarra szélesztettük;
- a CBA és MS lemezeket 37°C hőmérsékleten, a HJL lemezeket 45°C hőmérsékleten inkubáltuk.

10 *A TCN meghatározás menete a következő volt:*

- 24 lyukú, üvegből készült tárgylemezbe (Dynatech Produkte AG, Embrach Embraport, Svájc) lyukanként 10 µl térfogatnyit mértünk be a tamponálással kapott, a cfu meghatározáshoz készített, hígítatlan szuszpenzióból;
- 15 - a lemezben lévő mintákat 2 percen át metanolban fixáltuk, majd levegőn megszárítottuk;
- a mintákat 10 µl térfogatú, ELISA pufferrel hígított, megfelelő antitesttel vagy antiszérummal 37°C hőmérsékleten inkubáltuk 30 percen át;
- 20 - a lyukak oldaláról eltávolítottuk a nedvességet, majd a lemezt előbb ELISA pufferbe, majd desztillált vízbe mérítve mostuk, azután levegőn megszárítottuk;
- a lyukakba bemértünk 10 µl térfogatú, 1:400 arányban hígított kecskében termelt anti-nyúl-IgG (H + L) - FITC
25 reagenst (Sigma), és a lemezt 37°C hőmérsékleten inkubáltuk 30 percen át;
- a lemezt a korábbiakban leírtak szerint mostuk, és levegőn megszárítottuk;
- a lyukakba 49 µl rögzítő folyadékot mértünk, a lemezt be
30 fedtük üveglappal, és fluoreszcens mikroszkóp alatt megszámloltuk a fluoreszkáló sejteket.

Az adatok statisztikai kiértékelését kettős ANOVA módszerrel [Snedecor & Cochran (1980)] végeztük.

Eredmények

A hűtött tejtermékkel való etetés formájában a tejtermék eredetű törzsek folyamatos beépülését célzó kísérlet során kapott adatokat a 11. táblázat tartalmazza.

5 **Bakteriológiai kiértékelés** (11. táblázat)

A törzsek megtelepedése: a plakk-képző *Actinomyces viscosus* OMZ 105 törzs sejtjei $1,7 \pm 1,1$ cfu mennyiségben voltak jelen, midőn a kontrollként használt, megtapadásra nem képes *Streptococcus thermophilus* NCC 1536 törzsszel egészítettük ki a tápként alkalmazott tejterméket. A tejtermék eredetű törzsek sejtjeinek számlálása mikrobiológiai módszerrel nem volt lehetséges. A három, megtapadásra képes tejtermék eredetű törzs jelenléte felismerhető volt a 2. és 3. kezelési csoportból kapott plakkok mintáiban. Mivel ezek az egyéb
10 szájbaktériumokkal és a szájból származó részecskékkel aggregálódva, nagyobb csomók formájában voltak jelen, pontos mennyiségi meghatározásuk megoldhatatlan feladatnak bizonyult.

A teljes mikroflóra (TF) változása: a három kezelési csoport adatai alapján megállapítható volt, hogy a megtapadásra képes *Streptococcus thermophilus* NCC 1561 és *Lactobacillus lactis* NCC 2211 törzsek jelenléte esetén a CBA agaron a telepkepző egységek (cfu) száma szignifikánsan kevesebb volt, mint a megtapadásra nem képes *Streptococcus*
20 *thermophilus* NCC 1536 törzsszel kezelt kontroll csoportban (11. táblázat). A 2. kezelési csoportban a cfu csökkenése $p_F < 0,01$ szignifikancia faktorról, a 3. kezelési csoportban pedig a még szignifikánsabb $p_F < 0,001$ értékkel jellemezhető.

A vizsgált törzsek hatása az *Actinomyces viscosus* OMZ 105
30 **megtelepedésének mértékére a fogakon:** a kontroll kezeléshez képest a plakk-képző *Actinomyces viscosus* OMZ 105 baktérium telepkepző egységeinek számában kevésbé hangsúlyos, de szignifikáns mértékű ($p_F < 0,01$) csökkenés mutatkozott a meg-

tapadásra képes törzsek alkalmazása esetén (11. táblázat). Az *Actinomyces viscosus* részaránya az összes mikroorganizmus között a cfu mérések tanúsága szerint azonban nem változott számottevően. Valamennyi kezelés esetén az összes telepkepző egységnek mintegy 50%-a volt *Actinomyces viscosus* telepként azonosítható.

11. táblázat

A teljes mikroflóra, illetve az *Actinomyces viscosus* OMZ 105 telepkepző egységeinek átlagos száma és százalékos aránya patkányonként. (N = 5)

Kezelés	TF CBA agaron ($\times 10^6$)	OMZ 105 CBA agaron ($\times 10^6$)	% OMZ 105 CBA agaron	TF MS agaron ($\times 10^4$)
1 (NCC 1536)	32,5 $\pm$ 13,87	17,3 $\pm$ 11,01	52,8 $\pm$ 23,09	41,9 $\pm$ 41 n.s.
2 (NCC 1561)	17,6 $\pm$ 6,57	8,0 $\pm$ 1,96	47,2 $\pm$ 9,37	5,6 $\pm$ 3,8 n.s.
3 (NCC 2211)	13,9 $\pm$ 4,85	5,8 $\pm$ 2,07	43,4 $\pm$ 18,16	1,7 $\pm$ 1,11 n.s.
SEM	2,99	2,17	5,65	10,33
p _F	0,001	0,01	n.s.	n.s.
LSD 0,05*	9,21	6,69	-	-
LSD 0,01**	12,92	9,37	-	-
LSD 0,001***	18,25	-	-	-

A 2. és 3. kezeléseket összehasonlítottuk az 1. kezeléssel, SEM = az átlag standard hibája; n.s. = nem szignifikáns. CBA = Columbia Blood Agar; MS = Mitis-salivarius agar. OMZ 105: 2. genotípusú *Actinomyces naeslundii*.

15 Ebben az *in vitro* vizsgálatban a naponta adott törzsek egyértelmű gátló hatással voltak a teljes mikroflórára, melynek cfu értéke szignifikánsan csökkent. Ez a csökkenés a tejtermék eredetű törzseknek a szájban honos törzsekre

gyakorolt szaporodási antagonista hatásával magyarázható. *In vitro* körülmények között például mindannyiuk, így az S-HA megtapadási képességgel nem rendelkező *Streptococcus thermophilus* NCC 1536 törzs is képes gátolni az *Actinomyces viscosus* OMZ 105 növekedését. *In vivo* körülmények között azonban ez a hatás csak az S-HA megkötődési képességgel rendelkező törzsek esetében észlelhető, mivel a 2. és 3. kezelésnél volt kimutatható, az 1. kezeléshez képest.

Közelebbről, minthogy a kísérleti állatokat megfertőztük *Actinomyces viscosus* OMZ 105 törzsszel, lehetséges volt mennyiségileg meghatározni ezt a plakk-képző organizmust a kísérleti időszak végén, és nyomon követni telepképző egységeinek csökkenését.

Az *Actinomyces viscosus* OMZ 105 telepek részaránya az összes telepképző egység között nem csökkent ezzel párhuzamosan, így az a következtetés vonható le, hogy a szaporodási antagonista hatás más törzsekre is kiterjed, így például a *Veillonella* fajokra, és voltaképpen globális hatás észlelhető.

Fentiek alapján a CNCM I-1985 és CNCM I-1986 törzsek képesek módosítani a száj mikrobiális ökológiáját, szignifikánsan mérsékelve a 2. genotípusú *Actinomyces naeslundii* megtelepedésének mértékét, mellyel a kísérleti patkányokat megfertőztük.

25 3. példa

Felületaktív anyagok előállítása *S. thermophilus* NCC1561 és *S. thermophilus* NCC1536 törzsből és kezdeti elemzésük

Streptococcus thermophilus NCC 1561 és *Streptococcus thermophilus* NCC 1536 törzseket egy éjszakán át 1 liter térfogatú Belliker tápközegben 42 °C hőmérsékleten tenyésztettünk. A biológiai eredetű felületaktív anyagok előállítása érdekében a Busscher és munkatársai által leírtak szerint jártunk el [Busscher et al., Appl. Environ.

Microbiol., 63:3810-3817 (1997)].

A felületaktív anyagok előállítása

Módszer

- a sejteket háromszor mostuk PBS oldattal;
- 5 - a mosott sejteket 200 ml térfogatú desztillált vízben vagy PBS oldatban szuszpendáltuk;
- a sejtszuszpenziót a biológiai eredetű felületaktív anyag előállítása érdekében 2 vagy 4 órán át kíméletesen kevertük szobahőmérsékleten;
- 10 - a szuszpenziót 10000 rpm-mel 10 percen át centrifugálva elválasztottuk a baktériumsejteket;
- a felülúszót kétszer 10 percen át centrifugáltuk 10000 rpm-mel;
- az üledéket, valamint a felületaktív anyagokat tartalmazó
- 15 felülúszót egyaránt liofilizáltuk, és megmértük a tömegüket.

A nyers felületaktív anyagot tartalmazó szuszpenziót először SDS-PAGE módszerrel vizsgáltuk, majd felületi feszültség mérést végeztünk.

20 SDS-PAGE vizsgálat

Az SDS-PAGE vizsgálatot előre gyártott 12,5%-os ExcelGel (Amersham Pharmacia Biotech) gélen végeztük. Az ezüstoffestés Plusone Silver Staining Kit (Amersham Pharmacia Biotech) alkalmazásával történt.

25 A felületi feszültség mérése

A biológiai úton előállított felületaktív anyag szuszpenziójának felületi feszültségét TVT1 Drop Volume Tensiometer (Lauda, Lauda-Königshofen, Németország) alkalmazásával mértük meg, melynek működése a cseppméret elven alapszik. A módszer alapvetően a kapillárisról leszakadó

30 csepp térfogatának pontos mérését jelenti. Ez a térfogat (a kritikus térfogat) arányos a felületi feszültséggel (σ), melynek értéke a következő képlettel számolható ki:

$$\sigma = V g \Delta \rho F / 2 \pi r_{\text{cap}} ,$$

ahol

- σ a felületi feszültség
- V a csepp térfogata
- 5 - g a nehézségi gyorsulás
- $\Delta \rho$ az érintkező fázisok sűrűségének különbsége
- F a korrekciós faktor
- r_{cap} a kapilláris sugara

A mérések kivitelezése két-két párhuzamosban, 37°C hő-
 10 mérsékleten, levegőn történt. Az egyes mérések 10 ciklusból
 álltak. 6 mg/ml nyers terméket tartalmazó oldatot készítet-
 tünk, mellyel a víz felületi feszültségét 70 mN/m értékről
 51 mN/m értékre csökkentettük (13. táblázat). A baktérium-
 tenyészet által előállított termék SDS-PAGE vizsgálata azt
 15 mutatta, hogy több különböző, fehérje jellegű anyag talál-
 ható az oldatban.

13. táblázat

A biológiai úton előállított felületaktív anyagot tartalma-
 zó szuszpenziók felületi feszültsége vízzel és PBS oldattal
 20 összehasonlítva. Az adatok két kísérlet átlagértékei, me-
 lyek mindegyike 10 mérésből állt

	Nyers extraktum koncentrációja	Felületi feszültség (mN/m)
Víz	-	69,07 $\pm$ 0,01
PBS	-	68,13 $\pm$ 0,30
<i>S. thermophilus</i> NCC 1561	6 mg/ml	51,47 $\pm$ 0,17
<i>S. thermophilus</i> NCC 1536	6 mg/ml	51,67 $\pm$ 1,32

Eredmények

A *Streptococcus thermophilus* NCC 1561 és *Streptococcus thermophilus* NCC 1536 törzsek sejtjei képesek felületaktív tulajdonságú anyagokat kibocsátani. Ennek alapján lehetséges, hogy a *Streptococcus thermophilus* NCC 1561 által termelt felületaktív anyag segíti elő a baktériumnak, valamint a környezetében lévő egyéb, a szájban honos törzsek sejtjeinek leválását a fogak felszínéről. Ezzel szemben hasonló hatás nem figyelhető meg a *Streptococcus thermophilus* NCC 1536 esetében, mivel ez a törzs nem képes megtapadni a fogakon.

4. példa

Fogkrém

Fogkrémet készítünk, oly módon, hogy a CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986 és CNCM I-1987 jelű tejsavbaktériumok legalább egyikének 10^5 cfu/ml sejtkoncentrációt biztosító liofilizált tenyészetét hozzáadjuk a következő komponenseket tartalmazó keverékhez: cetil-piridínium-klorid 1,65 tömeg%, szorbit (70%-os oldat) 33,0 tömeg%, glicerín 25,0 tömeg%, nátrium-karboximetil-cellulóz 0,25 tömeg%, nátrium-fluorid 0,25 tömeg%, szilícium-dioxid (RP93) 26,3 tömeg%, szilícium-dioxid sűrítő (Sident 22) 8,1 tömeg%, nátrium-szaharin 0,5 tömeg%, Poloxamer (Pluronic F108) 3,2 tömeg%.

Ez a fogkrém a fogszuvasodás, a plakk-képződés és más, az *Actinomyces naeslundii* fajoknak tulajdonítható fertőzőses megbetegedések megelőzésére valamint kezelésére szolgál.

5. példa

Yoghurt

5 liter térfogatú MRS tápközeget 15 percen át 121°C hőmérsékleten sterilizálunk, majd beoltjuk térfogatára számolt 5% mennyiségben a *Streptococcus thermophilus* CNCM

I-1984 vagy CNCM I-1985 törzsek legalább egyikének aktív, körülbelül 10^9 cfu/ml koncentrációjú tenyészetével. A tenyészetet 8 órán át 41°C hőmérsékleten inkubálva $4,5 \times 10^8$ cfu/ml koncentrációjú starter kultúrát állítunk elő.

- 5 5 liter térfogatú, 10 tömeg% szárazanyag tartalmú sovány tejpor oldathoz hozzáadunk 0,1 tömeg% élesztőkivonatot, és az elegyet 15 percen át sterilizáljuk 121°C hőmérsékleten. Majd az így kapott tápoldatot beoltjuk 2% térfogatnyi, a kereskedelmi forgalomban sűrítőként kapható aktív
- 10 *Streptococcus thermophilus* tenyészettel, mely körülbelül 10^9 sejtet tartalmaz milliliterenként. A tenyészetet 4 órán át 41°C hőmérsékleten inkubálva $4,5 \times 10^8$ cfu/ml koncentrációjú starter kultúrát állítunk elő.

- Egy gyártási tétel 3,7 tömeg% zsírtartalmú, 2,5 tömeg%
15 sovány tejporral kiegészített teljes tejet 30 percen át 90°C hőmérsékleten pasztörözünk, majd beoltjuk 2% térfogatnyi starter tenyészettel, mely a CNCM I.1984 és CNCM I-1985 törzsek legalább egyikéből készült, és 3% térfogatnyi starter tenyészettel, mely a sűrítőként forgalmazott *Strepto-*
20 *coccus thermophilus* törzsből készült. A beoltott tejet megkeverjük, megfelelő edényekbe szétmérjük, és 4 órán át 41°C hőmérsékleten inkubáljuk.

- A fentiek szerint előállított, a szájüreg egészségének megőrzésére szolgáló joghurt készítmény kellően szilárd, és
25 krémes konzisztenciájú.

6. példa

Rágógumi

- A fogszuvasodás, a plakk-képződés és más, az *Actinomyces naeslundii* fajoknak tulajdonítható fertőzőes megbetegedések megelőzésére, valamint kezelésére szolgáló rágógumi előállítása érdekében a CNCM I-1984 és CNCM I-1985 jelű *Streptococcus thermophilus* törzsek legalább egyikének
30 10^4 és 10^9 cfu/g sejtkoncentrációt biztosító aktív tenyé-

szetét hozzáadjuk a következő jellemző komponenseket tartalmazó keverékhez: 67,5 tömeg% xilit, 20 tömeg% gumialap, 5 tömeg% kalcium-karbonát, 3 tömeg% glicerin, 2 tömeg% Pluronic F127, 1 tömeg% cellulóz gumi, 0,5 tömeg% ballaszt anyag és 1 tömeg% aroma.

7. példa

Hobbiállat-eledel

A száj egészségének megőrzésére szolgáló hobbiállat-eledelt készítünk, melynek alapja kukoricából, kukorica gluténból, csirke- és halhúsból, ásványi sókból és vitaminokból álló keverék. A keveréket előkondicionálóba helyezzük és megnedvesítjük. Az előkondicionálóból kikerült keveréket főző-extrudáló berendezésbe visszük, és csirizesítjük. Az csirizesített anyagot sajtoljuk, majd extrudáljuk.

15 Az extrudátumot olyan darabokra vágjuk, melyek alkalmasak kutyatápnak, és 110°C hőmérsékleten körülbelül 20 percig szárítjuk, majd lehűtjük. Az így kapott pelleték vízaktivitása 0,6 körüli.

A pelletekre három bevonatot porlasztunk. Valamennyi bevonat tartalmazza a CNCM I-1984 és CNCM I-1985 jelű *Streptococcus thermophilus* törzsek legalább egyikének aktív tenyészetét. Az egyik bevonó elegy keményített szójaolajat, a másik bevonó elegy vizet, a harmadik bevonó elegy pedig emésztett fehérjét tartalmaz bevonószerként. A pelleték a szóban forgó törzseket körülbelül 10^4 és 10^9 cfu/g közötti koncentrációban tartalmazzák.

Szabadalmi igénypontok

1. A száj mikroflórája szempontjából exogén, a fogazaton képződő hártýához való kapcsolódási és növekedésgátló
5 faktort termelő képessége alapján kiválasztott tejsavbaktérium törzs alkalmazása emlős szervezetekben a plakk-képződés mérséklésére, a fogszuvasodás és a más, az *Actinomyces naeslundii* fajoknak tulajdonítható megbetegedések megelőzésére, valamint kezelésére szolgáló készítmény előállítására.
10 ra.

2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy az alkalmazott tejsavbaktérium törzs valamely tejtermékből származik.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti alkalmazás, azzal
15 jellemezve, hogy az alkalmazott tejsavbaktérium törzset a *Streptococcus thermophilus*, a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* és a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* által alkotott csoportból választjuk ki.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás,
20 azzal jellemezve, hogy az alkalmazott tejsavbaktérium törzset a CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986 és CNCM I-1987 jelű törzsek által alkotott csoportból választjuk ki.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás,
25 azzal jellemezve, hogy a szóban forgó készítmény ehető készítmény, amely elegendő mennyiségben tartalmaz tejsavbaktériumot ahhoz, hogy hatásos legyen emlős szervezetekben a plakk-képződés mérséklésére, a fogszuvasodás és más, az *Actinomyces naeslundii* fajoknak tulajdonítható megbetegedések megelőzésére valamint kezelésére.

30 6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a készítmény legalább 10^4 és 10^9 telepképző egység/g mennyiségben tartalmazza a tejsavbaktéri-

um-törzset.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a tejsavbaktérium-törzset valamely bakteriocinnel kombináljuk.

5 8. A szájüreg egészséges állapotának fenntartására szolgáló, az emlősök szájüregében *Actinomyces naeslundii* megtelepedését mérséklő készítmény, amely legalább egy, a száj mikroflórája szempontjából exogén, a fogazaton képződő hártýához való kapcsolódási és növekedésgátló faktort termelő képessége alapján kiválasztott tejsavbaktérium törzset tartalmaz.

9. A szájüreg egészséges állapotának fenntartására szolgáló, az emlősök szájüregében *Actinomyces naeslundii* megtelepedését mérséklő készítmény, amely tartalmaz

15 - a száj mikroflórája szempontjából exogén, a fogazaton képződő hártýához való kapcsolódási és növekedésgátló faktort termelő képessége alapján kiválasztott tejsavbaktérium törzset, valamint
- bakteriocint.

20 10. A 8. vagy 9. igénypont szerinti készítmény, amely legalább egy tejsavbaktérium törzset tartalmaz a következők közül: *Streptococcus thermophilus*, a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* és a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

25 11. A 8-10. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely legalább egy tejsavbaktérium törzset tartalmaz a következők közül: CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986 és CNCM I-1987.

30 12. A 8-11. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely legalább 10^4 és 10^9 telepképző egység/g mennyiségben tartalmazza a tejsavbaktérium törzset.

34 oldal kész

0 oldal rajz

34 oldal
Szabadalmi Iroda

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Dr. Gárdonyi Zoltánné

szabadalmi ügyvivő

[Handwritten signature]