

(19) **KG** (11) **78** (13) **C2**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(51)⁵ C12N 1/20; A61K 35/74

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики

(10) 1723116

(21) 4426998/SU

(22) 15.04.1988

(46) 01.07.1995, Бюл. №3, 1996

(71) Оренбургский государственный медицинский институт, RU

(72) Никитенко В.И., Никитенко И.К., RU

(73) Никитенко В.И., RU

(56) Карпов В.М. Препарат Бактерии SL. - Ветеринария, - №7, 1986. - С. 45

(54) **Штамм бактерий *Bacillus subtilis*, используемый при получении препарата для профилактики и лечения воспалительных процессов и аллергических заболеваний**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, к средствам для профилактики и лечения патологических процессов, а именно гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации и пищевой аллергии. Целью изобретения является штамм *Bacillus subtilis* 534, способный проникать из желудочно-кишечного тракта и концентрироваться в тканях патологического очага, выделяя антибактериальные вещества, протеолитические ферменты, иммуномодуляторы, что позволяет повысить эффективность профилактики и лечения гнойно-воспалительных процессов различной локализацией и пищевой аллергии. Штамм *Bacillus subtilis* 534 депонирован во Всесоюзной коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР под №1666 D. Препарат из штамма обеспечивает усиление лечебного эффекта за счет проникновения бактерий в очаг повреждения, где они вырабатывают биологически активные вещества, тем самым подавляя развитие инфекции и способствуя очищению от некротизированных тканей.

Изобретение относится к биотехнологии, к средствам для профилактики и лечения патологических процессов, а именно гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации и пищевой аллергии.

Целью изобретения является новый штамм *Bacillus subtilis* 534. Способность проникать из желудочно-кишечного тракта и концентрироваться в тканях патологического очага, выделяя антибактериальные вещества, протеолитические ферменты, иммуномодуляторы, позволяет повысить эффективность и лечение (и профилактику) гнойно-воспалительных процессов различной локализации и пищевой аллергии. Штамм выделен из негнойной раны больного и депонирован во Всесоюзной

коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов под №1666 D.

Штамм *B. subtilis* ВКМ №В-1666 D характеризуется следующими свойствами.

Культурно - морфологические свойства. Палочки. Величина клеток односуточной агаровой культуры (2-4) x (0.6-0.8) мкм. Бактерии подвижные. Образуют споры, капсулы не образуют. По Граму окрашиваются положительно. Колонии на мясо-пептонном агаре шероховатые с фестончатыми краями, со слабым розовым оттенком, диаметром 2-12 мм. Штамм размножается при 15-50°C, оптимум роста 36-37°C. На мясо-пептонном бульоне при 37°C через 18-24 ч образует белесоватую пленку на поверхности и небольшой придонный осадок, состоящий из пленок. В нагретой среде Тароцци через 24-48 ч инкубации при 37°C отмечается рост в виде нежной белесоватой пленки, растет при 7 % хлорида натрия.

Биохимические свойства. Вызывает гидролиз крахмала, редукцию нитратов. Расщепляет без выделения газа глюкозу, сахарозу, маннит, мальтозу, дульцит, галактозу, ксилозу, лактозу. Рамнозу, лизин, аргинин, орнитин не ферментирует. Сероводород и индол не образует. Ацетилметилкарбинол и каталазу выделяет. Чувствителен к бензилпенициллину, ампициллину, эритромицину, мономицину, линкомицину, тетрациклину, не чувствителен к полимиксину.

Штамм продуцирует антибиотик широкого спектра действия, подавляющий рост стафилококков, стрептококков, протей, синегнойной палочки, дрожжевых грибов. Выделяет протеолитические ферменты, расщепляющие белки.

В 200 бактериологических матрасов разливают по 250 см³ 3 %-ного стерильного мясо-пептонного агара. В каждый из них с соблюдением асептики вносят по 10 см³ взвеси производственного штамма *B. subtilis* ВКМ №В-1666 D, содержащей по 100 млн. клеток в 1 см³ 0.9 %-ного раствора натрия хлорида. Матрасы закрывают ватно-марлевыми пробками и помещают в термостаты с температурой 36-37°C. Через 24 ч с соблюдением асептики, выросшую культуру смывают стерильным раствором 0.9 %-ного раствора натрия хлорида из расчета 100 см³ на 1 бактериологический матрас. Полученную взвесь разливают в 500 см³ стеклянные флаконы. 24 ч при давлении 70 Па проводят лиофилизацию. Стабилизаторы при этом не оказывают существенного влияния на лечебный эффект. Они могут быть различными: 0.9 %-ный раствор натрия хлорида, 5 %-ная глюкоза, сахарозо-желатиновая смесь и др.

В 1 мг полученного препарата ("споробактерин") содержится 250 млн. живых клеток штамма *B. subtilis* ВКМ № В-1666 D. Препарат подавляет рост золотистого стафилококка в зоне 30 мм, протей в зоне 28 мм, дрожжевого грибка в зоне 32 мм.

Препарат назначается людям внутрь по 5 10 млрд. клеток в течение 10 сут. Используется для профилактики и лечения гнойно-воспалительных процессов различной локализации (гнойные раны, остеомиелит, сепсис, пневмония и др.), пищевой аллергии, дисбактериоза. Пример 1. Больная А., 59 лет. Диагноз: обострение хронического тонзиллита. Больна в течение двух суток. Отмечается непереносимость антибиотиков, сульфаниламидов. При употреблении в пищу молока и моркови появлялись диарея и крапивница (высыпания на коже). Внутрь назначен препарат на основе живой культуры штамма *B. subtilis* ВКМ № В-1666 D в дозе 5 млрд. клеток один раз в сутки. Явление обострения тонзиллита купированы на 4 сут. Лечение продолжено еще в течение 6 дней. Осмотрена через 6 мес. Клинически здорова. Употребляет в пищу в умеренных количествах молоко и морковь. Пищевой аллергии не отмечает.

Пример 2. Больная М., 56 лет. Диагноз: костный панариций II пальца левой кисти, лимфаденит. Больна 2 мес. Дважды проводилось вскрытие гнойника, выполнялась операция секвестрэктомия. Получала антибиотики широкого спектра действия, перевязки с антисептиками. Больной предложена ампутация пальца. II палец резко отечен, цианотичен (синюшен). В области средней фаланги рана около 1 см в диаметре. Грануляции бледные, покрыты фибрином. Отделяемое серозно-гнойное. Увеличены и

болезненны лимфоузлы в области локтевого сустава. При бактериологическом исследовании выделены золотистый стафилококк и бактерии рода *Pseudomonas*. Внутрь назначен препарат на основе живой культуры штамма *B. subtilis* ВКМ № В-1666 D по 5 млрд. клеток 2 раза в сутки. Производились перевязки с 10 %-ным раствором натрия хлорида. Штамм *B. subtilis* ВКМ № В-1666 D выделен из крови и из раны через сутки. Через 3 дня рана очистилась, на 9 сут она заэпителизовалась.

Пример 3. Больная Г., 48 лет. Диагноз: хронический сепсис, воспалительный инфильтрат левого предплечья, сахарный диабет средней тяжести, дисбактериоз.

Больна в течение 1.5 лет. После микротравм и без видимых причин стали возникать фурункулы, абсцессы и флегмоны на конечностях и грудной клетке. Перенесла 9 операций вскрытия и дренирования гнойников. В результате длительного применения антибиотиков развился дисбактериоз, беспокоили чередование диареи и запоров, метеоризм. Соблюдала диету и постоянно получала инсулин. Во время очередного обострения и формирования воспалительного инфильтрата осмотрена в клинике. Из крови выделен золотистый стафилококк. В течение 10 сут проведено лечение бактериальным препаратом на основе живой культуры штамма *B. subtilis* ВКМ № В-1666 D по 5 млрд клеток два раза в сутки. Препарат назначался внутрь. Другие антибактериальные препараты больше не получала. Через 2 сут воспалительный инфильтрат исчез. В посеве крови обнаружен только штамм *B. subtilis* ВКМ № В-1666 D. Нормализован стул.

Пример 4. Для предупреждения гнойно-хирургической инфекции препарат давался внутрь по 1 капсуле (5 млрд клеток) в сутки в течение 10 дней 9 больным с открытыми переломами конечностей, 7 - со случайными ранами мягких тканей, 12 - после плановых оперативных вмешательств (остеосинтеза). Для лечения "споробактерин" в дозе 1-4 капсулы в сутки внутрь в течение 10 дней применен у 14 больных с острым обострением хронического остеомиелита, у 14 - гнойными ранами, у 6 - с гнойно-воспалительными процессами в области спиц компрессионно-дистракционных аппаратов, у 1 - с черепно-мозговой травмой, пневмонией, менингитом, пролежнями, у 1 - с хроническим сепсисом на фоне сахарного диабета, у 2 - с тонзиллитом, у 1 - с гайморитом. По показаниям у 12 больных с обширными нагноительными процессами курс лечения через 3-7 сут повторялся.

У 9 больных, ранее длительно получавших антибиотики, были клинические проявления дисбактериоза, боли и вздутие живота, чередование запоров и жидкого стула. Кроме того, у 7 больных отмечена непереносимость одного или нескольких антибиотиков, сульфаниламидов, а у одной - пищевая аллергия на рыбу, цитрусовые, морковь, помидоры.

В период лечения споробактерином все больные не получают антибиотики и другие антисептические препараты. Хирургическое лечение, дезинтоксикацию, стимулирующую терапию проводят по показаниям и не отличаются от методов, принятых в клинике.

При профилактическом приеме споробактерина по 1 капсуле внутрь нагноение раны отмечено у одного больного из 28 больных. У этого пострадавшего с открытым переломом голени вследствие некроза кожи образовался струп, который постепенно отторгся. Рана зажила вторичным натяжением. В то же время у больных, не получавших споробактерин, гнойно-воспалительные процессы встречались чаще ($p < 0.05$). Так, в клинике нагноения открытых переломов наблюдались в 36 %, случайных ран мягких тканей - в 14 %, послеоперационных ран после остеосинтеза - в 7 % наблюдений.

Штамм *B. subtilis* высеян из крови у 27 из 28 больных, а из раны у 26 из 28 больных. Осложнений при профилактическом применении споробактерина не отмечено, что подтвердили клинические наблюдения и данные анализов.

Из 36 больных с гнойными ранами (в том числе с остеомиелитом, хроническим сепсисом) стафилококк в монокультуре и составе микробных ассоциаций высеян у 26, синегнойная палочка - 6, кишечная палочка - 4, протей - 3, прочие бактерии - 8. К действию пяти и

более антибиотиков были устойчивы 76 % полученных штаммов. Через сутки после первого приема наблюдалось значительное увеличение количества гнойного отделяемого. Раны быстро очищались от некротизированных тканей. В последующем менялся характер раневого секрета, его количество уменьшалось, из гнойного он постепенно становился серозно-гнойным с легкой примесью разложившейся крови. Через 1-3 сут после начала лечения появлялась ярко-розовая грануляционная ткань, исчезали отек, лимфаденит, лимфаденоит, активизировалась эпителизация.

Заживление гнойных ран наступало у 23 из 36 больных, стихание воспалительного процесса (нормализация температуры тела, очищение раны от некротизированных тканей, уменьшение количества гнойного отделяемого и др.) у 11. В последующем раны зажили, и свищи закрылись у 9 из них. Только у 2 больных (с обострением хронического остеомиелита и с нагноением в области спицы аппарата Илизарова) лечение "Споробактерином" было безуспешным. У последнего нагноение в области одной спицы стихло, но вновь возникло в области другой спицы. При лечении пневмонии, менингита, хронического сепсиса, тонзиллитов, гайморита стойкое выздоровление получено у всех больных.

Аллергических реакций, несмотря на предрасположенность к ним ряда больных, не наблюдали. Клинические проявления дисбактериоза стихли у всех 9 больных через 1-4 сут. Учитывая, что до применения "споробактерина" 21 больной в течение 6-42 дней без положительного эффекта лечился протеолитическими ферментами, антибиотиками и другими антисептиками, полученные результаты следует признать хорошими.

Таким образом, препарат на основе штамма *B. subtilis* ВКМ № В-1666 D обладает выраженной лечебной активностью при гнойно-хирургической инфекции: подавляет рост возбудителей, способствует очищению ран от некротизированных тканей, ускоряет процессы заживления. Он может быть использован для лечения других воспалительных процессов, вызываемых бактериальной микрофлорой: пневмонии, тонзиллитов и др.

При профилактическом лечении препаратами уменьшается число нагноений ран и открытых переломов.

Осложнений при лечении препаратом не отмечено, клинические проявления пищевой аллергии и дисбактериоза купируются.

Формула изобретения

Штамм бактерий *Bacillus subtilis* ВКМ В-1666 D, используемый для получения препарата для профилактики и лечения воспалительных процессов и аллергических заболеваний.

Ответственный за выпуск

Ногай С.А.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03