

EFFECT OF PROBIOTIC AL BIOMASEI DE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* ASUPRA ECHILIBRULUI MICROFLOREI INTESTINALE

CZU: 579.864:612.336

Victoria BOGDAN

*Școala Doctorală Științe Biologice, Geonomice, Chimice și Tehnologice,
Universitatea de Stat din Moldova*

Valeria VRABIE

Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie

PROBIOTIC EFFECT OF *ENTEROCOCCUS FAECIUM* BIOMASS ON THE BALANCE OF INTESTINAL MICROFLORA

The article studies the probiotic effect of *Enterococcus faecium* biomass, inoculation material for isolating the enterococci, identification of a pure culture of *Enterococcus* sp., species specification and research on the presence of pathogenic factors using chain polymerization reaction (PCR), obtaining pure cultures of lactic-acid bacteria. In the study of clinical and laboratory parameters the use of the product, showed only positive effects.

Keywords: *probiotic, Enterococcus faecium, intestinal microflora.*

În ultimii ani, a fost acumulată o bogată experiență în ceea ce privește utilizarea probioticelor în tratamentul diferitelor forme nosologice. Odată cu extinderea domeniului de aplicare a probioticelor, se acumulează date cu privire la manifestările negative ale terapiei cu medicamente sau produse care conțin tulpini industriale de microorganisme [1].

Modificările disbiotice în tubul digestiv, dezavantajele utilizării probioticelor industriale, individualitatea complexului de țesut microbial au fost condițiile prealabile pentru studierea unui produs probiotic personalizat în baza genului *Enterococcus faecium*.

Tulpinile probiotice obținute industrial, care interacționează cu receptorii sistemului digestiv, provoacă o cascadă de reacții ale sistemului imunitar, ducând la eliminarea rapidă a acestor tulpini din organism și necesită o administrare pe termen lung de doze mari de probiotice [2].

Bacteriile cultivate artificial sunt străine, precum organele și țesuturile altor oameni – donatori sau animale – transplantate la oameni [3]. Sunt respinse din cauza incompatibilității biologice. Tulpinile industriale de probiotice nu au capacitatea de a pătrunde în biofilmul intestinal și, prin urmare, rămân în el în mod tranzitoriu, ca și microflora alimentelor, stimulând în principal creșterea microflorei obligatorii [4].

Experiența pe termen lung în utilizarea clinică a probioticelor a contribuit la răspândirea și consolidarea opiniei despre siguranța lor. Cu toate acestea, observațiile clinice publicate în presa medicală indică necesitatea unei analize mai profunde a problemelor de siguranță ale utilizării probioticelor pe baza tulpinilor industriale [5-7].

În prezent, se crede că ingestia orală de bacterii vii ar putea fi teoretic responsabilă pentru patru tipuri de efecte secundare:

- dezvoltarea proceselor infecțioase cauzate de tulpini care alcătuiesc probioticele;
- dezvoltarea tulburărilor metabolice;
- imunostimulare excesivă a aparatului limfatic intestinal;
- formarea de noi clone de tulpini bacteriene prin transferul de gene responsabile de expresia factorilor de patogenitate [8].

Toate cele de mai sus (modificări disbiotice în tubul digestiv, dezavantajele utilizării probioticelor industriale, individualitatea complexului de țesut microbial) au fost condițiile prealabile pentru crearea unui produs probiotic personalizat în baza genului *Enterococcus faecium* [9].

Alegerea acestui microorganism ca probiotic se datorează mai multor motive:

- capacitatea *E. faecium* de a produce bacteriocine puternice (enterocina A și enterocina B), care sunt importante pentru suprimarea excesului de floră oportunistă;
- stabilitatea proprietăților antibacteriene și antivirale ale acestor bacteriocine (acestea nu dispar nici după inactivarea bacteriilor în sine, deoarece aceste proteine sunt rezistente la diferiți factori fizici și chimici);
- capacitatea de a produce o gamă largă de vitamine, inclusiv fiind factorii de creștere ai bifidobacteriilor și lactobacililor intestinali;
- absența unor dificultăți semnificative în cultivarea acestui microorganism.

Izolarea enterococilor indigeni din fecale pentru crearea autoprobioticului culturii lactice pure trebuie:

1. De efectuat inocularea bacteriilor din fecalele pacientului pe medii electiv.
2. De identificat tulpini izolate până la gen.
3. De efectuat reacția de polimerizare în lanț (RPL) pentru a determina tipul de enterococ și conținutul posibil de factori patogeni.
4. De selectat clone care îndeplinesc cerințele de siguranță genetică și funcționalitate fiziologică.
5. De păstrat tulpinile individuale de enterococi în criodepozit.
6. Obținerea unei culturi lactice pure.

Pentru a izola enterococii autoprobiotici din fecale, sunt necesare cel puțin 0,5 g de material (de preferință 5,0 g), în cazul scaunului lichid – un strat de cel puțin 1-2 cm de la baza vasului. Livrarea trebuie efectuată nu mai târziu de 2 ore după selectarea materialului. Apoi, în condiții sterile, se adaugă 9 ml la 1 g de material un tampon de fosfat steril (soluție fiziologică de clorură de natriu cu adaos de fosfați de sodiu, disubstituiți și monosubstituiți, amestecați în proporția necesară pentru a crea un pH de 7,4).

Suspensia de fecale la o diluție de 1:10 este inoculată într-o cantitate de 100 μl pe un mediu electiv pentru enterococi [10]. Se cultivă timp de 24-48 ore la 37°C. Pe acest mediu cresc în principal enterococi, mai rar stafilococi. În plus, luând în considerare particularitățile proprietăților culturale ale *Enterococcus faecium* și *Enterococcus faecalis*, este posibilă efectuarea unei identificări aproximative a enterococilor după specie. *Enterococcus faecalis* este cel mai adesea închis la culoare, vișiniu, iar coloniile de *Enterococcus faecium* sunt roz-liliac cu marginea deschisă.

Identificarea coloniilor individuale se efectuează pe baza nu numai a proprietăților morfologice, ci și a celor microscopice. Sunt selectate trei colonii separate tipice speciei *Enterococcus faecium* (roz-liliac cu margine roz-deschis), și sunt inoculate pe cutii Petri cu mediu solid cu sectoare MPC pentru a obține o cultură pură. Se cultivă în decurs de 24 de ore la 37°C. Preparatele se microscopizează din culturi pure de bacterii, colorându-le conform metodei Gram [11]. În microscopia cu lumină, *Enterococcus faecium* are formă rotundă și este aranjat în lanțuri scurte cu tendință de agregare. Culturile pure sunt direcționate spre analiza genetică.

Pentru a evalua caracteristicile molecular-genetice ale tulpinilor din coloniile individuale de enterococi, ADN-ul cromozomial este extras prin metoda-expres, după care se efectuează reacția de polimerizare în lanț (RPL). Pentru extracția-expres propusă a ADN-ului, cultura bacteriană pură din cutii Petri (5-10 colonii) este suspendată în 50-100 μ l de apă distilată sterilă și fiartă timp de 10 min. Apoi este centrifugată la 8000 rpm (rotații/minut). Supernatantul care conține ADN bacterian este utilizat pentru RPL (30 de cicluri la o temperatură de 57°C). Pentru analiza genetică prin RPL, utilizând programul de calculator „BLAST” [16], au fost proiectați primeri unici pentru identificarea speciilor de *Enterococcus* și genele patogenității sale, ceea ce permite obținerea în continuare a unui produs sigur pentru izolarea tulpinilor nepatogene. Trei colonii obținute pe mediu MRS solid, una și/sau mai multe culturi pure selectate de *Enterococcus faecium* fără gene de patogenitate sunt inoculate în 10 ml de lapte (1,5%, sterilizat prin autoclavare la 120°C timp de 20 min) și incubate timp de 24-48 ore la 37-42°C înainte de fermentarea laptelui. Se selectează o eprubetă cu cultura cu cea mai rapidă creștere, determinând-o după formarea unui cheag în lapte. Cultura ce posedă setul necesar de proprietăți în criodepozit pentru o posibilă utilizare în viitor. Cei 10 ml de cultură obținută din cultura selectată de enterococi sunt utilizați ca material inocul pentru a obține un volum mai mare de cultură pură. Pentru aceasta, se inoculează 10 ml de cultură pură la 1 litru de lapte steril încălzit la 37°C. Se incubează 24-48 ore la 37-42°C până la fermentarea laptelui. Pentru a păstra tulpinile obținute, se iau câte două eprubete de 1 ml din cultura pură obținută și se păstrează la -75°C timp de până la un an.

După obținerea culturii lactice pure, produsul este păstrat până la utilizare la frigider la 4°C timp de cel mult 7 zile.

Siguranța produsului rezultat a fost testată într-un studiu experimental pe animale și într-un studiu clinic pe un grup de voluntari (10 persoane). În studiul parametrilor clinici și de laborator în timpul utilizării produsului, manifestări negative nu au fost observate.

Studiul eficacității și siguranței terapiei probiotice a fost efectuat pe 12 șobolani Wistar masculi sănătoși cu disbioză indusă. Șobolanii au fost împărțiți în trei loturi. Patru șobolani din primul lot au fost injectați cu 0,5 ml de cultură lactică pură conținând $5,5 \times 10^8$ CFU/ml *Enterococcus faecium* L5 [12]. Șobolanii din cel de-al doilea lot (4 șobolani) au primit culturi lactice conținând 108 CFU/ml din propriul lor *Enterococcus faecium*. Patru șobolani din al treilea lot au primit câte 0,5 ml de lapte. În timpul experimentului, apetitul, greutatea, caracterul scaunului și comportamentul

animalelor de laborator au fost monitorizate, examinarea microbiologică a fecalelor a fost efectuată în prima și a opta zi de observare. Rezultatele studiului arată că la șobolanii care au primit autoprobioticele a avut loc normalizarea greutății și a apetitului într-o perioadă mai scurtă de timp (în a 3-a zi) față de șobolanii care au primit *Enterococcus faecium* L5 (în a 5-a zi). În același timp, a fost observată normalizarea scaunului.

Analiza datelor microbiologice a relevat:

- o creștere semnificativă a numărului de lactobacili din lotul care a primit autoprobiotice (de la $5,17 \pm 0,7$ la $7,0 \pm 0,27$ lg CFU) ($p < 0,01$);
- o creștere semnificativă a bifidobacteriilor în lotul de terapie autoprobiotice (de la $4,0 \pm 0,89$ la $6,0 \pm 0,26$ lg CFU);
- o scădere a numărului de reprezentanți ai florei oportuniste atât în lotul care primește autoprobioticele, cât și în lotul care primește *Enterococcus faecium* L5 [13].

Pe exemplul disbiozei experimentale (după expunerea la ampicilină și metronidazol), s-a arătat că enterococii autoprobiotici, precum și tulpina probiotică *E. faecium* L3, contribuie la restabilirea rapidă a microbiocenozei intestinale. O caracteristică a autoprobioticele este efectul bidirecțional: o creștere a populației reprezentanților obligativi ai microbiotei (bifidobacterii, *Escherichia*) și inhibarea reproducerii enterobacteriilor oportuniste (*Proteus*, *Klebsiella* și altele) [14].

În același experiment, s-a arătat că tulpinile autoprobiotice sunt capabile să persiste în intestin mai mult timp (până la 21 de zile de la momentul încetării administrării), spre deosebire de tulpina comercială *E. faecium* L3 (durata supraviețuirii 3-4 zile) [15].

Siguranța utilizării autoprobioticele a fost demonstrată într-un studiu clinic (pe voluntari sănătoși). La observarea stării subiecților, a parametrilor clinici și de laborator, inclusiv a stării microbiotei intestinale, s-a constatat că nu au existat modificări semnificative înainte și după utilizarea produsului autoprobioticele la subiecți practic sănătoși.

Eficacitatea autoprobioticele a fost investigată într-un studiu, controlat cu placebo, la pacienți cu IBS (sindromul intestinului iritabil). În cursul acestui studiu, cu participarea a 50 de pacienți, s-a demonstrat că severitatea flatulenței, durerea abdominală a scăzut semnificativ în grupul care a primit autoprobioticele, comparativ cu grupurile de probiotice industriale și placebo, iar apetitul s-a îmbunătățit. Astfel, terapia cu probiotice poate spori eficacitatea regimurilor standard de gestionare a IBS. Terapia personalizată cu un autoprobioticele s-a dovedit a fi superioară tratamentului cu tulpini industriale. Întrebările legate de terapia autoprobioticele necesită un studiu suplimentar (utilizarea altor tulpini autoprobioticele, posibilitatea utilizării cocktailurilor autoprobioticele, extinderea gamei de forme nosologice) [16].

Referințe:

1. DUNCA, S., AILIESEI, O., NIMIȚAN, E.S.M. *Microbiologie aplicată*, 2004. 300 p.
2. БОНДАРЕНКО, В.М., ЧУПРИНИНА, Р.П. и др. Пробиотики и механизмы их лечебного действия. В: *Эксперим. клин, гастроэнтерол.* 2004, № 3, сс. 83-87.

3. BUZINSCHI, S. Formarea și structura microflorei intestinale. În: *Rom. J. Pediatr.* 2018, vol. 67, nr.2, pp.86-90.
4. ȚĂPESCU, M., TARCEA, M. Impactul microbiomului intestinal asupra sănătății fizice și mintale. În: *Impact gut microbiome Phys. Ment. Heal.* 2020, vol.133, nr.1, p.26–30.
5. MACFARLANE, G., CUMMINGS, J. Probiotics and prebiotics: Can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? In: *BMJ. BMJ Publishing Group*, 1999. vol. 318, no.7189, p.999.
6. FIJAN, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. In: *International Journal of Environmental Research and Public Health. Molecular Diversity Preservation International*, 2014, vol. 11, no.5, pp.4745-4767.
7. ZOUMPOPOULOU, G. et al. Probiotics and prebiotics: An overview on recent trends. In: *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*. Springer International Publishing, 2018, pp.1-34.
8. VAMANU, A., POPA, O., CÂMPEANU, Gh. *Studii biologice, biotehnologice și farmacologice privind utilizarea unor produse probiotice*, 2002, p.9-26.
9. ЦЕПИТОВА, Н.Е., СЫЧЁВА, М.В. *Скрининг штаммов энтерококков с целью разработки на их основе препаратов-пробиотиков*, 2015, т. 13, №188, сс.226-233.
10. *Enterococco Agar (Bile Aesculin Azide Agar)* [Электронный ресурс]. URL: www.liofilchem.net (дата обращения: 19.08.2018).
11. SĂCĂREA, F.T. *Bacteriologie medicală*, 2006. 463 p.
12. RU2460778C1 – Способ получения аутопробиотика на основе *enterococcus faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина – Google Patents [Электронный ресурс]. URL: <https://patents.google.com/patent/RU2460778C1/ru> (дата обращения: 31.05.2021).
13. *Enterococcus faecium* L3 корректирует микробиоту кишечника и модулирует иммунные функции у крыс с ЭАЭ и пациентов с рассеянным склерозом [Электронный ресурс]. URL: <https://www.mediasphera.ru/issues/zhurnal-nevrologii-i-psikhiatrii-im-s-s-korsakova-2/2015/8/271997-72982015088> (дата обращения: 20.05.2021).
14. TIMOȘCO, M., FLOREA, N., VELCIU, A. Level of compatibility of certain species of microorganisms belonging to the types compulsory for human digestive tract. 2010, vol.4, no.4, pp.31-34.
15. СОЛОВЬЕВА, О.И. и др. Использование пробиотиков и аутопробиотиков в лечении синдрома раздраженной толстой кишки. В: *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2017, т. 143, № 7, сс. 115-120.
16. Влияние двух штаммов пробиотических лактобактерий на микробиоту и пищеварительную функцию кишечника при коррекции экспериментального дисбиоза у крыс – тема научной статьи по ветеринарным наукам читайте бесплатно текст научно-исследовательской работы в эле [Электронный ресурс]. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-dvuh-shtamov-probioticheskikh-laktobakteriy-na-mikrobiotu-i-pishevaritelnuyu-funktsiyu-kishechnika-pri-korrekcii-eksperimentalnogo-disbioza-u-krys> (дата обращения: 31.05.2021).