

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА
„СЕНИША СТАНКОВИЋ“
Институт од националног значаја за Републику Србију
Универзитет у Београду
Бул. деспота Стефана 142
Директор: 011-2078-399
Тел: 011-2078-300
Факс: 011-2761-433
www.ibiss.bg.ac.rs



INSTITUTE FOR BIOLOGICAL RESEARCH
“SINIŠA STANKOVIĆ”
National Institute of the Republic of Serbia
University of Belgrade
Bul. despota Stefana 142
Director: +381-11-2078-399
Tel: +381-11-2078-300
Fax: +381-11-2761-433
www.ibiss.bg.ac.rs

Број / № 01-1965/2

Датум / Date 14. 08. 2025.

HERBALPHARM d.o.o.

Ул. Бранка Ћопића бр. 15
78000 Бања Лука

Поштовани,

На основу Уговора о испитивању антимикробне анализе производа „Сријемуш у капсулама“, закљученог дана 29.07.2025. године, у прилогу овог дописа Вам достављамо Извештај о испитивању.

.....
др Јасмина Гламочлија, научни саветник
Одељење за физиологију биљака



.....
др Мирјана Михаиловић,
директор Института

IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU ANTIBAKTERIJSKE I ANTIFUNGALNE AKTIVNOSTI PREPARATA „SRIJEMUŠ LA VITA“

Antimikrobna aktivnost preparata „Srijemuš La Vita“ je testirana na 6 sojeva bakterija i 4 vrste mikrogljiva i poređena sa aktivnošću komercijalnih antibiotika/antimikotika. Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti komercijalnog preparata i antibiotika korišćene su sledeće vrste bakterija: *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), meticilin rezistentna *S. aureus* (IBRS MRSA 011), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *P. aeruginosa* – rezistentni soj (IBRS P001), *Escherichia coli* (ATCC 11775) i *E. coli* – rezistentni soj (IBRS E003).

Istraživanje antifungalne aktivnosti preparata „Srijemuš La Vita“ vršeno je na mikromiceti *Aspergillus fumigatus* (humani izolat) i 3 vrste kvasolikih gljiva *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida auris* (CDC B 11903) i *Candida dublinensis* (NCPF 3949).

Svi testirani sojevi mikroorganizama su deponovani u Mikoteci Mikološke laboratorije, Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Antibiotik iz grupe penicilina **Ampicillin** – A9393-5G - Sigma Aldrich je korišćen kao pozitivna kontrola pri testiranju antibakterijske aktivnosti, dok je u slučaju ispitivanja antifungalne aktivnosti za pozitivnu kontrolu korišćen komercijalni antimikotik **Micafungin**, SML2268-25MG Sigma Aldrich, koji je inhibitor $\beta(1,3)$ -D-Glukan sintaze.

Metodom mikrodilucije je izvršeno *in vitro* ispitivanje uzorka - praha koji se kasnije inkapsulira ("Srijemuš La Vita"), u opsegu koncentracija 0.63 mg/mL-8 mg/mL.

Mikrodiluciona metoda – ispitivanje antibakterijske aktivnosti

U cilju utvrđivanja minimalnih inhibitornih (MIK) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBK) korišćena je mikrodiluciona metoda prema Soković (2001) u mikrodilucionim pločama sa ravnim dnom, 96 sistem (Spektar, Čačak). Prekonoćne kulture ($1,0 \times 10^9$ ćelija/mL) dobijene su gajenjem testiranog bakterijskog soja tokom 24 h na 37 °C u 2 mL tečne hranljive podloge (Tryptic Soy Broth – TSB, Torlak). Nakon isteka vremena, suspenzije bakterija (inokulumi) podešene su sterilnim fiziološkim rastvorom do koncentracije $1,0 \times 10^6$ ćelija/mL (0,5 McFarland standard) i skladištene na 4 °C do dalje upotrebe. Prah srijemuša rastvoren je u 30% etanolu i dodati hranljivoj podlozi za rast bakterija u odgovarajućoj koncentraciji. Potom su dodati bakterijski inokulumi, a ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Najniža koncentracija na kojoj je vidno smanjen rast bakterije (pod binokularnom lupom) definisana je

kao MIK. Rezultati su potvrđeni nakon dodavanja 40 µL rastvora indikatorske boje ljubičasta *p*-jodonitrotetrazolijum-hlorid I8377-Sigma (0,2 mg/mL destilovane vode) svakom bunarčiću i inkubacije u trajanju 30 minuta na 37 °C. Rast bakterija potvrđen je u bunarčićima čiji je sadržaj postao obojen intenzivnom crveno-ljubičastom bojom, dok na mestima u kojima nije utvrđen rast bakterija, nije došlo do promene boje sadržaja bunarčića (Tsukatani, 2012). Utvrđivanje odsustva rasta mikroorganizama, tj. određivanje MBK vrednosti, izvedeno je serijskom reinokulacijom 10 µL inokulisane podloge iz bunarčića gde nije zabeležen rast bakterija u 100 µL sterilne hranljive podloge i reinkubacijom tokom 24 h na 37 °C.

Mikrodiluciona metoda – ispitivanje antifungalne aktivnosti

Za pripremanje inokuluma (suspenzije spora mikromicete *A. fumigatus*) korišćene su kulture gajene na Sabouraud dekstroznom agaru (SDA), u periodu od 21-og dana na sobnoj temperaturi, a zatim stornirane na +4 °C do daljnje upotrebe (Booth, 1971). Inokulum je pripreman spiranjem spora sa površine medijuma, kultura starim 21 dan sterilnim rastvorom 0.85% NaCl-a koji sadrži 0.1% Tween 80 (vol/vol). Spore su izbrojane Neubauer hemocitometrom, a koncentracija je podešena do 1.0×10^5 ćelija/ml medijuma. Tako pripremljen inokulum držan je na +4°C do upotrebe. Radi provere validnosti inokuluma, kao i odsustva kontaminacije, vršena je inokulacija na čvrstu podlogu (SDA). Prah sremuša koji se kasnije inkapsulira u proizvod "Srijemuš La Vita" rastvoren u 30% etanolu i dodat bunarčićima sa hranjivom podlogom Sabouraud dekstroznom broth (SDB). Nakon dodavanja inokuluma mikromicete, ploče su inkubirane 72 sata na 25 °C i vršilo se očitavanje rezultata pod binokularnom lupom. Najniža koncentracija bez vidljivog rasta gljiva predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK). Da bi se odredila minimalna fungicidna koncentracija (MFK) sadržaj svih bunarčića (koji se nalaze ispred inhibitorne koncentracije) se prenese na nove Petri ploče sa odgovarajućim čvrstim podlogama (SDA) i nakon inkubacije vršeno je brojanje poraslih kolonija. MFK se definiše kao koncentracija aktivne supstance koja ubija 99,5% gljiva (CLSI 2009).

Antifungalna aktivnost praha sremuša koji se kasnije inkapsulira ("Srijemuš La Vita") na selektovane vrste roda *Candida* utvrđivana je mikrodilucionom metodom (Daouk i sar., 1995; EUCAST, 2002).

Vrste *Candida* su inkubirane u TSB medijumu na 37 °C, 24 h. Ćelijske suspenzije su standardizovane primenom 0,5 McFarland standard, tako da finalna koncentracija u jednom polju mikrotitar ploče iznosi 1×10^5 ćelija (100 µL je ukupna zapremina). Inokulumi su čuvani na hladnom +4°C do upotrebe. Minimalne inhibitorne i minimalne fungicidne koncentracije određivane su serijskim razblaženjima jedinjenja u TSB medijumu u mikrotitar pločama sa ravnim dnom, 96 sistem (Spektar, Čačak). Poslednji red u mikrotitar ploči korišćen je kao kontrola (dodavan je samo medijum i mikroorganizama), a preposlednji kao blank (dodavan je samo čist medijum). Ploče su inkubirane na 37 °C, 24 h. Nakon inkubacije, radi lakšeg posmatranja rezultata, u bunarčiće je dodato po 40 µl *p*-jodonitrotetrazolijum boje (0,2 mg/mL, INT, I 8377–Sigma) koja žive ćelije boji roze. Minimalna inhibitorna koncentracija je određivana kao najmanja

koncentracija na kojoj nije bilo vidljivog rasta mikroorganizma nakon inkubacije (oko 3 h ili duže) sa bojom. Dodatno, minimalne fungicidne koncentracije su određivane reinokulisanjem po 10 µL sadržaja iz bunarčića odgovarajuće koncentracije u 100 µL sterilnog medijuma u mikrotitracionim pločama i inkubiranjem još 24 h na 37 °C. Koncentracija koja ubija 99,5% gljiva u odnosu na kontrolnu grupu smatrana je za MFK.

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST PREPARATA „Srijemuš La Vita”

Utvrđeno je da je prah sremuša koji se kasnije inkapsulira u preparat „Srijemuš La Vita” delovao bakteriostatski i baktericidno, odnosno inhibirao je rast, ali i onemogućio dalji rast svih ispitivanih bakterija. Najosetljivije bakterijske vrste na ispitivani proizvod su *Pseudomona aeruginosa* – rezistentni soj i *Escherichia coli* sa minimalnim inhibitornim koncentracijama (MIK) od 0.50 mg/mL i baktericidnim koncentracijom (MBK) od 1.00 mg/mL. Najotpornija bakterija na dejstvo ispitivanog preparata je *Staphylococcus aureus* sa inhibitornom i baktericidnom koncentracijama od 4.00/8.00 mg/mL (Tabela).

Dejstvo testiranog antibiotika prikazano je u Tabeli. **Ampicilin** je pokazao bakteriostatsku aktivnost u opsegu 0.015625 – 0.05 mg/mL, i baktericidnu aktivnost u opsegu 0.03125–0.10 mg/mL. Testirani preparat „Srijemuš La Vita” je pokazao slabiju aktivnost u odnosu na testirani antibiotik osim u slučaju *E. coli* – rezistentni soj na koji komercijalni antibiotik nije pokazao baktericidnu aktivnost (Tabela).

Preparat „Srijemuš La Vita” delovao fungistatski i fungicidno, odnosno inhibirao je rast, ali i onemogućio dalji rast ispitivanih mikrogljiva. Najosetljivija vrsta na ispitivani proizvod je kvasolika vrsta *Candida auris* sa minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK) od 0.025 mg/mL i fungicidnom koncentracijom (MFK) od 0.05 mg/mL. Najotpornija gljiva na dejstvo ispitivanog preparata je filamentozna gljiva *Aspergillus fumigatus* sa MIK/MFK vrednostima 1.00/ ≥8.00 mg/mL (Tabela).

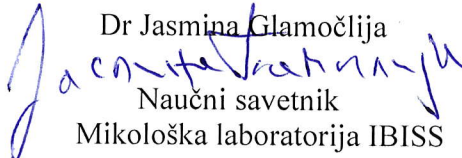
Dejstvo testiranog antimikotika prikazano je u Tabeli. Inhibitorne vrednosti antimikotika „Micafungin”-a su u opsegu 0.025-0.20 mg/mL, a fungicidne u opsegu od 0.05 - 0.40 mg/mL.

Testirani preparat „Srijemuš La Vita” pokazao je slabiju aktivnost u odnosu na testirani antimikotik (Tabela).

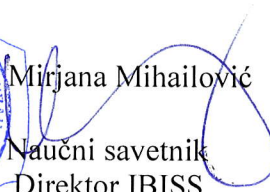
Postoji potreba za stalnim ispitivanjima potencijalnih novih preparata kako bi se pronašle adekvatne zamene za sintetske antimikrobne agense na koje je vremenom razvijena rezistencija ili čak višestruka rezistencija. Pored novih sintetskih lekova neophodna su i ispitivanja različitih supstanci prirodnog porekla u cilju daljeg korišćenja preparata koji imaju što manje štetnih efekata na čoveka.

Na osnovu pregledane literature i odrađenih *in vitro* analiza može se izvesti sledeći **zaključak**.

Ispitivani proizvod „Srijemuš La Vita” pokazao je dobru antimikrobnu (antibakterijsku i antifungalnu) aktivnost. Laboratorijske *in vitro* analize ukazuju da korišćenje ovog preparata u određenim bezbednim koncentracijama u prevenciji ili kao dodatak tretmanu raznih bakterijskih i gljivičnih infekcija vrsta ispitivanih u ovoj studiji može da ima pozitivno dejstvo na ljudsko zdravlje. Osobine ovog proizvoda kao i činjenica da su trenutni globalni trendovi vraćanja što prirodnijem načinu lečenja jer je pokazana štetnost sintetskih jedinjenja kako na čoveka tako i na ekosistem, ukazuju na značaj preparata „Srijemuš La Vita”.


Dr Jasmina Glamočlija
Naučni savetnik
Mikološka laboratorija IBISS




Dr Mirjana Mihailović
Naučni savetnik
Direktor IBISS

Testirani uzorci „Srijemuš La Vita” su pokazali antimikrobnu aktivnost u testiranom opsegu koncentracija, a rezultati (mg/ml) su prikazani u sledećoj tabeli.

Mikroorganizmi		Sremuš	Ampicilin	Micafungin
<i>Aspergillus fumigatus</i> (humani izolat)	MIC	1.00	/	0.20
	MFC	≥8.00	/	0.40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	MIC	2.00	0.125	/
	MBC	4.00	0.25	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – rezistentni soj (IBRS P001)	MIC	0.50	0.05	/
	MBC	1.00	0.10	/
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 11632)	MIC	4.00	0.0625	/
	MBC	8.00	0.125	/
Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (IBRS MRSA 011)	MIC	1.00	0.015625	/
	MBC	2.00	0.03125	/
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11775)	MIC	0.50	0.015625	/
	MBC	1.00	0.03125	/
<i>Escherichia coli</i> rezistentni soj (IBRS E003)	MIC	1.00	0.20	/
	MBC	2.00	/	/
<i>Candida auris</i> (CDC B 11903)	MIC	1.00	/	0.025
	MFC	2.00	/	0.05
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	MIC	1.00	/	0.05
	MFC	2.00	/	0.1
<i>Candida dublinensis</i> (NCPF 3949)	MIC	0.50	/	0.10
	MFC	1.00	/	0.20

Reference:

Booth, C. (1971): Fungal Culture Media. U: *Methods in Microbiology* 4, Eds. Norris, J. R., Ribbons, D.W., Academic Press, London & New York, pp. 49-94.

CLSI (2009): Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, CLSI publication M07-A8, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 8th ed.

Daouk, K.D., Dagher, M.S., Sattout, J.E. (1995): Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. Journal of Food Protection, 58, 1147–1149

EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility). 2002. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E. Dis. 7.1. Taufkirchen: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Soković, M. (2001): Antifungalna aktivnost etarskih ulja odabranih aromatičnih i lekovitih biljaka, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu

Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M., Noguchi, K., Ishiyama, M., Ezoe, T., Matsumoto, K. (2012): Comparison of the WST–8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. Journal of Microbiological Methods, 90: 160–166.