



# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

## к авторскому свидетельству

номер патента: 958494

**Авторы изобретения:** В.М. Коршунов, Б.В. Пинегин, Н.П. Тарабрина, Г.И. Гончарова и А.М. Лянная

**Заявители:** 2-й Московский ордена Ленина государственный медицинский институт им. Н. И. Пирогова и Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричешвского.

**Штамм *Bifidobacterium longum* ДК-100,  
№ В-2168, используемый для изучения  
приживания экзогенных бифидобактерий в  
макроорганизме**



Государственный комитет  
СССР  
по делам изобретений  
и открытий

# О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

(11) 958494

## К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

- (61) Дополнительное к авт. свид-ву -  
(22) Заявлено 16.01.81 (21) 3237028/28-13  
с присоединением заявки № -  
(23) Приоритет -

Опубликовано 15.09.82, Бюллетень № 34  
Дата опубликования описания 15.09.82

(51) М. Кл.<sup>3</sup>

C 12 N 1/00  
//C 12 N 1/00  
C 12 R 1/01

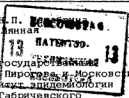
(53) УДК 576.8.093  
(088.8)

(72) Авторы  
изобретения

В.М. Коршунов, Б.В. Пинегин, Н.П. Виноградова,  
Г.И. Гончарова и А.М. Динная

(71) Заявители

2-й Московский ордена Ленина государственный  
медицинский институт им. Н.И. Пирогова и Московский  
научно-исследовательский институт эпидемиологии  
и микробиологии им. Г.Н. Габричевского



- (54) ШТАММ BIFIDOBACTERIUM LONGUM ДК 100,  
№ В-2168, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ  
ПРИЖИВЛЕНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ БИФИДОБАКТЕРИЙ  
В МАКРООРГАНИЗМЕ

1

2

Изобретение относится к медицин-  
ской микробиологии и может быть ис-  
пользовано при изготовлении бактери-  
ных лечебных препаратов, а также при  
изучении взаимодействия экзогенных  
бифидобактерий с микроорганизмом.

Известен штамм Bifidobacterium  
longum [1].

Однако известный штамм не облада-  
ет действием, позволяющим быстро вы-  
делить его среди других бактерий, за-  
сеоряющих кишечник после инокуляции  
в микроорганизм, и судить о прижив-  
лении экзогенных бактерий в различ-  
ных отделах кишечника.

Целью изобретения является штамм,  
обладающий устойчивостью к высокой  
дозе антибиотика, позволяющей выде-  
лить данный штамм в чистой культуре  
из кишечника животных и людей, а  
также высокой антагонистической ак-  
тивностью для приготовления лечебно-  
го препарата.

Для получения штамма использован  
исходный штамм ДВА-13 (Bifidobacte-  
rium longum), обладающий более вы-  
сокой антагонистической активностью,  
выделенный из кишечника здорового  
человека. Из этого штамма после об-  
работки его мутагеном был получен

мутант, устойчивый к 100 мг/мл кана-  
мицина.

- 5 Предложенный штамм Bifidobacte-  
rium longum ДК-10, используемый для  
изучения приживления экзогенных би-  
фидобактерий в макроорганизме, хра-  
нится в коллекции ВНИИгенетика под  
номером В-2168.

- 10 Полученный штамм бифидобактерий  
В. longum ДК-100 имеет следующие  
морфологическую и физиологическую  
характеристики.

- 15 Морфологические признаки. Клетки  
палочковидные, с У-образными раздво-  
ениями на одном или обоих концах.  
Неподвижны, в мазке располагаются  
беспорядочно. Грамположительны,  
иногда внутри клеток выявляется зер-  
нистость.

- 20 Культуральные признаки. В 0,7%-ном  
агаре Блаурокка образуют колонии в  
виде пирамидок, гречичных зерен или  
дисков размером до 3-5 мм в диаметре.  
В жидкой среде Блаурокка растут по  
25 всей пробивке, кроме зоны азобноза,  
на 4-5 сут оседают на дно пробирки.  
На плотной среде, а также и в жидкой  
растут в присутствии 100 мг/мл кан-  
намицина, в отличие от исходного  
30 штамма. Продолжительность лаг-фазы

5-10 ч, время генерации  $2,00 \pm 0,75$  ч, урожай клеток  $(5,91 \pm 1,22) \times 10^8$ . После лиофильного высушивания культуры продолжительность лаг-фазы и время генерации могут увеличиваться. Пигментов не образуют.

Физиологические признаки. Облигатный анаэроб, растет в высокомолекулярном агаре или жидкой среде. Максимум роста при  $37,5^\circ\text{C}$ .

Восхимические свойства. Сбраживает арабинозу, ксилузу, лактозу, сахарозу, маннозу.

Чувствительность к антибиотикам (минимальные ингибирующие концентрации в мкг/мл или ЕД/мл).

|               |         |
|---------------|---------|
| Антибиотик    | ДК-100  |
| Стрептомицин  | 200     |
| Мономицин     | 200     |
| Канамицин     | 100 200 |
| Гентамицин    | 40      |
| Пенициллин    | 0,2-1,0 |
| Ампициллин    | 0,5-1,0 |
| Тетрациклин   | 2       |
| Рифампицин    | 10      |
| Хлорамфеникол | 0,8     |
| Линкомицин    | 0,1     |
| Нистатин      | 7100    |

Антагонистические свойства. При совместном культивировании в количественном соотношении 1:1 в жидкой среде *Blautrocka* подавляет рост  $92,03\%$  *Escherichia coli*  $0_{45}$  (штамм III),  $100,00\%$  *Escherichia coli*  $0_{55}$  (штамм 122),  $99,90\%$  *Shidella flexneri* (штамм 170) и  $84,51\%$  *Proteus morgani* (штамм 12), обладающих энтеропатогенными свойствами.

Штамм ДК-100 с приобретением устойчивости к  $100$  мкг/мл канамицина сохранил антагонистические свойства. Лабораторная проверка показала его непатогенность для экспериментальных животных (мышей, крыс, морских свинок), а также для людей (в опытах на добровольцах).

Примеры практического использования.

Пр и м е р 1. Изучали влияние совместного применения антибиотиков устойчивых бифидобактерий и канамицина на выживаемость мышей при лучевой болезни.

Беспородных мышей весом  $16-18$  г облучают на установке ТУЭЗ-1200 в дозе  $700$  р (мощность дозы -  $140$  р/мин). После облучения животных разделяют на 4 равные группы по 20 мышей в каждой. Первая группа животных получала перорально канамицин и бифидобактерии ДК-100 с 1 по 21 день после облучения с интервалом в 48 ч. Вторая группа животных получала только антибиотики в те же сроки, что и мыши 1-ой группы, третья группа животных вводили только бифидобактерии по аналогичной схеме, а четвертая группа животных получила физиологи-

ческий раствор хлористого натрия. Суточная доза канамицина составляла  $1$  мг на мыш, бифидобактерии вводили в количестве  $1 \times 10^9$  клеток на мыш. Антибиотик и бактерии вводили интраабдоминально в объеме  $0,25$  мл. Опыт повторяли 4 раза.

Результаты опыта показали, что совместное применение устойчивых к  $100$  мкг/мл канамицина бифидобактерий *B. longum* ДК-100 и канамицина оказывает выраженное влияние на увеличение процента выживаемости облученных мышей. Это выявляется с 12-13 дня после облучения и в последующие сроки наблюдения разница в количестве выживших мышей в группах леченых и нелеченых животных постоянно увеличивается. На 13 день после облучения процент выживаемости в 1, 2, 3 и 4 группах составлял  $56,6$ ;  $50,0$ ;  $46,6$  и  $13,3$  соответственно. На 30 день выживаемость составляла  $33,3$ ;  $26,6$ ;  $20,0$  и  $3,3$  процента соответственно.

Устойчивость бифидобактерий к антибиотикам позволяет начинать бактериотерапию одновременно с антибиотиками, способствуя предотвращению развития дисбактериоза у облученных мышей и увеличению за счет этого продолжительности их жизни.

Пр и м е р 2. Определяли приживаемость бифидобактерий, устойчивых к  $100$  мкг/мл канамицина, в желудочно-кишечном тракте крыс-гнотобионтов и распределение этих микроорганизмов на слизистой различных отделов кишечника.

В опыте используют 10 крыс-гнотобионтов в возрасте 6 недель. Животные получают бифидобактерии в течение 3 дней в дозе  $1 \times 10^9$  клеток на крысу. Спустя 5, 7, 15, 30 и 60 дней после окончания введения бифидобактерий делают высевы на  $0,7\%$ -ный агар *Blautrocka* от всех животных, а на 60 день животных забивают и из различных отделов кишечника выделают отрезки по  $4-6$  см в длину. Выделенные участки кишечника разрезают в длину и тщательно промывают в физиологическом растворе хлористого натрия. После этого отрезки кишечника взвешивают, гомогенизируют с соответствующим количеством физиологического раствора и из различных разведений гомогената делают высевы на  $0,7\%$  агар. Соответственно каждому отделу кишечника делают аналогичные посевы содержимого его полости.

Применявшийся штамм хорошо приживался в кишечнике крыс и высевался в течение 2 мес наблюдения из испражнений в количестве  $10^7-10^8$  клеток на  $1$  г материала. Через 2 мес количество бифидобактерий в полости и на слизистой различных отделов кишечника составило: тонкий кишечник -  $(1,0 \pm$

$\pm 2,3) \times 10^4$  и  $(2,0 \pm 2,4) \times 10^3$  бактерий на 1 г материала соответственно; слепая кишка -  $(2,0 \pm 0,8) \times 10^7$  и  $(1,7 \pm 0,6) \times 10^5$  соответственно; поперечно-ободочная кишка -  $(1,9 \pm 0,7) \times 10^7$  и  $(2,0 \pm 1,8) \times 10^4$  соответственно.

Воздействие детергентами и ферментами на отрезки толстого кишечника, выделенные из моноконтаминированных крыс, не приводило к уменьшению количества бифидобактерий на слизистой.

**П р и м е р 3.** Определяли приживляемость *B. longum* ДК-100 в желудочно-кишечном тракте конвенционных крыс и возможность их выделения в чистой культуре из кишечника конвенционных животных на среде с канамицином.

Животных разделяют на 3 группы по 10 особей в каждой: первая группа животных получает бифидобактерии в дозе  $1 \times 10^9$  клеток на крысу в течение 3 дней, вторая группа животных получает канамицин (50 мг/кг веса) одновременно с бифидобактериями ( $1 \times 10^9$  клеток на крысу), животные третьей группы не получают бифидобактерий. Через 5, 7, 15 дней гомогенаты слизистых и содержимого полости кишечника опытных и контрольных животных засевают на 0,7% агар Блаурокка с 80 мг/мл канамицина. Результаты опытов показали, что экзогенные антибиотикоустойчивые штаммы успешно колонизировали кишечник конвенционных крыс и были обнаружены практически во всех отделах кишечника, высеиваясь в чистой культуре на среде с канамицином:  $10^2 - 10^3$  в полости и на слизистой тощей кишки,  $10^2$  - на слизистой и  $10^1 - 10^4$  - в полости подвздошной кишки,  $10^4 - 10^8$  - на слизистой и  $10^7$

в полости слепой кишки,  $10^4$  - на слизистой и  $10^6 - 10^7$  - в полости поперечноободочной кишки. Это ненамного меньше обычного популяционного уровня бифидобактерий у крыс и свидетельствует о хорошем приживлении экзогенных бифидобактерий в кишечнике. Необходимо отметить, что одновременное введение канамицина не снижает приживляемости данного штамма бифидобактерий в кишечнике. У контрольных животных аналогичные бактерии не обнаружены.

Предложенный штамм обладает действием, позволяющим выделять его в чистой культуре среди других представителей микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

Штамм может найти применение для изучения механизмов адгезии и взаимоотношений бактерий желудочно-кишечного тракта, что позволит усовершенствовать бактериотерапию кишечных заболеваний человека и животных.

#### Формула изобретения

Штамм *Bifidobacterium longum* ДК-100, № В-2168 (Коллекция "ВНИИ-генетика"), используемый для изучения приживления экзогенных бифидобактерий в макроорганизме.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе:  
1. Гончарова Г.И. с соавг. Культуральная, морфологическая и биохимическая характеристика *Bacterium bifidum*. Труды МНИИЗМ. М., 1969, т. XIII, с. 415-426.

Составитель С. Малутина

Редактор Н. Горват Техред А.Ач Корректор Н. Король

Заказ 6982/36

Тираж 505

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР  
по делам изобретения и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4