



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) **KZ** (13) **U** (11) **4145**
(51) **A61K 39/02** (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C12N 1/04 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2019/0314.2

(22) 08.04.2019

(45) 12.07.2019, бюл. №28

(72) Бияшев Кадыр Бияшевич; Булегенова Мадина Джумагуловна; Бияшев Биржан Кадырович; Киркимбаева Жумагуль Слямбековна; Сарыбаева Динара Амангельдиевна

(73) Бияшев Кадыр Бияшевич (KZ)

(56) SU 17 08350 A1, 30.01.1992

(54) **ШТАММ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI 39 SN, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА**

(57) Полезная модель относится к биотехнологии и может быть использована в микробиологической промышленности для получения пробиотического препарата, применяемого в ветеринарии при лечении и профилактике желудочно-кишечных заболеваний у молодняка сельскохозяйственных животных и птиц.

Задачей полезной модели является получение нового эффективного штамма-продуцента пробиотического препарата для ветеринарных целей.

Технический результат, достигаемой при использовании полезной модели, заключается в получении штамма *E. coli* 39-SN обладающий адгезивной способностью, высокой приживаемостью, длительным сроком элиминации, высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, наличием генетической метки, позволяющий отличать его от естественных прототипов и подтверждающий его безопасность, который может быть использован для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний новорожденного молодняка животных и птиц.

(19) KZ (13) U (11) 4145

Полезная модель относится к биотехнологии и может быть использована в микробиологической промышленности для получения пробиотического препарата, применяемого в ветеринарии при лечении и профилактике желудочно-кишечных заболеваний у молодняка сельскохозяйственных животных и птиц.

Проблема профилактики и лечения желудочно-кишечных патологий у животных и птицы, возбудителями которых являются условно-патогенные кишечные микроорганизмы, имеет как экономическое, так и социальное значение, которое проявляется в аспекте противоэпидемиологической защиты здоровья людей.

Снижение колонизационной резистентности кишечника, в свою очередь, приводит к транслокации кишечных микроорганизмов в органы и ткани животных и птицы. Свидетельством реального существования такой угрозы являются, отмечаемые в отчётах Всемирной Организации Здравоохранения, участвовавшие вспышки пищевых токсикоинфекций у людей в странах с традиционно высоким потреблением яиц, мяса, молока или с обычаями употреблять в пищу полусырые животные продукты. Причины этих заболеваний связывают с контаминацией продукции животного происхождения условно-патогенными микроорганизмами с повышенными вирулентными свойствами, которые обладают широкой средовой адаптивностью и способностью легко сохраняться и размножаться в процессе переработки и хранения кормов.

Это обстоятельство потребовало пересмотра сложившихся управленческих подходов к профилактике и лечению желудочно-кишечных заболеваний и необходимости разработки и внедрения в производство нового поколения экологически безопасных препаратов, направленных на коррекцию кишечного биоценоза животных и повышение колонизационной резистентности слизистой кишечника к контаминации условно- патогенной микрофлорой.

Мировой опыт свидетельствует, что в профилактике желудочно-кишечных болезней молодняка всё большее применение находят новые стратегии кормления, направленные на ограничение колонизации кишечника патогенами. При этом широко используются такие кормовые добавки, как ферменты, органические кислоты, пробиотики, симбиотики. а также возросло значение заместительной терапии, направленной на восстановление кишечного биоценоза путем регуляторного введения живых бактерий - представителей нормальной кишечной микрофлоры. Препараты, в состав которых они входят, известны под названием пробиотики. Их применение приводит к частичному или полному отказу от антибиотиков, а это очень важно при современной направленности производства в сторону получения экологически безопасной продукции при сокращении сроков выращивания животных и птицы.

Механизм действия пробиотиков в отличие от антибиотиков направлен не на уничтожение, а на конкурентное исключение условно-патогенных бактерий из состава кишечного микробиотопа, чтобы предотвратить усиление и передачу факторов вирулентности в популяции условно-патогенных бактерий.

Бактерии-пробиотики обеспечивают опережающее заселение кишечника новорожденных животных нормальной микрофлорой и создают биологический барьер, преграждающий доступ к ней условно-патогенных бактерий. В процессе жизнедеятельности бактерии-пробиотики вырабатывают комплекс биологически активных соединений, избирательно воздействующих на условно-патогенные микробы.

В настоящее время на ветеринарном рынке предлагается много препаратов, которые рекламируют как пробиотики. Они различны по составу, качеству, фармакологической направленности действия, показаниям к применению. Однако мониторинг рынка пробиотиков показывает, что подавляющее большинство разработок не востребованы практикой в силу ряда недостатков: длительность применения, плохая приживаемость в кишечнике из-за низкой колонизирующей способности (малая адгезивность и скорость роста), плохое качество препарата (малое или большое количество живых микробных клеток в дозе или контаминация посторонними микробами), неудовлетворительная сохранность препарата в полевых условиях. К тому же в состав большинства выпускаемых пробиотиков входят штаммы, выделенные из кишечника человека или взятые из коллекции штаммов для пищевой промышленности.

Во многих публикациях акцентируется внимание на том, что штаммы для изготовления ветеринарных пробиотиков должны быть выделены из кишечника животных, что является обоснованным, так как целью применения пробиотиков является восстановление нормального микробиоценоза желудочно-кишечного тракта животных с учетом их физиологических особенностей.

Наиболее близкой к заявляемой полезной модели является штамм *Bacillus subtilis* 534 - продуцент пробиотика "Споробактерин", который предназначен для профилактики и лечения желудочно-кишечного тракта, дисбактериозов (SU 1708350, кл. А61К 35/66.).

Недостатком известного штамма - пробиотика являются:

- выделен из почвы;
- небольшие сроки хранения, т.к. содержит живые бактерии, которые не могут длительное время сохранять свои свойства;
- имеет узкую область применения - как кормовая добавка для животных;
- штамм также чувствителен к антибиотикам, что ограничивает сферу применения препарата;

- штамм чувствителен к желчи, что ограничивает сферу применения препарата, так как препарат применяется перорально;

- длительность применения препарата (в течение 5 суток).

Задачей полезной модели является получение нового эффективного штамма-продуцента пробиотического препарата для ветеринарных целей.

Технический результат, достигаемый при использовании полезной модели, заключается в получении штамма *E. coli* 39- SN обладающий адгезивной способностью, высокой приживаемостью, длительным сроком элиминации, высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, наличием генетической метки, позволяющий отличать его от естественных прототипов и подтверждающий его безопасность, который может быть использован для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний новорожденного молодняка животных и птиц.

Штамм *Escherichia coli* 39- SN. получен генетическим методом из исходного штамма *Escherichia coli* 158, выделенный от здорового теленка. Исходный штамм *Escherichia coli* 158, высевали на чашки с агаром Хоттингера в концентрации 10^9 КОЕ. Чашки с агаром содержат 50 мкг/мл мутагена Str и 50 мкг/мл мутагена Nea. Среди выросших клонов отбирали мутанты, приобретшие резистентность к 150-200 мкг/мл Str и 100-200 мкг/мл Nea. Полученные мутанты с желаемым фенотипом 3 раза рассеивают на селективной среде с мутагенами.

Вирулентность выделенных клонов изучают в опытах на мышах при их внутрибрюшинном заражении. Мутанты с фенотипом Str^R 100 и Nea^R 100 характеризуются снижением вирулентности на 7-8 порядков в отличие от мутантов, устойчивых к Str и Nea (фенотип Str^R 200 и Nea^R 200). Отобрали аттенуированный клон № 39-SN ($LD_{50} = 10^8$ бактерий), который явился донорским штаммом в опытах трансдукции с использованием бактериофага P22. Показано, что передача каждой из мутаций, обуславливающих фенотип мутанта № 39- SN, в исходный штамм № 158 приводит к снижению его вирулентности. Среди трансдуктантов, приобретших одновременно мутации, сообщающие резистентность к Str^R и Nea^R, отобран штамм *Escherichia coli* 39- SN.

Полученный штамм *Escherichia coli* 39-SN депонирован в Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства образования и науки Республики Казахстан (ПКП НИИПББ КМ МОМ РК).

Коллекционный номер М-46-15/D.

Штамм *Escherichia coli* 39-SN характеризуются следующими признаками.

Морфологические признаки.

Клетки штамма - короткие палочки (1,1-1,6)*(2,0-5,9) мкм, подвижные, грамтрицательные, спор не образуют.

Культуральные свойства.

Бактерии штамма при росте на мясопептонном агаре через 24 ч образуют гладкие, выпуклые, круглые, блестящие, полупрозрачные колонии серого цвета с ровным краем, на среде Эндо через 24 часа - круглые колонии темно-красного цвета с металлическим блеском. При культивировании в жидких средах - бактерии штамма через 18ч образуют равномерное помутнение.

Физиолого-биохимические признаки.

Диапазон температур роста 37-39°C, оптимальная температура 37°C. Оптимум pH 6,8-7,5. В качестве источника углерода используют глюкозу, лактозу, мальтозу, маннит, арабинозу, дульцит, сорбит. Обладает лизин - и орнитиндекарбоксилазной активностью, не обладает уреазной активностью. Не образует сероводород, образует индол. Штамм продуцирует микроцин - антибиотическое вещество.

Антигенная структура.

Типичная для *Escherichia coli* - серогруппа O101 с адгезином K-99. Чувствителен, к бактериофагу O22.

Резистентность к мутагенам.

Устойчив к Str^R мкг/мл 100 и Nea^R 100 мкг/мл.

Остаточная вирулентность.

При внутрибрюшинном заражении белых беспородных мышей Lg $LD_{50} = 7,0 \pm 0,3$ (по методу Рида и Мепча с величиной средней ошибки, вычисленной по формуле Пидди).

Стабильность остаточной вирулентности.

10-кратный пассаж штамма *Escherichia coli* 39-SN через организм белых мышей выявляет сохранение исходного уровня остаточной вирулентности и стабильность маркеров антибиотикорезистентности. Все изолированные из организма мышей после каждого пассажа субкультуры имеют примерно одинаковые показатели остаточной вирулентности Lg $LD_{50} = 0,7 \pm 0,3$.

Стабильность аттенуации и маркеров резистентности к Str^R и Nea^R у штамма *Escherichia coli* 39-SN определяли путем обработки штамма мутагеном нитрозогуанидином. Изучение указанных свойств у 10 клонов штамма, отобранных после такой обработки, выявило их сохранение на том же уровне, что и у необработанной культуры (Lg $LD_{50} = 7,0 \pm 0,3$ минимальная подавляющая равна - Str^R 100 мкг/мл и Nea^R 100 мкг/мл).

Генетический анализ безопасности штамма *Escherichia coli* 39- SN, как штамма - продуцента пробиотического препарата.

Генетическое изучение штамма *Escherichia coli* 39-SN проведенное с использованием трансдуцирующего бактериофага P22, показало, что его фенотип определяется наличием 2 независимых мутаций - в Str^R гене и в гене, детерминирующем резистентность к Nea^R. Установлено, что мутации, контролируемые устойчивостью к Str^R и Nea^R приводят к повреждению рибосомальных белков

(S₁₂, S₁₇) и тем самым влияют на правильность считывания генетической информации. В результате происходит снижение вирулентных свойств, т.е.,- аттенуация. Таким образом, аттенуация связана с нарушением трансляции генов, кодирующих синтез важных факторов патогенности бактерии или генов, продукты которых имеют важное значение в жизнедеятельности бактерии.

Изучение вирулентности полученных трансдуктантов при внутрибрюшинном заражении белых мышей выявило снижение ее клонов, которые приобрели 2 мутации, сообщающие резистентность к Str^R и Nea^R, так и каждую в отдельности. Присутствие в штамме 39- SN двух мутаций, каждая из которых может снижать вирулентные свойства, служит убедительным доказательством стабильности и безопасности вакцинного штамма *Escherichia coli* 39- SN.

Дополнительно нами в штамм введена третья мутация «антиэпидемический Rbt маркер», сообщающая высокую устойчивость к желчи (revented bile tolerance - желчеустойчивый) и чувствительность к поверхностно - активным веществам.

Указанная мутация, обозначенная как Rbt. не влияет на фенотипическое выражение вирулентности, ограничивает время проживания в кишечнике хозяина и не дает длительно пребывать во внешней среде (т.е. неспособные к эпидемическому или эпизоотическому распространению).

Дифференциация штамма-продуцента *E. coli* 39- SN от культур естественного происхождения.

Штамм *Escherichia coli* 39- SN дифференцируется от культур естественного происхождения по резистентности к Str^R и Nea^R и высокой устойчивости к желчи и чувствительности к поверхностно активным веществам. Наличие генетических маркеров к трем мутагенам позволяет в лабораторных условиях на простых питательных средах в течение 16-20 часов дифференцировать штамм - продуцент от полевых при подозрении на эшерихиоз или при выделении эшерихии в продуктах животного происхождения.

Патогенные свойства.

Штамм *E. coli* 39- SN не вызывает заболевания и гибели белых мышей при внутрибрюшинном и пероральном введении 24-часовой культуры штамма 39- SN в дозах 10⁷, 10⁸, 10⁹, 5*10⁹ и 10¹⁰ КОЕ (LD₅₀ = 9,0 ± 0,10, методу Рида и Менча с величиной средней ошибки, вычисленной по формуле Пиджи).

Антагонистическая активность штамма *E. coli* 39- SN.

Пример 1. Антагонистическую активность штамма *Escherichia coli* 39- SN изучали в сравнении со штаммом *Bacillus subtilis* 534. Штаммы *E. coli* 39- SN и *Bacillus subtilis* 534 выращивали на жидкой среде (МПБ) в термостате 16-18 ч при 37-38°C. Затем антагонистическую активность определяли микробиологическим способом - методом диффузии в агар (метод лунок). В чашках Петри, засеянных тест-культурами, сделали лунки. В лунки вносили штаммы 39- SN и B379M из расчета 1,0 см³. Чашки выдерживали в термостате при 37°C в течение 18-24 часа. Измеряли диаметр отсутствия роста тест-культур.

Результаты определения антагонистической активности штаммов *E. coli* 39- SN и *Bacillus subtilis* 534 приведены в таблице 1.

Тест культуры	Зона задержки тест культур, в мм	
	<i>E. coli</i> 39- SN	<i>Bacillus subtilis</i> 534
<i>E. coli</i>	20,9	14,8
<i>Proteus vulgaris</i>	18,9	10,2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	23,2	15,9
<i>Clostridium perfringens</i>	24,5	13,8
<i>Yersinia enterocolitica</i>	23,4	14,1
<i>Treponema hyodysenteriae</i>	24,3	13,7
<i>Staph. aureus</i>	22,8	13,6
<i>Sal. dublin</i>	23,2	12,4
<i>Sal. abortus ovis</i>	29,8	16,6
<i>Sal. choleraesuis</i>	27,9	14,9
<i>Sal. typhimurium</i>	24,9	13,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18,9	12,8

Из материала таблицы видно, что штамм *E. coli* 39- SN подавляет рост всех исследованных тест-культур, причем зоны подавления роста большинства из них больше, чем при штамме *Bacillus subtilis* 534. Это свидетельствует о более высокой антимикробной активности предлагаемого штамма *E. coli* 39- SN.

Пример 2. Изучение сроков персистенции предлагаемого штамма *E. coli* 39- SN и штамма *Bacillus subtilis* 534 в кишечнике животных.

Длительность персистенции бактерий в организме обусловлена способностью штамма прикрепляться к стенке кишечника и размножаться в пристеночном слое или кишечном содержимом.

Формируют три группы беспородных белых мышей массой 14-16 г. по 20 голов в каждой группе.

Культуру штамма *Escherichia coli* 39-SN и штамма *Bacillus subtilis* 534 выращивают на МПА в течение 20-24 часов. Затем, по оптическому стандарту мутности доводят концентрацию по значению 10^9 КОЕ.

Первой группе мышей вводят однократно перорально по 0.5мл культуры штамма *E. coli* 39-SN второй группе - культуру штамма *Bacillus subtilis* 534 в том же объеме. Третью группу мышей используют в качестве контрольной, которой вводят в том же объеме физиологический раствор. По 5 мышей каждой из трех групп убивают через 12 часов. 24 часа, через 2 и 3 суток после введения культур *E. coli* 39-SN и *Bacillus subtilis* 534. Вскрывают кишечники мышей, отбирают участки тонкого и толстого отделов кишечника и делали посева на питательные среды. Посевы выдерживали в термостате при 37°C в течение 24ч.

По окончании культивирования отмечали пробы с наличием колоний, типичных для эшерихии и бацилл. Результаты подтверждают микроскопией мазка, окрашенного по Граму.

Положительным считается результат при наличии в посевах хотя бы одной колонии исследуемых культур. За 100% берется значение при высеваемости эшерихии и бацилл от 5 мышей в каждом определении. Опыт проводят в трех повторениях.

Штамм *E. coli* 39-SN обладает большей приживаемостью в кишечнике белых мышей, чем штамм *Bacillus subtilis* 534. что установлено сроком его выделения из кишечника и кишечного содержимого.

Пример 3. Препарат из штамма *E. coli* 39-SN приготавливают путем выращивания в аппарате для культивирования микроорганизмов (АКМШ). Выращивание культуры в аппарате в течение 16-18ч при $37-38^{\circ}\text{C}$ с аэрацией, после чего производят смыв культуры средой для высушивания, содержащей желатин 1,5-2%, сахарозу 10%, рН 7,4-8,0. После проверки полученной микробной массы на чистоту и типичность роста ее доводят до концентрации 10^{10} КОЕ в 1мл по стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича. Полученную массу разливают во флаконы объемом $4,0\text{см}^3$, подвергают лиофильной сушке до получения сухого продукта - пробиотика. Сохраняют препарат при температуре $4-6^{\circ}\text{C}$. Срок годности 12 месяцев.

Пример 4. Для изучения эффективности препарата из штамма *E. coli* 39-SN бактериальную взвесь, приготовленную для высушивания, разводят стерильным физиологическим раствором до концентрации 10^9 КОЕ в 1 мл. Антагонистическую

активность штамма *E. coli* 39-SN изучали путем однократной выпойкой, перорально, новорожденных телят, ягнят, поросят (в первые 30 минут после рождения, до приема молозива) и цыплятах в дозах соответственно $20 \cdot 10^9$, $3 \cdot 10^9$, $3 \cdot 10^9$, и 10^8 КОЕ. Спустя 24 часа всем опытным и контрольным животным вводили перорально вирулентную культуру эшерихии, в дозе. 10^{10} КОЕ. Все подопытные животные выжили, при падеже контрольных.

Таким образом, штамм *Escherichia coli* 39-SN, являющийся представителем нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта здоровых животных, не патогенен, желчеустойчивый, обладает адгезивной способностью, высокой приживаемостью, длительным сроком элиминации, высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, наличием генетической метки, позволяющий отличать его от естественных прототипов и подтверждающий его безопасность, отвечает международным требованиям, предъявляемым к штаммам-продуцентам пробиотиков и может быть использован для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний новорожденного молодняка животных и птиц.

Присутствие в штамме *Escherichia coli* 39-SN трех мутаций с известными механизмами действия, служит убедительным генетическим доказательством стабильности и безопасности штамма-продуцента *E. coli* 39-SN. Теоретическая частота обратной мутации одновременно по всем маркерам составляет примерно 10^{-21} , что практически невозможно.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Штамм бактерий *Escherichia coli* 39-SN, депонированный в Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства образования и науки Республики Казахстан (РГП НИИПББ КМ МОН РК), под регистрационным номером М-46-15/D, используемый для изготовления эффективного ветеринарного пробиотического препарата против желудочно-кишечных инфекций молодняка сельскохозяйственных животных и птиц.