

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201900159** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.05.29

(51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/32* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.04.12

---

(54) **СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ДОРМАНТНОГО СОСТОЯНИЯ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN VITRO**

---

(31) 2018140171/10 (066772)

(72) Изобретатель:

(32) 2018.11.14

**Батыршина Яна Рэмовна (RU)**

(33) RU

(71) Заявитель:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
"НОВОСИБИРСКИЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ ТУБЕРКУЛЕЗА"  
МИНИСТЕРСТВА  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (ФГБУ  
"ННИИТ" МИНЗДРАВА РОССИИ)  
(RU)**

---

(57) Изобретение относится к микробиологии и предназначено для моделирования дормантного статуса *M. tuberculosis* в условиях *in vitro*. Способ заключается в генерации дормантного фенотипа микобактерий туберкулеза в жидкой питательной среде в условиях депривации компонентов, необходимых для полноценного роста и размножения *M. tuberculosis in vitro*. Дормантное состояние *M. tuberculosis* достигается в интервале между 4 и 11 сутками культивирования микобактерий туберкулеза в модифицированной среде Middlebrook 7H9 следующего состава: гидрофосфат натрия ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) - 2,5 г, дигидрофосфат калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) - 1,0 г, сульфат аммония ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) - 0,5 г, L-глутаминовая кислота ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ) - 0,5 г, цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) - 0,1 г, сульфат магния ( $\text{MgSO}_4$ ) - 0,05 г, цитрат железа(III)-аммония ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ) - 0,04 г, сульфат цинка ( $\text{ZnSO}_4$ ) - 0,001 г, сульфат меди(II) ( $\text{CuSO}_4$ ) - 0,001 г, пиридоксин ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) - 0,001 г, биотин ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ) - 0,0005 г, хлорид кальция ( $\text{CaCl}_2$ ) - 0,0005 г, глицерин ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) - 2,0 мл, твин-80 ( $\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$ ) - 0,5 мл, вода дистиллированная до 1,0 л. Способ прост в осуществлении, легко воспроизводим, нетребователен к материальным ресурсам и может использоваться в экспериментальных и клинических микобактериологических исследованиях.

---

**201900159**  
**A1**

**201900159**

**A1**

## Способ моделирования dormantного состояния *Mycobacterium tuberculosis in vitro*

Изобретение относится к микробиологии и может использоваться в клинической и экспериментальной медицине для исследований культур *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) в состоянии dormantности, в том числе поиска способов антибактериального воздействия на данный патоген.

Современные представления о dormantности бактерий характеризуют это состояние следующей совокупностью признаков:

- утратой способности к размножению в восприимчивом организме и/или *in vitro*, определяемой по наличию роста колоний на плотных питательных средах и торможению бактериального роста в жидких питательных средах;
- снижением интенсивности биохимических, энергетических, пластических процессов в бактериальных клетках;
- изменениями типичной морфологии бактериальных клеток;
- а также изменениями экспрессии генов, детерминирующих модификацию метаболических процессов в бактериальных клетках [1-4].

Формирование dormantного фенотипа происходит под воздействием изменения параметров внешней для бактерий среды, в качестве которых могут выступать многие физические, химические, биологические (иммунологические) факторы [2, 5]. Временной интервал, в течение которого бактериальная популяция может находиться в dormantном состоянии, может широко варьировать в зависимости от биологических характеристик микроорганизма и условий его микроокружения. Одним из ключевых признаков dormantного статуса является сохранение бактериальной популяцией или ее частью способности к ресусцитации, т.е. переходу к состоянию активного метаболизма и размножения. Ресусцитация также может наступать вследствие воздействия на бактериальную популяцию

внешних стимулов, в том числе удаления фактора, вызвавшего формирование дормантного фенотипа [6].

В клиническом аспекте способность *Mycobacterium tuberculosis* находиться в дормантном состоянии в клетках зараженного организма создает предпосылки для протекания туберкулезной инфекции в латентной форме (ЛТИ), т.е. без клинических проявлений заболевания и трансмиссии возбудителя. Иммуный ответ, формирующийся при ЛТИ, не приводит к элиминации микобактерий из организма. Состояние ЛТИ может продолжаться длительное время, до нескольких десятков лет [7], неся в себе риски перехода инфекции в активную форму. При переходе в активную форму патоген выходит из состояния функционального покоя, размножается в органах и тканях, индуцирует формирование патоморфологических, в том числе деструктивных изменений, что приводит к развитию заболевания и дальнейшему эпидемическому распространению возбудителя. ЛТИ является наиболее существенным источником активных форм туберкулеза (ТБ) и эпидемического процесса, без воздействия на который невозможно достичь эффективного контроля над данной инфекцией.

Другой клинически важной проблемой является недостижимость полной эрадикации возбудителя из очагов поражения даже при полном клиническом излечении туберкулеза. Локализуясь в посттуберкулезных морфологических изменениях в дормантном состоянии микобактерии туберкулеза (МБТ) обуславливают возможность реактивации специфического патологического процесса и рецидива заболевания [8]. Данную проблему усугубляет феномен лекарственной толерантности дормантных форм *M. tuberculosis*. Суть его заключается в том, что действие большинства антибактериальных веществ направлено на активно функционирующие и реплицирующиеся бактериальные клетки, и резко ограничено в отношении их дормантных фенотипов [1, 9], что создает препятствия для эффективной этиотропной терапии ТБ и превентивной терапии ЛТИ.

Таким образом, в современных условиях, когда туберкулез остается одной из основных проблем общественного здравоохранения, необходимость поиска эффективного антибактериального воздействия на dormantные формы *M. tuberculosis*, является крайне актуальным. Моделирование *in vitro* dormantного состояния МБТ в бактериальных культурах позволит искать новые молекулярные мишени воздействия на данные формы возбудителя и разрабатывать эффективные средства химиотерапии ЛТИ/ТБ.

Известна модель L.G.Wayne, использующая прогредиентную гипоксию для формирования dormantного фенотипа *M. tuberculosis* в бактериальной культуре в жидкой питательной среде [10]. Недостатком данной модели является неудовлетворительная воспроизводимость, необходимость использования перемешивающих устройств (ротаторов или шейкеров), поддержания герметичных условий культивирования, неудобство отбора аликвот культур и детекции содержания кислорода в питательной среде.

Существуют другие подходы к моделированию dormantного состояния микобактериальных культур. От предлагаемого способа и друг от друга они отличаются тем, что в качестве индуктора dormantного состояния *M. tuberculosis in vitro* используются различные физико-химические факторы: оксид азота (NO) [11], оксид углерода (CO) [12], низкий pH среды [13, 14], высокая концентрация липидов в среде [15]. Недостатком этих методов является необходимость внесения в культуральные среды дополнительных агентов (DETA/NO [11], аскорбиновой кислоты [14], MOPS [13], комплекса жирных кислот и холестерина [15]), необходимость использования газогенерирующего оборудования [12], шейкеров [12-14], кратковременность (менее 1 суток) поддержания dormantного состояния МБТ после устранения воздействия [11], или, наоборот, необходимость длительной (от 3 до 6 месяцев) инкубации культур [13].

Известна “мультистрессовая” модель dormantности *M. tuberculosis* [16], основанная на длительном (18 суток) одновременном воздействии на микобактериальную культуру нескольких факторов: низкого содержания

кислорода (5%), высокого уровня углекислого газа (10%), низкой концентрации нутриентов в питательной среде (использование 10%-ной среды Дюбо) и низкого уровня pH (5,0). Многофакторность воздействия значительно усложняет воспроизведение данной модели и требует больших материальных затрат.

Известны два способа моделирования dormantных форм микобактерий с помощью генетически трансформированных либо мутантных культур. Один из них предлагает использование рекомбинантной плазмидной ДНК pMind-varC с нуклеотидной последовательностью, кодирующей ген varC MSMEG\_1284 [17]. Этот способ предназначен для получения только dormantных форм *M. smegmatis* и не может использоваться в моделях dormantности *M. tuberculosis*. Кроме того, осуществление данного способа требует проведения дорогостоящих многоэтапных лабораторных манипуляций для получения генетически трансформированной культуры микобактериальных клеток. Второй способ предлагает культивирование стрептомицин-зависимого штамма *M. tuberculosis* 18b со специфической мутацией (инсерция цитозина в области 530 петли рРНК), но он не может использоваться для других штаммов и изолятов МБТ, не имеющих данной мутации [18].

Существуют модель старвации J.C.Bett и соавт. [19] и модель Салиной Е.Г. и соавт., основанная на культивировании *M. tuberculosis* в среде Сотоно с дефицитом ионов калия. [20]. В старвационной модели, в отличие от заявляемой нами, используется инкубация МБТ в фосфатно-солевом буфере в течение 6 недель. При этом, по данным авторов, снижалась респираторная активность *M. tuberculosis* и изменялись уровни экспрессии некоторых белков микобактериальными клетками, но не изменялась способность МБТ к росту на плотных питательных средах, что не позволяет отнести полученный фенотип *M. tuberculosis* к истинно dormantным. Способ, описанный Салиной Е.Г. и соавт., имеет следующие существенные отличия от предлагаемого нами. Во-первых, для моделирования dormantного состояния *M. tuberculosis*

Салина Е.Г. и соавт. применяют питательную среду принципиально другого состава – модифицированную среду Сотона с дефицитом ионов калия, который не встречается в условиях *in vivo* изолированно. Во-вторых, способ Салиной Е.Г. и соавт. требует более длительных (от 40 суток) сроков для осуществления.

Известна жидкая питательная среда (бульон) Middlebrook 7H9 следующего состава:

На 1,0 л дистиллированной воды:

Альбумин бычьей сыворотки .....	5,0 г
Гидрофосфат натрия ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) .....	2,5 г
Декстроза ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) .....	2,0 г
Дигидрофосфат калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) .....	1,0 г
Хлорид натрия ( $\text{NaCl}$ ).....	0,85 г
Сульфат аммония ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) .....	0,5 г
L- глютаминовая кислота ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ).....	0,5 г
Цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) .....	0,1 г
Сульфат магния ( $\text{MgSO}_4$ ) .....	0,05 г
Цитрат железа(III)-аммония ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ) .....	0,04 г
Каталаза.....	0,003 г
Сульфат цинка ( $\text{ZnSO}_4$ ) .....	0,001 г
Сульфат меди(II) ( $\text{CuSO}_4$ ) .....	0,001 г
Пиридоксин ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) .....	0,001 г
Биотин ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ) .....	0,0005 г
Хлорид кальция ( $\text{CaCl}_2$ ) .....	0,0005 г
Глицерин ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) .....	2,0 мл [21, 22].

Данная среда представляет собой неселективную питательную среду для культивирования микобактерий и не предназначена для получения dormantных форм *M. tuberculosis*.

Предлагаемый способ моделирования dormantного состояния *Mycobacterium tuberculosis in vitro* представляет собой получение

дормантного фенотипа *M. tuberculosis* в интервале между 4 и 11 сутками инкубации в модифицированной среде Middlebrook 7H9 следующего состава:

Гидрофосфат натрия ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) .....	2,5 г
Дигидрофосфат калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) .....	1,0 г
Сульфат аммония ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) .....	0,5 г
L- глутаминовая кислота ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ).....	0,5 г
Цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) .....	0,1 г
Сульфат магния ( $\text{MgSO}_4$ ) .....	0,05 г
Цитрат железа(III)-аммония ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ) .....	0,04 г
Сульфат цинка ( $\text{ZnSO}_4$ ) .....	0,001 г
Сульфат меди(II) ( $\text{CuSO}_4$ ) .....	0,001 г
Пиридоксин ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) .....	0,001 г
Биотин ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ) .....	0,0005 г
Хлорид кальция ( $\text{CaCl}_2$ ) .....	0,0005 г
Глицерин ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) .....	2,0 мл
Твин-80 ( $\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$ ) .....	0,5 мл

Вода дистиллированная.....до 1,0 л. в которой индуктором дормантного фенотипа *M. tuberculosis* является депривация альбумина бычьей сыворотки, декстрозы, хлорида натрия и каталазы. Способ прост в осуществлении, не требует специального оборудования и дополнительных материальных ресурсов. Возможность использования в модели унифицированных сред Middlebrook 7H9 промышленного производства позволяет получать воспроизводимые результаты моделирования.

Способ осуществляют следующим образом.

Для приготовления модифицированной питательной среды можно использовать два подхода:

1. Модифицированную питательную среду готовят из навесок следующих компонентов:

Гидрофосфат натрия ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) .....	2,5 г
--	-------

Дигидрофосфат калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) .....	1,0 г
Сульфат аммония ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) .....	0,5 г
L- глутаминовая кислота ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ).....	0,5 г
Цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) .....	0,1 г
Сульфат магния ( $\text{MgSO}_4$ ) .....	0,05 г
Цитрат железа(III)-аммония ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ) .....	0,04 г
Сульфат цинка ( $\text{ZnSO}_4$ ) .....	0,001 г
Сульфат меди(II) ( $\text{CuSO}_4$ ) .....	0,001 г
Пиридоксин ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) .....	0,001 г
Биотин ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ) .....	0,0005 г
Хлорид кальция ( $\text{CaCl}_2$ ) .....	0,0005 г
Глицерин ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) .....	2,0 мл
Твин-80 ( $\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$ ) .....	0,5 мл,

добавляют до 1 л. дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения, разливают по флаконам в необходимых объемах, стерилизуют автоклавированием при  $121^\circ\text{C}$  в течение 10 минут, pH готовой среды –  $6,8 \pm 0,3$ .

2. Если модифицированную питательную среду для получения dormantных форм *M. tuberculosis* готовят из сухой основы среды Middlebrook 7H9 промышленного производства, то следует навеску сухой основы растворить в дистиллированной воде в соответствии с указаниями производителя, добавить 0,2 об% глицерина и исключить введение в среду добавки ADC. Стерилизацию среды проводят автоклавированием при  $121^\circ\text{C}$  в течение 10 минут. pH готовой среды –  $6,8 \pm 0,3$ .

Dormantный фенотип *M. tuberculosis* был получен следующим путем. Модифицированную (депривированную) питательную среду инокулировали суспензией клеток референтного штамма *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv в физиологическом растворе в концентрации  $9,0 \times 10^8 - 1,0 \times 10^9$  микробных клеток на миллилитр (мкр кл/мл). Суспензию готовили из бактериальной массы колоний 25-30 дневной культуры (соответствует логарифмической



фазе роста), полученной на среде Левенштейна-Йенсена. Итоговая концентрация микробных клеток в депривированной среде может варьировать в пределах  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^9$ , в зависимости от цели получения дормантной культуры МБТ; нами использовалась концентрация  $2,0 \times 10^8$  мкр кл/мл среды. Инкубацию проводили при  $37^\circ\text{C}$  в течение 30 сут. В качестве контроля использовали культуру *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv в стандартной питательной среде Middlebrook 7H9 в той же концентрации.

Для оценки статуса МБТ в депривированной (экспериментальной) и контрольной культурах начиная со 2 суток инкубации с периодичностью в 1-3 суток: 1) измеряли оптическую плотность исследуемых культур в единицах McFarland ( $\text{OD}_{600}$ ) с помощью нефелометра BD PhoenixSpec (Becton Dickinson); 2) выполняли высевы на стандартную жидкую питательную среду Middlebrook 7H9, по 500 мкл, и на плотную питательную среду – агар Middlebrook 7H10, по 20 мкл. Регистрацию высевов на агаре осуществляли по наличию видимого роста с подсчетом количества колониеобразующих единиц (КОЕ) и учетом сроков их появления. Регистрацию характера роста микобактерий в жидкой питательной среде осуществляли в автоматизированной системе культивирования ВАСТЕС 960 MGIT (Becton Dickinson) с учетом сроков его появления и величины индекса роста (ИР). Поскольку ИР в системе ВАСТЕС 960 MGIT прямо пропорционален интенсивности потребления кислорода микроорганизмами [23], по его величине можно судить об интенсивности энергетического метаболизма МБТ. Оценивали также морфологию микобактериальных клеток экспериментальных и контрольных культур микроскопией мазков с окраской по Цилю-Нельсену. Критериями дормантного состояния *M. tuberculosis* были: 1) торможение прироста бактериальной массы в жидкой культуре, определяемое по динамике величины  $\text{OD}_{600}$ ; 2) неспособность к росту на плотных средах; 3) способность к восстановлению роста на жидких и плотных средах (ресусцитации) после удаления фактора дормантности – при пересеве дормантной культуры в стандартную жидкую питательную среду

и/или при добавлении к дормантной культуре компонентов, ранее удаленных из среды (устранения депривации), с последующей инкубацией; 4) изменения морфологии микобактериальных клеток, как дополнительный критерий.

Результаты измерений параметра  $OD_{600}$ , представленные на рис.1, демонстрируют, что за 30-дневный период оптическая плотность экспериментальных культур почти не менялась ( $SD\ 0,03$ , range – 0,12); динамика значений оптической плотности контрольных культур соответствовала классической кривой бактериального роста в бульонной культуре [24]. Таким образом, по данному параметру прироста бактериальной массы МБТ в условиях депривированной питательной среды не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии репликации микобактериальных клеток.

По результатам высевов на плотные среды (таблица 1), депривированные культуры демонстрировали выраженное снижение способности к размножению в течение 2 и 3 суток депривации, начиная с 4 суток – роста на агаре не было. Контрольные культуры в течение всего срока наблюдения давали на агаре сплошной рост колоний в течение 5-6 суток.

Таблица 1. Характеристики роста депривированной и контрольной культур *M. tuberculosis* на агаре Middlebrook 7H10

Срок инкубации, сутки	Депривированная культура		Контрольная культура	
	Количество КОЕ	Срок появления видимого роста, сутки	Количество КОЕ	Срок появления видимого роста, сутки
2	32	16	> 500	5
3	2	21	> 500	5
4 – 30	Роста нет		> 500	5-6

По результатам высевов на жидкие среды (ВАСТЕС) экспериментальные культуры сохраняли способность к восстановлению до 10-11 дня депривации

(таблица 2). При этом время до детекции роста составляло в экспериментальных культурах 16-29 суток против 1,5-2,5 суток в контрольных культурах. После 12 дней депривации роста (восстановления) МБТ на жидких средах не наблюдалось.

Таблица 2. Показатели восстановления депривированной и контрольной культур при пересеве в стандартную среду Middlebrook 7H9

Срок инкубации, сутки	Депривированная культура		Контрольная культура	
	Наличие роста	Время до детекции, сутки	Наличие роста	Время до детекции, сутки
2	есть	17	есть	2,5
3	есть	16	есть	2
4	есть	17	есть	1,5
5	есть	21	есть	2
6	есть	21	есть	2,5
8	есть	19,5	есть	2
9	есть	24	есть	2,5
10	есть	23	есть	1,5
11	есть	29	есть	1,5
12	нет	-	есть	2
13-30	нет	-	есть	1,5 – 2,5

Динамика потребления кислорода, регистрируемая по показателю индекса роста ВАСТЕС, также существенно различалась в контрольных, с разным сроком предварительной инкубации в стандартной среде, и экспериментальных культурах (рис.2). Низкий уровень потребления кислорода и выраженное замедление темпов восстановления

депривированных культур при пересеве их в стандартную полносоставную среду свидетельствует о низкой интенсивности протекания окислительно-восстановительных реакций и, соответственно, низкой интенсивности энергетического метаболизма (дыхания) *M. tuberculosis*, являющихся облигатными аэробами.

Устранение депривации путем добавления к экспериментальным культурам недостающих компонентов также приводило к восстановлению их способности к росту на плотных и жидких средах. Альбумин бычьей сыворотки, декстроза, каталаза, натрия хлорид были добавлены к экспериментальным культурам после 4 и 8 суток депривации до достижения концентраций, соответствующих концентрациям данных компонентов в стандартной среде Middlebrook 7H9 и инкубированы дополнительно в течение 4 и 8 суток соответственно. Аликвоты восстановленных культур 20 мкл и 500 мкл высевали на агар Middlebrook 7H10 и бульон Middlebrook 7H19 ВАСТЕС MGIT соответственно, результаты высевок представлены в таблице 3.

Таблица 3. Показатели восстановления экспериментальных культур на плотных и жидких средах после устранения депривации

После 4 суток депривации					После 8 суток депривации				
Время после устранения депривации, сутки	Рост на ПС** (агар Middlebrook 7H10)		Рост в ЖС*** (ВАСТЕС)		Время после устранения депривации, сутки	Рост на ПС** (агар Middlebrook 7H10)		Рост в ЖС*** (ВАСТЕС)	
	Число КОЕ*	Время появления, сутки	Наличие роста	Время до детекции, сутки		Число КОЕ*	Время появления, сутки	Наличие роста	Время до детекции, сутки
4	≈250	17	есть	11	9	≈ 100	12	есть	9
6	≈500	14	есть	11	12	≈ 400	9	есть	7,5
7	≈250	13	есть	8	15	≈500	7	есть	6
8	>500	12	есть	8	17	>500	5	есть	5

\*- в пересчете на 1 мл высева; \*\*-ПС- плотные среды; \*\*\*- ЖС-жидкие среды

То есть, добавление в депривированную среду недостающих компонентов после 4 суток депривации и последующие 4 суток ресусцитации и 8/8 суток депривации/ресусцитации приводили к восстановлению способности *M. tuberculosis* к размножению на жидких средах через 11-8 и 9-5 суток соответственно, а на плотных средах - в сроки 17-12 и 12-5 суток соответственно. Чем дольше было время инкубации МБТ в восстановленной среде после устранения депривации, тем быстрее был переход к состоянию активного размножения при пересеве (таблица 3).

Микроскопическое исследование выявило изменение морфологии МБТ экспериментальных культур по сравнению с контрольными в виде явного преобладания МБТ с меньшей длиной клетки (рис. 3).

Таким образом, культивирование *M. tuberculosis* в бульоне Middlebrook 7H9 в условиях депривации альбумина бычьей сыворотки, декстрозы, каталазы, хлорида натрия, приводит к формированию фенотипа, характерного для дормантного статуса МБТ. Дормантное состояние МБТ сохраняется и является обратимым к активной репликации в интервале с 4 по 11 сутки культивирования в депривированной питательной среде. Следовательно, предложенный способ моделирует дормантное состояние *M. tuberculosis* в условиях *in vitro*.

**Предлагаемый способ моделирования дормантного состояния *Mycobacterium tuberculosis in vitro* в модифицированной питательной среде Middlebrook 7H9 следующего состава:**

Гидрофосфат натрия ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) .....	2,5 г
Дигидрофосфат калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) .....	1,0 г
Сульфат аммония ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) .....	0,5 г
L- глутаминовая кислота ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ).....	0,5 г
Цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) .....	0,1 г
Сульфат магния ( $\text{MgSO}_4$ ) .....	0,05 г
Цитрат железа(III)-аммония ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ) .....	0,04 г
Сульфат цинка ( $\text{ZnSO}_4$ ) .....	0,001 г

Сульфат меди(II) (CuSO <sub>4</sub> ) .....	0,001 г
Пиридоксин (C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ) .....	0,001 г
Биотин (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S) .....	0,0005 г
Хлорид кальция (CaCl <sub>2</sub> ) .....	0,0005 г
Глицерин (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ) .....	2,0 мл
Твин-80 (C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> O <sub>26</sub> ) .....	0,5 мл

Вода дистиллированная.....до 1,0 л, позволяет получить дормантный фенотип данного патогена в бульонной культуре с минимальными материально-техническими затратами и доступен для любой лаборатории, выполняющей культуральные исследования микобактерий туберкулеза. Предлагаемая модель может использоваться для любых исследований *in vitro* и/или *in vivo* (на экспериментальных животных) с целью изучения физических, молекулярно-генетических, биохимических и других характеристик дормантного статуса МБТ, поиска способов бактерицидного воздействия на дормантные формы *M. tuberculosis* различных антибактериальных агентов (антибиотиков, дезинфектантов, физических факторов среды и т.п.), а также для изучения иммунологических и патогенетических реакций организма в экспериментальных моделях латентной туберкулезной инфекции *in vivo*. Возможность использования для получения дормантного фенотипа *M. tuberculosis* стандартизированной по составу питательной среды Middlebrook 7H9, в том числе промышленного производства, позволяет получать результаты исследований с высокой воспроизводимостью.

## Формула изобретения

**Способ моделирования дормантного состояния *Mycobacterium tuberculosis in vitro***, заключающийся в получении дормантного фенотипа *M. tuberculosis* в интервале между 4 и 11 сутками культивирования их в модифицированной жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 следующего состава:

Гидрофосфат натрия ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) .....	2,5 г
Дигидрофосфат калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) .....	1,0 г
Сульфат аммония ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) .....	0,5 г
L- глутаминовая кислота ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ).....	0,5 г
Цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) .....	0,1 г
Сульфат магния ( $\text{MgSO}_4$ ) .....	0,05 г
Цитрат железа(III)-аммония ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ) .....	0,04 г
Сульфат цинка ( $\text{ZnSO}_4$ ) .....	0,001 г
Сульфат меди(II) ( $\text{CuSO}_4$ ) .....	0,001 г
Пиридоксин ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) .....	0,001 г
Биотин ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ) .....	0,0005 г
Хлорид кальция ( $\text{CaCl}_2$ ) .....	0,0005 г
Глицерин ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) .....	2,0 мл
Твин-80 ( $\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$ ) .....	0,5 мл
Вода дистиллированная.....	до 1,0 л.

## Способ моделирования дормантного состояния *Mycobacterium tuberculosis* in vitro

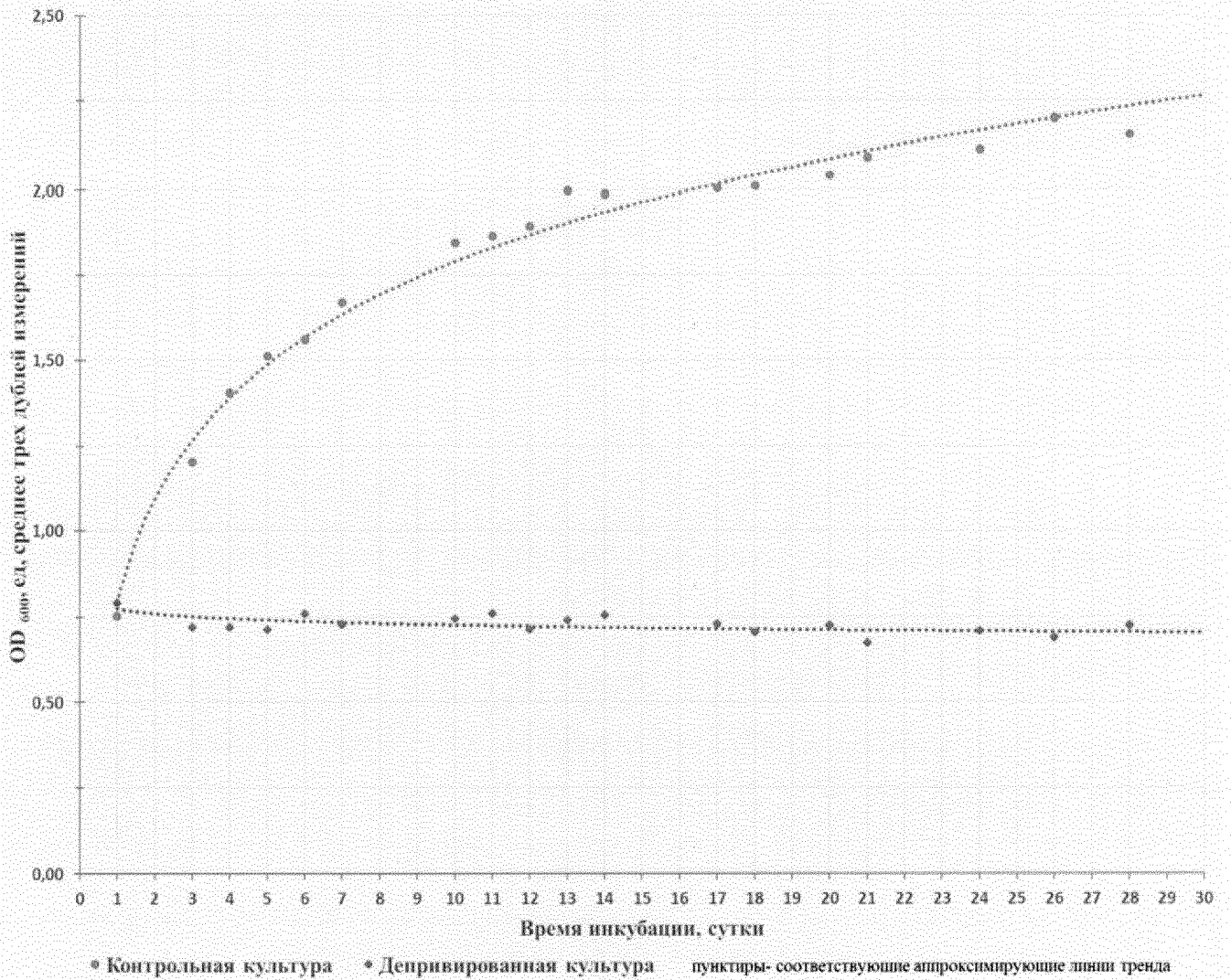


Рис. 1. Динамика значений оптической плотности депривированной и контрольной культур *M. tuberculosis*.



Способ моделирования dormantного состояния  
*Mycobacterium tuberculosis* in vitro

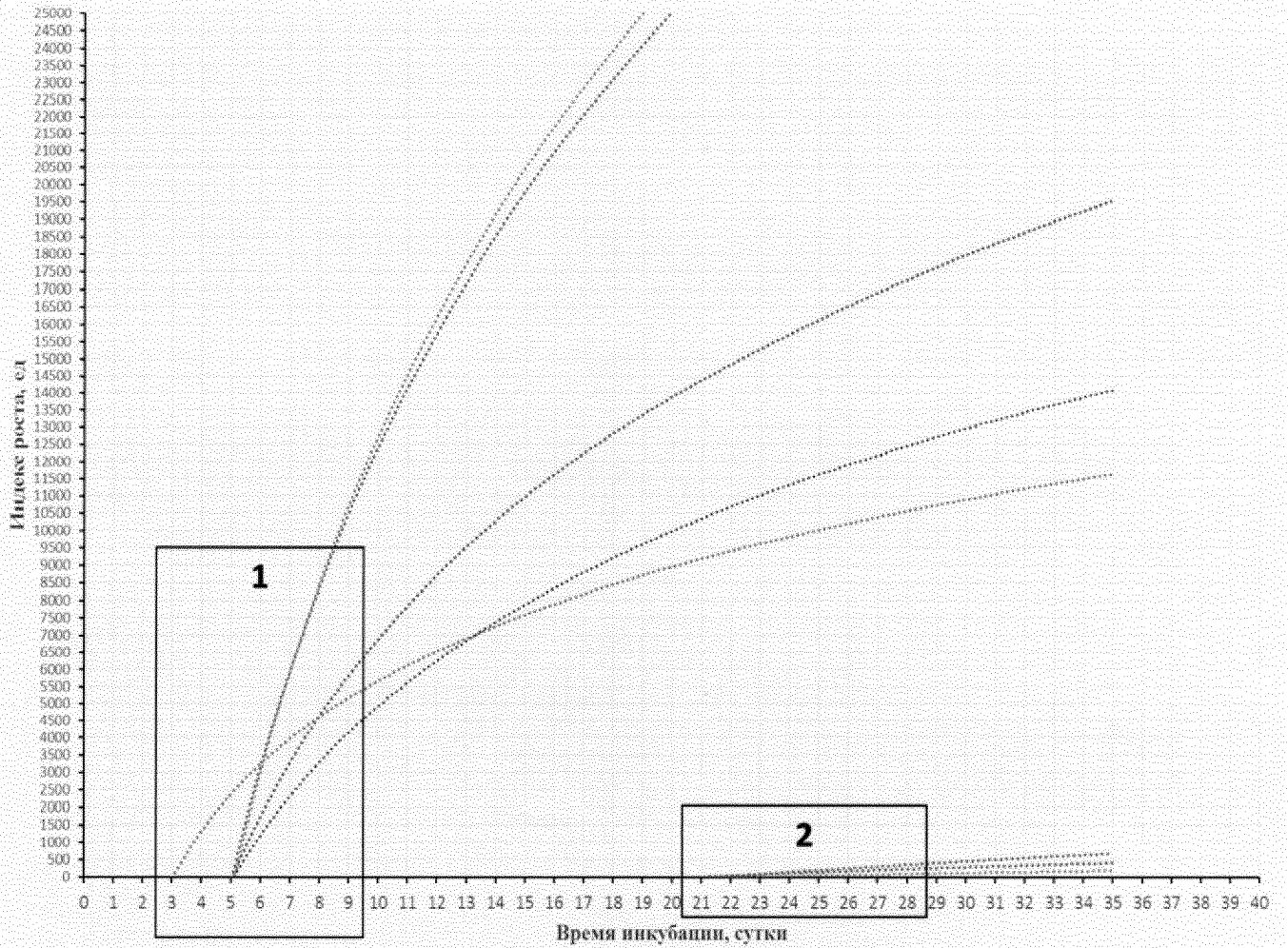
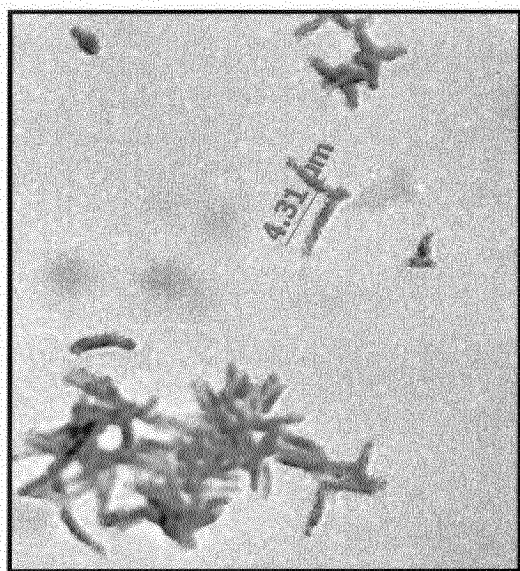


Рис.2. Динамика потребления кислорода по ИР ВАСТЕС в жидкой питательной среде *M. tuberculosis*: 1 – контрольные культуры, предварительно инкубировавшиеся в стандартной питательной среде в течение 2, 20, 75, 90, 460 дней, 2 – экспериментальные культуры после 9, 10, 11 дней депривации; логарифмическая аппроксимация.

Способ моделирования дормантного состояния  
*Mycobacterium tuberculosis* in vitro



А



Б


Рис 3. Микрофотографии *M. tuberculosis* контрольной (А) и депривированной (Б) культур, окраска по Цилю-Нельсену (x1000).

## ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ  
ПОИСКЕ(статья 15(3) ЕАПК и правило 42  
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201900159

Дата подачи: 12 апреля 2019 (12.04.2019)		Дата испрашиваемого приоритета: 14 ноября 2018 (14.11.2018)	
Название изобретения: СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ДОРМАНТНОГО СОСТОЯНИЯ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN VITRO			
Заявитель: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НОВОСИБИРСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ТУБЕРКУЛЕЗА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (ФГБУ «НИИИТ» МИНЗДРАВА РОССИИ)			
<input type="checkbox"/> Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)			
<input type="checkbox"/> Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)			
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:			
МПК:	C12N 1/20 (2006.01)	СПК:	C12N 1/20 (2016-05)
	C12R 1/32 (2006.01)		C12R 1/32 (2013-01)
Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК			
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:			
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)			
C12N 1/20, C12R 1/32			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:			
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ			
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей		Относится к пункту №
A	SALINA Elena G. et al. Potassium availability triggers Mycobacterium tuberculosis transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states. Open Biol. 2014 Oct;4(10), p. 1-15. pii: 140106. doi: 10.1098/rsob.140106.		1
A	SALA Claudia et al. Simple Model for Testing Drugs against Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Oct; 54(10): 4150-8. doi: 10.1128/AAC.00821-10. Epub 2010 Aug 2.		1
A	ALNIMR Amani M. Dormancy models for Mycobacterium tuberculosis: A Braz J Microbiol. 2015 Jul 1;46(3):641-7. doi: 10.1590/S1517-838246320140507.		1
A	US 2013/0040829 A1 (UNIVERSITY OF CENTRAL FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 14.02.2013, реферат, формула		1
A	БЕРЕЗИНСКАЯ Т.Л. и др. Явление обратимости межпопуляционных клеточных переходов Mycobacterium tuberculosis как основа создания новых противотуберкулезных лекарственных препаратов. Вестник РУДН, Серия Медицина. Изд-во РУДН (Москва). 2004, № 4, с. 268-76.		1
<input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы В		<input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении	
* Особые категории ссылочных документов:			
"А" документ, определяющий общий уровень техники		"Г" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения	
"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее		"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности	
"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.		"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории	
"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета		"&" документ, являющийся патентом-аналогом	
"D" документ, приведенный в евразийской заявке		"I" документ, приведенный в других целях	
Дата действительного завершения патентного поиска:		23 декабря 2019 (23.12.2019)	
Наименование и адрес Международного поискового органа:		Уполномоченное лицо :	
Федеральный институт промышленной собственности			
РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		А.Н. Банченко	
		Телефон № (499) 531-64-81	