

## **ЛЕКЦИЯ 8**

# **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

# Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом



## I Количественное определение антибиотиков

## II Количественное определение живых бактериальных клеток в иммунобиологических препаратах

### I Количественное определение антибиотиков (ГФ РБ, раздел 2.7.2)

**Антибиотики** (от др.-греч. *ἀντί* — против + *βίος* — жизнь) — вещества природного (микробного, животного, растительного) или полусинтетического происхождения, способные подавлять рост определенных микроорганизмов или вызывать их гибель.

Антибиотики природного происхождения чаще всего продуцируются актиномицетами, низшими грибами, реже - бактериями.

Многие антибиотики оказывают сильное подавляющее действие на рост и размножение бактерий и при этом относительно мало повреждают или вовсе не повреждают клетки макроорганизма, и поэтому применяются в качестве лекарственных средств.

Некоторые антибиотики используются в качестве цитостатических (противоопухолевых) препаратов при лечении онкологических заболеваний (доксорубицин — продуцируется *Streptomyces coeruleorubidus* или *Streptomyces peucetius*).

## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом



*Количественное содержание (активность) антибиотиков является одним из основных показателей, характеризующих качество средств антимикробной терапии.*

Для оценки количественного содержания антибиотиков применяют:

1. Хроматографические методы (ВЭЖХ, ТСХ);
2. Спектроскопические методы (ИК-спектроскопия, УФ-спектроскопия);
3. Биологические методы;
4. Химические методы.

ВЭЖХ (HPLC - High performance liquid chromatography) – наиболее эффективный метод анализа, который используется как для идентификации, так и контроля чистоты и количественного определения антибиотиков.

Количественное определение некоторых антибиотиков, для которых ВЭЖХ-определение затруднено, проводят *микробиологическим методом*. Примером таких антибиотиков являются аминогликозиды (*канамицин, гентамицин* и т.д.).

Ряд антибиотиков представляют собой комплекс нескольких микробиологически активных компонентов: *капреомицин* – полипептидный антибиотик, *ванкомицин* – гликопептидный антибиотик. Для них также проводится количественное определение (активность) *микробиологическим методом*.

## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом

Определение количественного содержания антибиотиков микробиологическим методом основано на *определении их антимикробной активности, обусловленной способностью угнетать рост чувствительных тест-микроорганизмов.*

Количественно активность антибиотиков выражается в единицах действия (ЕД) или «мкг». Для большинства антибиотиков 1 ЕД или «мкг» соответствует 1 мкг активного вещества.

Активность антибиотика определяют путем сравнения степени угнетения роста чувствительного микроорганизма под действием испытуемого антибиотика и стандартного образца в известных концентрациях.

Стандартные образцы – субстанции, активность которых точно установлена по отношению к Международному стандартному образцу или Международному стандартному препарату.

Определение проводят двумя методами:

- *Метод диффузии в агар*
- *Метод турбидиметрии*

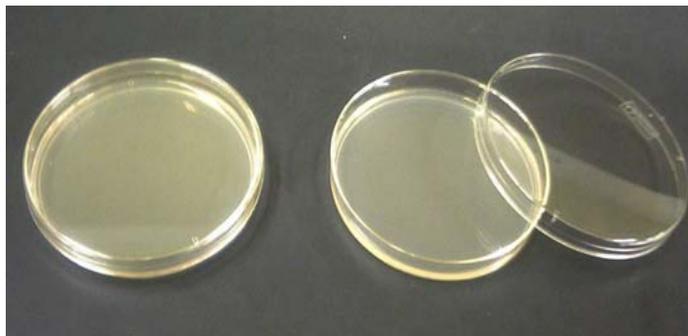
## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом

### 1. Метод диффузии в агар

В ГФ РБ приведены рекомендуемые микроорганизмы, буферные растворы, стандартные образцы, условия проведения испытания. (табл. 2.7.2.-1).

Антибиотик	Стандартный образец	Растворитель для приготовления основного раствора	Буферный раствор (рН)	Микроорганизм	Среда и конечное значение рН	Температура инкубации
Бензилпенициллин	Бензилпенициллин натрия ФСО	Буфер №1, рН 6,8-7,0	Буфер №1, рН 6,8-7,0	Staphilococcus aureus 209P	№11, №7 +0,1глюкозы, рН 6,8-7,0	(35-37°C)
Ванкомицина гидрохлорид	Ванкомицина гидрохлорида ФСО	Вода Р	рН 8,0	Bacillus subtilis NCTC 8236, CIP 52,62 ATCC 5533	Среда А, рН8,0	(37-39°C)
Гентамицина сульфат	Гентамицина сульфата ФСО	Вода Р	рН 8,0 (0,05М)	Bacillus pumilus NCTC8241, CIP 76,18 Staphilococcus epidermidis NCIB 8853,	Среда А, рН7,9 Среда А, рН7,9	(35-39°C) (35-39°C)

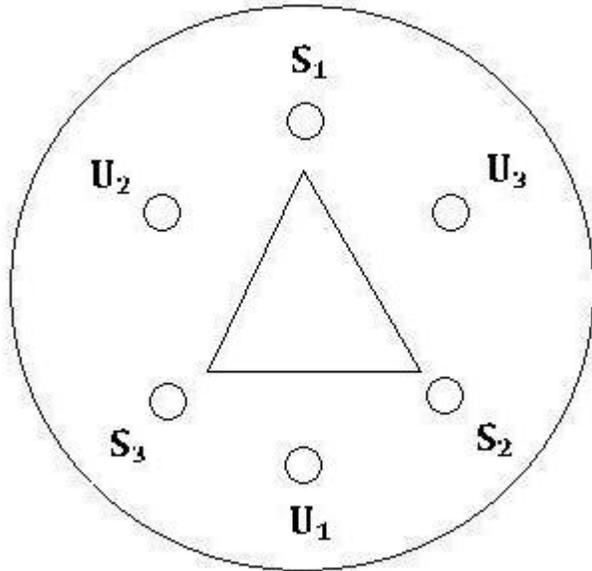
## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом



- Питательную среду определенного состава для каждого микроорганизма расплавляют, охлаждают до  $(48—60)^{\circ}\text{C}$  для вегетативных форм и до  $(65—70)^{\circ}\text{C}$  при использовании суспензии спор, засевают суспензией микроорганизмов, чувствительных к испытуемому антибиотику. Количество суспензии микроорганизмов выбирают таким образом, чтобы образовывались четко определенные зоны ингибирования.

- Инокулированная среда немедленно разливается по чашкам Петри на строго горизонтальной поверхности в количестве, достаточном для формирования однородного слоя толщиной от 2 мм до 5 мм. Среда может также состоять из двух слоев, из которых только верхний подвергался инокуляции. Поверхность среды должна быть сухой к моменту использования.
- Используя растворитель и буферный раствор, указанные в соответствующем разделе ГФ РБ, готовят *основные* растворы фармакопейного стандартного образца (ФСО) и испытуемого антибиотика известных концентраций (1000 мкг/мл).
- Из основных растворов готовят рабочие растворы ФСО и испытуемого образца. Для оценки достоверности количественного определения используют не менее трех доз стандартного образца и трех доз испытуемого антибиотика, имеющих равные предполагаемые активности. Предпочтительно использовать ряды доз, меняющихся в геометрической прогрессии, например, в соотношении 1:2:4 (например, 20, 40, 80 мкг/мл).

## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом



S<sub>1</sub> и U<sub>1</sub> – растворы стандартного (S) и испытуемого (U) образцов с малой концентрацией (20 мкг/мл); S<sub>2</sub> и U<sub>2</sub> – со средней концентрацией (40 мкг/мл); S<sub>3</sub> и U<sub>3</sub> – с высокой концентрацией (80 мкг/мл).

- Растворы наносят на поверхность среды, например, в стерильных цилиндрах из фарфора, нержавеющей стали или другого подходящего материала, или в лунки, сделанные в агаре. В каждый цилиндр или лунку должны быть помещены равные объемы раствора испытуемого антибиотика и ФСО.
  - Растворы испытуемого антибиотика и ФСО чередуют таким образом, чтобы исключить взаимное влияние более концентрированных растворов (т.е., чтобы растворы с большими концентрациями не соприкасались между собой.)
- Рекомендуется следующая последовательность внесения стандартного (S) и испытуемого (U) образцов в цилиндры или лунки каждой чашки: первыми вносятся растворы стандартного и испытуемого образца с малой концентрацией (S<sub>1</sub>, U<sub>1</sub>), затем со средней концентрацией (S<sub>2</sub>, U<sub>2</sub>), последними вносят растворы с большими концентрациями (S<sub>3</sub>, U<sub>3</sub>).

## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом



- Чашки могут выдерживаться до инкубации при комнатной температуре или, если необходимо, при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  в течение определенного промежутка времени, обычно от 1 до 4 ч для протекания диффузии.
- Чашки инкубируют при подходящей температуре около 18 ч.
- Измеряют диаметры (с точностью не ниже 0,1 мм) или площади кольцевых зон ингибирования (с соответствующей точностью) и вычисляют активность с использованием подходящих статистических методов.
- В каждом определении используют достаточное для получения требуемой точности количество повторов. Число чашек, используемых в каждом опыте, должно быть достаточным для обеспечения статистической достоверности результатов, но не менее 6 чашек.



# Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом

## 2. Турбидиметрический метод

- Турбидиметрия — метод количественного анализа по интенсивности света, поглощенного взвешенными частицами — клетками микроорганизмов.

*Принцип:*

- при добавлении определенных количеств антибиотиков наблюдается задержка роста клеток микроорганизмов (бактериостатический эффект), а затем их гибель (бактерицидный эффект). При этом изменяется (уменьшается) интенсивность поглощенного света.

*Ход определения (трехдозный метод):*

- Приготовление основных и рабочих растворов испытуемого антибиотика и ФСО – аналогично методу диффузии
- Помещают равные объемы каждого из растворов испытуемого антибиотика и ФСО в идентичные пробирки и прибавляют в каждую пробирку равные объемы инокулированной определенным микроорганизмом питательной среды (например, 1 мл раствора ФСО/антибиотика + 9 мл инокулированной среды)
- Контроль: 2 пробирки без антибиотика с инокулированной средой. В одну из них добавляют 0,5 мл формальдегида. Эти пробирки используют для настройки оптического прибора, используемого для измерения роста
- Все пробирки помещают случайным образом в водяную баню с температурой инкубации, оптимальной для данного штамма микроорганизма, и выдерживают 3-4 часа
- По окончании инкубации рост микроорганизмов останавливают прибавлением 0,5 мл формальдегида в каждую пробирку или тепловой обработкой и измеряют степень мутности с использованием подходящего оптического прибора
- Рассчитывают активность с использованием подходящих статистических методов
- В каждом определении используют достаточное количество повторов для получения требуемой точности
- Используемые микроорганизмы, условия их культивирования и проведения эксперимента, растворители, буферные растворы, ФСО описаны в ГФ РБ (табл. 2.7.2.-2).

# Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом

## II Количественное определение живых бактериальных клеток в иммунобиологических препаратах

*Имунобиологическое ЛС* - это биологическое ЛС, предназначенное для иммунобиологической профилактики, диагностики и лечения заболеваний, а также биологическое ЛС, полученное путем переработки неклеточной части крови, оказывающее лечебный и профилактический эффект через иммунную систему.

К иммунобиологическим препаратам относятся: вакцины, анатоксины, иммуноглобулины, сыворотки, интерфероны, аллергены, бактериофаги, пробиотики (эубиотики), и другие.

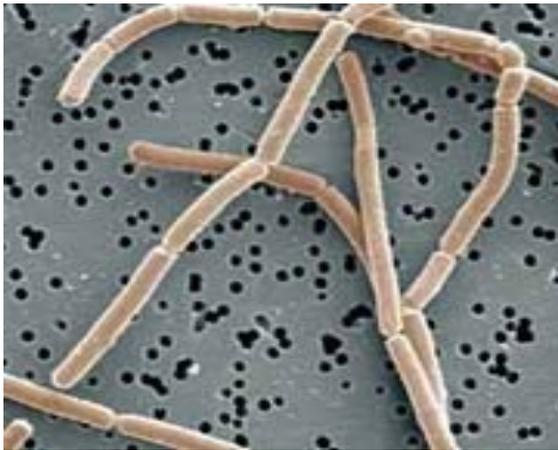
Имунобиологические препараты могут получать путем:

- культивирования штаммов микроорганизмов и клеток эукариот,
- экстракции веществ из биологических тканей и крови, включая ткани и кровь человека, животных и растений,
- применения технологии рекомбинантной ДНК, гибридной технологии,
- репродукции живых агентов в эмбрионах или организме животных.

## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом



Bifidobacterium



Lactobacillus

**Пробиотики** – препараты из живых микроорганизмов - нормальных «обитателей» кишечного тракта здорового человека - и веществ микробного происхождения, оказывающие при естественном пути введения положительный эффект через регуляцию микрофлоры кишечника.

Термин «пробиотик», от латинского pro bio — «для жизни», был предложен Lilly D.M. и Stilwell R.H. в 1965 году как альтернатива термину «антибиотики», означающему «против жизни».

Современное определение пробиотиков было дано ВОЗ в 2002 г: **«Пробиотики — это живые микроорганизмы, которые при применении в адекватных количествах вызывают улучшение здоровья организма-хозяина»**

## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом

Полезное действие пробиотиков и пробиотических продуктов известно с начала XX в., когда И.И. Мечниковым была создана простокваша с живыми ацидофильными бактериями.

*«Наша преждевременная и несчастливая старость является следствием постоянного отравления вредными веществами, выделяемыми некоторыми микробами толстого кишечника. Совершенно очевидно, что уменьшение количества этих микробов отдалает старость и смягчает ее проявления»* — говорил И.И. Мечников, наблюдая как болгары, постоянно употреблявшие в пищу «болгарский йогурт» (кисломолочный продукт), отличались долголетием и хорошим здоровьем.

Затем, в 1907 году ученый разрабатывает концепцию, в основе которой лежит изучение нормальной микрофлоры организма человека, а употребление молочнокислых продуктов в пищу (т. е., бактерий, содержащихся в них и формирующих защитную функцию организма) — практический шаг к продлению и улучшению качества жизни. Это было началом эры пробиотиков.

Широкое применение препаратов, содержащих лактобактерии и бифидобактерии — пробиотиков - берет начало с 30-х годов 20-го века.

## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом

Пробиотики могут быть ЛС, пищевыми добавками, пищевыми продуктами. В отношении пищевых добавок и пищевых продуктов-пробиотиков не существует строгих норм и правил производства, которые должен выполнять производитель.

В США пробиотики находятся за пределами компетенции Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA).

В Республике Беларусь пробиотики относятся как к ЛС, так и к БАДам.

*Требования к микроорганизмам, входящим в состав пробиотиков* (Продовольственная и сельскохозяйственная организация при ООН (Food and Agriculture organization of the United Nations — FAO) и ВОЗ (2002 г.):

- Непатогенность и нетоксичность;
- Способность выживать в кишечнике;
- Способность сохранять стабильность состава и жизнедеятельность в течение всего срока хранения;
- Присутствие живых клеток, которые обладают высокой адгезивной и антагонистической способностью к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам;
- Не должны угнетать нормальную микрофлору кишечника;
- Наличие генетического паспорта и доказательство генетической стабильности.

## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом

### *Фармакологические свойства пробиотиков:*

1. Антагонистически (несовместимо с жизнью) действуют в отношении патогенных, условно патогенных бактерий, дрожжей, грибов, вирусов.
2. Улучшают нарушенный баланс микроорганизмов в ЖКТ, устраняют дисбиоз (количественные и качественные изменения состава кишечной микрофлоры) и дисбактериоз (качественное изменение бактериальной микрофлоры организма, преимущественно кишечника).
3. Выполняют защитную и детоксикационную (помогают очищать организм) роль по отношению к радиационному воздействию, химическим загрязнителям пищи, канцерогенным и токсическим веществам, экзотической и непривычной пище.
4. Продуцируют витамины (К и группы В), расщепляют желчные кислоты, холестерин и координирует его уровень.
5. Оптимизирует процесс пищеварения, моторную функцию кишечника.
6. Способствуют активизации иммунной системы.

## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом

Микроорганизмы, используемые в качестве пробиотиков:

- Лактобактерии (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. jonsonii*, *L. gassed*);
- Бифидобактерии (*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. adolescents*);
- Непатогенные разновидности *Escherichia coli*;
- Непатогенные разновидности спорообразующих бактерий *Bacillus (B. subtilis)*;
- Непатогенные разновидности *Enterococcus (Enterococci faecium, E. salivarius)*;
- Дрожжевые грибки (*Saccharomyces boulardii*).

Виды пробиотиков в зависимости от состава:

- Монокомпонентные – содержат только один вид бактерий: Лактобактерин, Бифидумбактерин, **Бактолакт**, Бактисубтил



- Поликомпонентные – включают несколько видов живых микроорганизмов: Линекс, Ацилакт, **Лактобациллин**, Энтерожермина



## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом



- Комбинированные (симбиотики) – содержат как живые бактерии, так и пребиотики: Бифилиз, Полибактерин.

*Пребиотики* – вещества, которые не всасываются в тонкой кишке, но стимулируют рост и метаболическую активность представителей нормальной микрофлоры толстого кишечника.

Пребиотики, в отличие от пробиотиков, – это химические вещества, которые содержатся в довольно широком спектре продуктов питания. Наибольшее количество пребиотиков содержится в молочных продуктах, кукурузе, крупах, хлебе, луке, чесноке, фасоли, горохе, артишоке, аспарагусе, бананах



К пребиотикам относятся следующие органические соединения:

- Инулин;
- Пантотенат кальция;
- Лактулоза;
- Пектины;
- Декстрин;
- Каротиноиды и др.

## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом

*Виды пробиотиков в зависимости от технологии получения:*

- *Сухие* - это лиофилизированные (высушенные) микроорганизмы, которые могут находиться в порошке, капсулах, таблетках.

*Преимущество – длительный срок хранения*

*Недостаток* - после употребления сухого пробиотика *необходимо от 1 до 4 часов для выхода бактерий из анабиоза* (спящего состояния) после чего препарат начинает проявлять своё действие (адгезию, антагонизм и т. д.).

- *Жидкие* - это первоначальная, не подвергшаяся лиофилизации (сушке) форма пробиотиков.

Жидкие пробиотики состоят из:

- Бактерий или других микроорганизмов, находящихся в физиологически активном состоянии
- Специальной питательной среды (питательная среда служит источником питания физиологически активных бактерий, которые находятся во флаконе).
- Дополнительно введённых ингредиентов, усиливающих эффективность препарата: водорастворимые витамины, микро- и макроэлементы, аминокислоты и т. д.
- Метаболитов. Метаболиты — это продукты жизнедеятельности микроорганизмов (микроорганизмы, находясь в физиологически активном состоянии, поедают питательную среду во флаконе, в результате чего, функционируя, выделяют метаболиты, необходимые организму).

*Преимущество - при попадании в организм действуют немедленно*

*Недостаток – менее длительный срок хранения.*

## Лекция 8. Количественное определение действующих веществ микробиологическим методом



Фармакологическая активность препаратов-пробиотиков зависит от количества и состояния входящих в их состав микробных клеток. Поэтому количество жизнеспособных клеток в одной терапевтической дозе таких лекарственных средств является одним из основных показателей качества.

Как правило, одна доза лекарственного средства-пробиотика должна содержать не менее  $10^7$  живых бактериальных клеток.

Определение титра жизнеспособных клеток, как правило, проводят следующим способом:

- Приготовление серии десятикратных разведений с учетом предполагаемого титра в готовой лекарственной форме;
- Посев на соответствующую питательную среду, культивирование, подсчет выросших колоний микроорганизмов и определение титра клеток.