

Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар

С.И. Кулешова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

Резюме: Для оценки качества антибиотиков и их лекарственных форм, активность которых невозможно оценить химическими методами, используют метод диффузии в агар. Метод описан в ГФ XII, часть 1 (ОФС 42-0068-07) в двух вариантах: трехдозный вариант метода диффузии в агар и определение с использованием стандартной кривой. Метод основан на прямопропорциональной зависимости размеров зон угнетения тест-микроорганизмов, используемых в опыте, от логарифма концентрации (дозы) антибиотика в растворе, вносимого на агаризованную зараженную питательную среду. На размеры зон влияет множество факторов: чувствительность тест-микроорганизма к испытываемому антибиотику, однородность и плотность микробного газона, состав питательной среды и ее количество, вносимое в чашки Петри, химическая природа антибиотика и его доза, используемая при постановке опыта. Определение активности испытываемого препарата проводят путем сравнения с установленной активностью стандартного образца конкретного антибиотика, при этом стандартный образец должен быть высокого фармакопейного качества. Для оценки подтверждения валидности условий проведения испытания используют статистические методы расчета, рассчитывают доверительный интервал при вероятности 95% для подтверждения точности полученных результатов и относительное стандартное отклонение для подтверждения их сходимости.

Ключевые слова: антибиотики; метод диффузии в агар; питательная среда; тест-микроорганизм; линейная зависимость; биологическая активность; стандартный образец.

Библиографическое описание: Кулешова СИ. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2015; (3): 13–17.

TESTING ACTIVITY OF ANTIBIOTICS BY AGAR DIFFUSION

S.I. Kuleshova

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

Abstract: When the quality of antibiotics and antibiotic dosage forms cannot be assessed with the help of chemical methods, one can use two variants of the agar diffusion test described in the State Pharmacopoeia XII, part 1 (General pharmacopoeial monograph 42-0068-07): the three-doses variant of the agar diffusion test and determination with the help of a standard curve. The method is based on directly proportional relationship between the size of test microorganisms inhibition zones and log concentration (dose) of the antibiotic in the solution placed onto agar bacterial medium. The size of the zone depends on a number of factors: sensitivity of the test microorganism to the antibiotic, homogeneity and density of the bacterial lawn, composition of the growth medium, amount of the growth medium placed on Petri dishes, chemical nature of the antibiotic, the dose of antibiotic used in the experiment. Laboratory employees who use this method to test the quality of antibiotics should have appropriate skills. The activity of the drug under testing is determined by comparing it to the established activity of the reference standard which should have compendial quality. Statistical methods are used to assess obtained results and confirm validity of test conditions. The precision of test results is confirmed by computing the 95% confidence interval, and the repeatability is supported by calculation of the relative standard deviation.

Key words: antibiotics; agar diffusion; medium; test microorganism; linear dependence; biological activity; reference standard.

Bibliographic description: Kuleshova SI. Testing activity of antibiotics by agar diffusion. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin 2015; (3): 13–17.

Метод диффузии в агар является фармакопейным биологическим методом определения активности антибиотиков, основанном на способности молекул субстанций антибиотиков диффундировать в агаровых средах и образовывать зоны угнетения, в которых не развиваются используемые тест-микроорганизмы, чувствительные к испытываемому антибиотику. Принцип метода — логарифмическая зависимость степени угнетения роста тест-микроорганизма от концентрации антибиотика. При этом линейная зависимость наблюдается лишь в определенных пределах концентраций антибиотика. Биологические методы рекомендуются для количественного определения таких антибиотиков и их лекарственных форм, активность которых невозможно корректно оценить при помощи хи-

мических методов. Снижение активности антибиотиков приводит к изменениям, которые невозможно обнаружить химическими методами, поэтому микробиологические или биологические испытания рекомендуются в качестве стандартных методов при подозрении на уменьшение активности антибиотиков [1].

В ГФ XII, часть 1 включена ОФС 42-0068-07 «Определение антимикробной активности антибиотиков», в которой достаточно подробно описаны два варианта метода диффузии в агар и использование стандартной кривой, с указанием условий проведения испытания, культивирования и хранения тест-микроорганизмов, приведен состав питательных сред и буферных растворов, используемых при анализе конкретного антибиотика.

Процедура проведения испытания достаточно трудоемкая, зависит от многих факторов, в частности, от состава питательных сред, тест-микроорганизмов, квалификации стандартных образцов, химической природы исследуемого антибиотика и от навыков микробиологов, выполняющих анализ.

Цель настоящей статьи – рассмотреть наиболее важные аспекты определения активности антибиотиков методом диффузии в агар с целью обоснования возможности минимизации вариабельности, свойственной биологическим методам для получения достоверных, точных и воспроизводимых результатов при оценке качества лекарственных средств группы антибиотиков по таким важнейшим показателям как «Активность» и «Количественное определение»; дать рекомендации по валидации метода.

При определении активности методом диффузии в агар одним из главных моментов является качество используемого стандартного образца, так как активность антибиотика оценивают по отношению к активности стандартного образца. Определяют количество анализируемого антибиотика, дающее такой же биологический эффект как конкретное количество стандартного образца, т.е. 100% активности испытуемого соединения означает 100% относительно содержания активного вещества в стандартном образце. Количество активного действующего вещества в лекарственной форме тесно связано с активностью антибиотика, входящего в состав препарата, и если ее определение не является точным, слишком высоким, или слишком низким, вероятно неадекватная терапия и нежелательные побочные эффекты при применении такого препарата [2]. Поэтому для проведения испытания так важно использование аттестованных стандартных образцов с достоверно установленной активностью, имеющих фармакопейное качество. При этом необходимо строго соблюдать условия хранения и использовать по назначению в строгом соответствии с указаниями на этикетке. Например, биологический стандартный образец антибиотика гентамицина сульфат квалификации USP RS и EPCRS отличаются по способу выражения установленной активности, в первом случае она выражена в мкг/мг в пересчете на сухое вещество, т.е. при приготовлении основного стандартного раствора необходимо брать навеску и определять потерю в массе при высушивании, во втором – в IU/vial «as is» (единицы активности в ампуле «как есть»), в этом случае необходим количественный перенос содержимого ампулы для приготовления основного стандартного раствора.

Непременным условием получения достоверных и воспроизводимых результатов является использование тест-микроорганизмов, чувствительных к определенному антибиотику. В ГФ XII, в таблице 33.2 приведены тест-микроорганизмы и их каталожные номера, посевная доза (количество суспензии спор микроорганизмов или вегетативных форм культуры тест-микроорганизма на 1 мл среды). При работе с посевным материалом необходимо соблюдать ряд условий, а именно:

- тест-микроорганизмы не должны быть контаминированы посторонней микрофлорой,

- микробная взвесь стандартизована таким образом, чтобы ее плотность была постоянной, поскольку это имеет значение при расчете посевной дозы. По-

севную дозу подбирают экспериментально, чтобы обеспечить сплошной рост микробного газона и формирование зон угнетения формы правильного круга с резко очерченными краями. В таблице 33.2 ГФ XII приведены ориентировочные посевные дозы, при этом допускается уменьшение или увеличение посевной дозы в зависимости от плотности получаемого газона и четкости очертания зон. В связи с этим при работе с тест-микроорганизмами сотрудники микробиологических лабораторий должны периодически проверять их чувствительность по отношению к конкретному антибиотику общеизвестными методами, например, методом серийных разведений.

Для оптимальных условий роста тест-микроорганизмов, для формирования плотного газона необходима соответствующая питательная среда. Питательная среда должна обеспечивать не только оптимальные условия для роста микробной взвеси, но и достаточную скорость диффузии исследуемого антибиотика. Известно, что способность антибиотиков диффундировать в твердых питательных средах зависит от химической природы и концентрации [3–5]. Поэтому состав среды имеет существенное значение при проведении испытания методом диффузии в агар. Так, при использовании питательных сред с агар-агаром разных производителей можно получить «относительную активность», т.е. активность по отношению к активности стандартного образца, для одного и того же компонента, отличающуюся на несколько процентов. Относительная активность одного из компонента полимиксина – полимиксина В2, определенная на питательной среде, изготовленной с использованием агара «Eiken», получена $98 \pm 6,1\%$, на питательной среде с агаром «Difco» – $129 \pm 6,0\%$. [5]. Для устранения ошибок, связанных с составом питательных сред, можно рекомендовать закупку достаточно больших партий высококачественных компонентов питательных сред и строгое соблюдение условий хранения в течение допустимого срока использования [2].

Во всех вариантах метода, трехдозного варианта метода диффузии в агар и определение антимикробной активности антибиотиков с использованием стандартной кривой, предусмотрено помещение стандартных растворов на одной и той же чашке с раствором испытуемого препарата. Это важная деталь опыта, так как на конечный результат влияет много факторов. Для трехдозного варианта готовятся разведения с одинаковой (по возможности) концентрацией, исходя из предполагаемой активности испытуемого препарата и принятой активности стандартного образца. Пример схемы внесения антибиотиков на чашки Петри для трехдозного варианта представлен на рис. 1. В цилиндры или лунки каждой чашки Петри вносятся равные количества растворов, как правило, в объеме не более 100 мкл. Поэтому у микробиологов, выполняющих такие испытания, необходимо наработать навыки аккуратной и точной работы с чашками Петри при внесении как расплавленной (засеянной и незасеянной) питательной среды на чашки, так и растворов антибиотиков. Разная толщина агара в чашках влияет на чувствительность используемого микроорганизма и на размеры зон угнетения. [4]. При внесении посевной дозы обязательно учитывать оптимальную температуру питательной среды для суспензии спор и для вегетативных клеток [6].

При работе с чашками Петри необходимо соблюдать несколько правил [1, 3, 5, 7]:

- устанавливают чашки на строго горизонтальную поверхность;
- чашки должны быть одного размера;
- в каждую чашку наливают одинаковое количество расплавленной агаровой среды и равномерно распределяют по чашке (горизонтальная поверхность, одинаковый объем среды и ее глубина в чашках уменьшают вариацию зон в разных чашках);
- лунки или цилиндрики (стерильные) устанавливают на поверхность остывшего агара, строго вертикально, на равном расстоянии от центра и края чашки, от центра примерно 2,8 см для чашек диаметром 100 мм, зоны должны быть круглые для равномерной диффузии антибиотика по всему диаметру;
- в лунки или цилиндры помещаются одинаковые объемы испытуемых растворов;
- растворы стандартного образца и испытуемого антибиотика вносятся с наименьшим промежутком времени;
- для уменьшения влияния колебаний во времени между закапыванием растворов, используемых в опыте, рекомендуется выдерживать чашки при комнатной температуре в течение 1–2 ч.

На рисунке 2 представлены фотографии опыта с зонами угнетения правильной округлой формы для измерения размеров зон с требуемой точностью 0,1 мм (корректный опыт) и опыта с нечетко очерченными краями

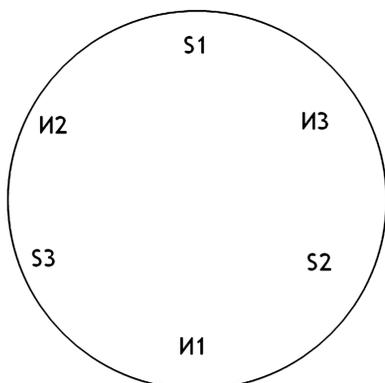


Рис. 1. Схема внесения растворов антибиотика при проведении испытания трехдозным вариантом метода диффузии в агар на чашках Петри. S1, S2, S3 – растворы стандартного образца от S1 (минимальная концентрация) до S3 (максимальная концентрация) в соотношении 1:2. И1, И2, И3 – растворы испытуемого антибиотика от И1 (минимальная концентрация) до И3 (максимальная концентрация) в соотношении 1:2

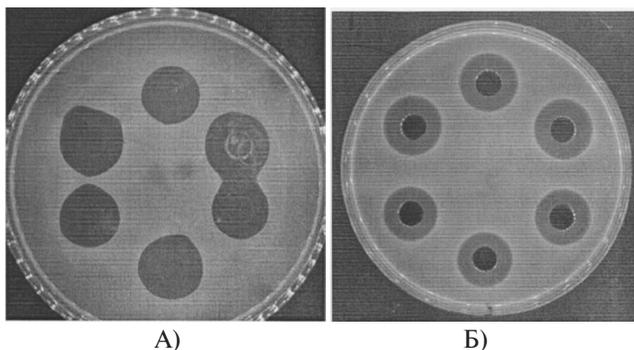


Рис. 2. Образцы чашек Петри с сформированными зонами угнетения роста тест-микробов после внесения на засеянную агаризованную питательную среду антибиотика. А) некорректный опыт, Б) корректный опыт

неправильной формы, не позволяющий получить достоверный результат [2].

Оптимальными размерами зон угнетения роста тест-микробов принято считать диаметры зон не менее 14 мм для минимальной концентрации и не более 25 мм для максимальной. Для достижения таких результатов помимо всего перечисленного выше необходимо также постоянство температуры в термостате и соблюдение продолжительности инкубации. Уменьшение толщины агара способствует увеличению зон, повышенная толщина среды – к уменьшению зон, альтернативно, размеры зон могут быть увеличены или уменьшены концентрацией стандартного образца и испытуемого антибиотика [3].

Метод диффузии в агар используется для количественного определения содержания активного вещества в лекарственных средствах. Согласно требованиям нормативных документов методика количественного определения должна отвечать параметрам валидации «Точность», «Прецизионность (воспроизводимость и сходимость)», «Специфичность», «Линейность», «Диапазон применения» [8]. Все эти требования применимы к биологическим методам, используемых для установления активности действующих веществ лекарственных средств [9].

Оценка линейности и диапазона применения (аналитическая область методики) позволяет определить область концентраций растворов антибиотика, в которой соблюдается прямо пропорциональная зависимость размера диаметра зон угнетения тест-микробов от логарифма концентрации раствора антибиотика. Необходимо учитывать, что линейная зависимость наблюдается лишь в определенных пределах концентраций антибиотика. В ГФ XII (ОФС 42-0068-07) в таблице 33.2. указана контрольная концентрация раствора стандартного образца конкретного антибиотика, логарифмы концентраций растворов антибиотика в соотношении 1:1,25 от контрольной по два разведения в сторону увеличения и уменьшения определяют область линейной зависимости в указанных фармакопеей условиях проведения анализа. При изменении условий (замена питательных сред или их компонентов) рекомендуется проверить параметр «Линейность»; при этом в качестве средней концентрации использовать контрольную концентрацию раствора стандартного образца, указанную в таблице 33.2. Оценка точности результатов проводится по ширине доверительного интервала [1, 8]. Для полученных значений активности всегда рассчитывают доверительный интервал, обычно выбирая 95% [1, 6, 7]. Расчет антимикробной активности антибиотика и определение границ доверительного интервала при проведении испытания с использованием стандартной кривой подробно описан в соответствующей монографии ГФ XII. Для оценки достоверности и точности результатов, полученных трехдозным вариантом метода диффузии в агар, используют дисперсионный анализ [10].

Сходимость и воспроизводимость (прецизионность) полученных результатов обычно выражают как стандартное отклонение или относительное стандартное отклонение для серии результатов [1, 11]. Для получения достоверных результатов рекомендуется проводить исследование активности антибиотиков не менее 6 по-

вторных испытаний в разные дни (не менее 2 дней) для варианта метода с использованием стандартной кривой [6], поэтому расчет относительного стандартного отклонения является обязательным для оценки сходимости результатов. При строгой стандартизации условий проведения испытания по результатам работы лаборатории антибиотиков ФГБУ «НЦЭСМП» относительное стандартное отклонение, как правило, не превышает 5% независимо от используемого варианта метода.

При оценке достоверности значений активности, полученных трехдозным вариантом метода диффузии в агар, необходимо учитывать, что способ статистической обработки результатов основан на модели параллельных линий.

Условия валидности модели параллельных линий следующие [1, 7, 5]:

- взаимосвязь между логарифмом концентрации антибиотика и размером зон угнетения может быть представлена в виде прямой линии во всем диапазоне исследованных доз (концентраций);

- при анализе прямая линия (график зависимости логарифма дозы от диаметра зон угнетения) для любого испытуемого лекарственного средства параллельна соответствующей прямой линии для стандартного образца;

- число разведений должно быть одинаковым для каждого тестируемого лекарственного средства и стандартного образца;

- отношение двух последовательных доз должно быть всегда постоянным.

Горизонтальное расстояние между линиями представляют собой истинное значение активности испытуемого препарата по отношению к предполагаемой активности.

Для трехдозного варианта, исходя из предполагаемой активности испытуемого препарата и принятой активности стандартного препарата, готовятся разведения с одинаковой (по возможности) активностью. Предпо-

лагаемая активность испытуемого препарата должна быть близка к действительной активности и, чем точнее определена принятая предполагаемая активность испытуемого препарата к принятой активности стандартного препарата, тем ближе одна к одной будут эти линии, поскольку они должны давать одинаковые эффекты при одинаковых дозах [5].

Таким образом, метод диффузии в агар, применяемый для определения активности лекарственных препаратов группы антибиотиков, требует строгой стандартизации условий проведения испытания на все этапах анализа, высокой квалификации сотрудников, выполняющих определение. Это необходимо для минимизации вариабельности между результатами, полученными на разных чашках. Для получения достоверных и воспроизводимых результатов анализ стандартного образца и испытуемого антибиотика должен выполняться в одно и то же время при идентичных условиях. Если отсутствует информации о предполагаемой активности испытуемого антибиотика или изменяются условия проведения испытания, выполняется серия предварительных определений в широком диапазоне доз для установления области, в которой зависимость между логарифмом концентрации и размером зон угнетения тест-микроорганизмов является линейной. При соблюдении всех условий метод диффузии в агар обеспечивает высокую чувствительность, точность и воспроизводимость. Для оценки результатов применяются методы математической статистики для расчета границ доверительно интервала, чтобы оценить точность результатов при 95% вероятности и относительного стандартного отклонения для подтверждения сходимости и воспроизводимости полученных значений активности. Для трехдозного варианта метода необходимо проводить оценку результатов с использованием дисперсионного анализа на основе модели параллельных линий.

ЛИТЕРАТУРА

1. United States Pharmacopoeia USP 38-NF33. 2015.
2. Gribbs DL. Antibiotic Potency Assay as Described in USP Chapter (81), Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter. 2008; 14(7): 2–15.
3. Дмитриева ВС, Семенов СМ. Микробиологический контроль антибиотических препаратов. М.: Медицина, 1965.
4. Гров ДС, Рендалл В.А. Руководство по лабораторным методам исследования антибиотиков, М.: Медгиз, 1958.
5. Hewitt W. Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis, 2003.
6. ОФС 42-0068-07 «Определение антимикробной активности антибиотиков». В: Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. Ч. 1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения; 2007.
7. European Pharmacopoeia. 8th ed.
8. Юргель НВ, Младенцев АЛ, Бурдейн АВ, Гельман МА, Малин АА, Косенко ВВ, ред. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. Методические рекомендации. М.; 2007.
9. Шадрин ПВ, Симутенко ЛВ, Батуашвили ТА, Неугодова НП, Лутцева АИ. Алгоритм валидации биологических методик определения гормональной активности лекарственных средств (на примере фолликулостимулирующего гормона). Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения 2011; (2): 15–8.
10. Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности препаратов биологическими методами. В: Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. Ч. 1. М.: Медицина; 1990.
11. Рекомендации по межгосударственной стандартизации «Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа». Методы оценки. РМГ 61-2003. М.; 2010.

REFERENCES

1. United States Pharmacopoeia USP 38-NF33. 2015.
2. Gribbs DL. Antibiotic Potency Assay as Described in USP Chapter (81). Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter 2008; 14(7): 2–15.
3. Dmitriev VS, Semenov SM. The microbiological control of antibiomatic drugs. Moscow: Medicine, 1965 (in Russian).
4. Grove DS, Randall VA. Guidance on laboratory methods of antibiotics research. Moscow: Medgiz, 1958 (in Russian).
5. Hewitt W. Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis, 2003.
6. General monograph 42-0068-07. Determination of the antimicrobial activity of antibiotics. In: The State Pharmacopoeia of Russian Federation. 12th ed. V. 1. Moscow: Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2007 (in Russian).
7. European Pharmacopoeia. 8th ed.
8. Yurgel NV, Mladentsev AL, Burdein AV, Gelman MA, Malin AA, Kosenko VV, eds. Manual validation of methods of analysis of drugs. Guidelines. Moscow; 2007 (in Russian).
9. Shadrin PV, Simutenko LV, Batuashevili TA, Neugodova NP, Lutseva AI. Validation algorithm for the biological methods of evaluating hormonal activity of medicines (follicle-stimulating hormone case study). Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin 2011; (2): 15–8 (in Russian).
10. Statistical analysis of the results of determination of the specific pharmacological activity of drugs by biological methods. In: The State Pharmacopoeia of Russian Federation. 12th ed. V. 1. Moscow: Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2007 (in Russian).
11. Recommendations on Interstate Standardization «Indicators pointness, accuracy, precision methods of quantitative chemical analysis». Methods of assessment RMG 61-2003. Moscow; 2010 (in Russian).

ОБ АВТОРАХ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Кулешова Светлана Ивановна. Начальник лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук.

AUTHORS:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

Kuleshova S.I. Head of Laboratory of antibiotics of Test center of Quality Expertise of Medicines. Candidate of Biological Sciences.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ:

Кулешова Светлана Ивановна; Kuleshova@expmed.ru

Статья поступила 12.08.2015 г.

Принята к печати 25.08.2015 г.