

ФАРМАЦИЯ

УДК 576.8.097.3:615.2

БАКТЕРИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА В ИССЛЕДОВАНИЯХ ОБЩЕЙ СЫВОРОТОЧНОЙ БАКТЕРИЦИДНОСТИ, ЛИЗОЦИМА, β -ЛИЗИНОВ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ К МИКРООРГАНИЗМАМ

© 2003 г. С.Я. Дьячкова

Воронежский государственный университет

В исследованиях *in vitro* установлено, что разработанный модифицированный метод определения бактерицидных свойств в чашках Петри может быть использован как при изучении чувствительности химиопрепаратов к различным микроорганизмам, так и в случаях обнаружения β -лизинов, лизоцима и общей сывороточной бактерицидности. Действенность метода подтверждена несколькими критериями оценки: бактерицидная активность, бактерицидный индекс и показатель эффективности бактерицидных свойств.

Бактерицидными свойствами обладают фармакологические препараты, растительные соки, биологические жидкости, секреты.

Для определения бактерицидных свойств используют различные штаммы микроорганизмов, питательные среды и различные варианты учета этих свойств от визуальных до нефелометрических. При визуальных вариантах учета чаще используют метод серийных разведений исследуемого материала или лекарственного препарата в жидкой питательной среде, которые инкубируют с тест-микробом определенной концентрации с последующим высевом из разведений на плотные питательные среды. Учет при этом проводят по количеству выросших колоний. В упрощенном варианте визуальный учет проводят по степени помутнения жидких сред без посева на плотные. В обоих случаях расходуются значительные количества питательных сред, увеличивается трудоемкость и время исследования.

Нефелометрические варианты учета бактерицидных свойств связаны с микробным загрязнением и последующей обязательной обработкой кювет нефелометра, что выводит их из строя, а также ограничивает использование патогенных тест-микробов.

Учитывая недостатки вышеуказанных методов, был разработан модифицированный вариант.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены *in vitro* на пластинчатом агаре в чашках Петри. Использовали мясо-пептонный агар и различные Грамм (+) и Грамм (-) микроорганизмы кокковой, палочковидной морфологии, относящиеся к патогенной либо условно-патогенной флоре. Тест-

микроб определенной концентрации (оптимальная – 2000-4000 микр.тел/мл) в количестве 0,05 мл засеяли на пластинчатый агар в чашки Петри сплошным методом посредством шпателя. После инкубации в термостате при 37 °С в течение 1 часа на поверхности засеянного агара специальным металлическим штампом ($d = 1,8-2,0$ см) отграничивали несколько площадей. Центральная площадь служила контролем роста тест-микроба, в остальные капали по 0,05 мл исследуемого материала в заданных разведениях. Чашки помещали в термостат при 37 °С на 18-20 часов, после чего подсчитывали колонии в контроле и в опытных разведениях. Для учета результатов использовали различные показатели:

$$1. \text{БА} = \frac{K - \text{Он}}{K} \times 100\% \quad 2. \text{БИ} = \frac{K}{\text{Он}} \quad 3. \text{ПЭБС} = \text{БИ} \times \text{Р},$$

где БА – бактерицидная активность; БИ – бактерицидный индекс; ПЭБС – показатель эффективности бактерицидных свойств; К – количество колоний, выросших на контрольной площади пластинчатого агара; Он – количество колоний, выросших на опытных площадях пластинчатого агара; Р – число максимального разведения исследуемого разведения исследуемого материала (образца) с положительными бактерицидным эффектом ($\text{БИ} > 1,05$).

Исследования дублировались. В таблицах представлены средние результаты.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Впервые метод был апробирован для определения бактерицидных свойств химиопрепаратов в отношении некоторых патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [1,2]. Так, была обнаружена анти-

Таблица 1

Бактерицидные свойства местно-анестезирующих средств

Исследуемые препараты	St. aureus 209		St. aureus 1726		E. coli K-12	
	БИ	БА (%)	БИ	БА (%)	БИ	БА (%)
Дикаин — 0,5%	1,3	22,5	1,2	11,3	1,4	29
Этафон — 0,5%	2,1	51,6	2,2	54,4	1,3	23
Альбуцид — 7,5%	1,2	17,3	1,4	28,8	1,5	33,3

Таблица 2

Бактерицидная активность антибиотиков и их полимераналогов

Исследуемые препараты	Разведение	St.209	St.1726	E.coli	Ps.aerug.
		БА	БА	БА	БА
Канамицин	1:100	22%	2,5%	46%	31%
Полимераналог канамицина	1:100	21,6%	15%	4,2%	41%
Стрептомицин	1:20	68%	68%	0%	39%
Полимераналог стрептомицина	1:20	1,6%	53%	0%	63%

Таблица 3

БАС артериальной крови у здоровых крыс (n=8)

Штаммы микроорганизмов	БИ	ПЭБС
	M+m	
Staph. aureus 209	1,67+0,09	3,9+0,42
Staph aureus 1726	1,64+0,21	2,93+0,44
E. coli K-12	2,31+0,21	3,84+0,32
Salm. enteritidis	1,87+0,15	3,33+0,42
Salm. ch. suis	2,60+0,22	2,84+0,33

септическая активность фармакологических препаратов местно-анестезирующего действия (Табл. 1).

Выявлено, что этафон в 0,5 % – ном растворе обладал наибольшей в сравнении с дикаином и альбуцидом бактерицидностью по отношению к кокковой флоре.

Далее исследовали антибактериальные свойства полимерных форм канамицина и стрептомицина [5]. Было установлено, что полимераналоги, содержащие всего лишь 33-56 % активного антибиотика, обладали бактерицидной активностью, в основном, пропорциональной концентрации иммобилизованных антибиотиков (Табл. 2).

В этих исследованиях для учета использовали показатели БИ и БА, которые оказались достаточно информативными.

Следующим этапом в изучении действенности метода было определение бактерицидной активности сыворотки крови (БАС) у животных к ряду пато-

генных микроорганизмов [3,4]. При этом, для учета использовали показатели: БИ и ПЭБС (Табл. 3).

Было показано, что критерии БИ и ПЭБС позволяют характеризовать различные стороны бактерицидных свойств сыворотки. Так, если БИ свидетельствовал об антисептических свойствах нативной сыворотки к конкретным микроорганизмам, то ПЭБС, являясь количественным выражением качественных свойств, отражал способность сыворотки работать в разведении. Было выявлено, что разведенная до 1 : 8 сыворотка крови сохраняет наибольшую бактерицидную активность к патогенным штаммам Staph.aur.209, Salm.enteritidis и к условно – патогенному – E. coli K 12.

Принимая во внимание тот факт, что лизоцим и В-лизины сыворотки крови исследуются по отношению к микроорганизмам: соответственно Micrococcus lysodeicticus и Bacillus subtilis, предложенный вариант метода в дальнейшем адаптировали для опреде-

Таблица 4

Лизоцим и В-лизины в нативной артериальной крови здоровых животных

Показатели	К-во животных	БИ (усл.ед.) M+m	ПЭБС
Лизоцим	8	2,13+0,18	4,86
В-лизины	8	1,44+0,11	3,15

ления этих гуморальных факторов естественной защиты организма. Было показано (Табл. 4), что метод можно использовать для изучения уровня лизоцима и В-лизинов, а критерии БИ и ПЭБС достаточно четко характеризуют эти факторы.

Таким образом, после значительного количества проведенных исследований можно рекомендовать данный метод для всех определений бактериальной чувствительности опытных образцов (сыворотка крови, биологические секреты, химиопрепараты) к различным микроорганизмам. В случае малых разведений исходных образцов (до 1:20) для учета результатов можно использовать критерий ПЭБС; при больших разведениях (более 1:100) целесообразно пользоваться показателями БИ или БА.

ВЫВОДЫ

1. Определение бактерицидных свойств химиопрепаратов и биологических субстратов можно производить на пластинчатом агаре в чашках Петри.

2. Для количественной оценки бактерицидных свойств исследуемых образцов целесообразно использовать критерии БА, БИ и ПЭБС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дьячкова С.Я., Лоншакова А.А. – Чашечный способ количественной оценки бактерицидных свойств химиотерапевтических препаратов. – ЦНТИ, информационный листок, серия Р 34.45.05 № 262-95. – Воронеж, 1995 .

2. Дьячкова С.Я., Никитский А.С., Николаевский В.А., Никитская Н.С. – К вопросу об антисептической активности производных пропафенона. – Тез. докл. VII Всерос. нац. конгресса «Человек и лекарство», М., 2000.- с. 212.

3. Савилов П.Н., Дьячкова С.Я., Сливкин А.И., Кузьмина Н.И., Яковлев В.Н. – Неспецифические факторы защиты после резекции печени в эксперименте. – Аллергология и иммунология., М., 2001. – Т. – № 2.- с.162-163.

4. Савилов П.Н., Дьячкова С.Я., Кузьмина Н.И. – Материалы по изучению антимикробной функции печени здорового организма. – Вестник ВГУ. Проблемы химии и биологии. – Воронеж.-2002.- № 1.- с.41-43.

5. Сливкин А.И., Дьячкова С.Я., Сироткина Г.Г., Лапенко В.Л. – Синтез и изучение бактерицидной активности полимерных форм канамицина и стрептомицина. – Тез. докл. VIII Рос. нац. конгресса «Человек и лекарство». – М., 2001. – с.621.