Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков

Методические указания
МУК 4.2.2602—10

Издание официальное

Москва • 2010

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков

Методические указания
МУК 4.2.2602—10

ББК 35.66
С34

С34 **Система** предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—60 с.

ISBN 978—5—7508—0945—5

1. Разработаны ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора (Н. В. Медуницын, А. А. Мовсесянц, Р. П. Чупринина, И. Г. Осипова, В. Ф. Евлашкина, А. В. Ладыгина, Н. В. Терёшкина, М. В. Абрамцева).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 03.12.09 № 3).

3. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 21 апреля 2010 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 35.66

Редакторы Н. В. Кожока, Е. В. Николаева
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 01.10.10

Формат 60x88/16 Печ. л. 3,75

Тираж 200 экз. Заказ 75

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2010
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

Содержание

1. Область применения 5
2. Требования к отбору производственных штаммов и доклиническому испытанию лекарственной формы пробиотиков 6
3. Требования к характеристике предлагаемых производственных штаммов 9
4. Методы исследования биологических свойств предлагаемых штаммов 10
4.1. Идентификация штамма до вида по фено- и генотипическим признакам 10
4.2. Изучение морфологии и тинкториальных свойств культур 11
4.3. Изучение культуральных свойств штамма 12
4.4. Изучение физиолого-биохимических свойств штамма 13
4.5. Адгезивная активность 22
4.6. Определение чувствительности культур к антибиотикам 25
4.7. Тест на активность кислотообразования штамма 26
4.8. Определение антагонистической активности исследуемых штаммов 27
4.9. Определение продукции бактериоцинов и чувствительности бактерий к его действию 29
4.10. Определение устойчивости штамма к действию желудочного сока 30
4.11. Тест на устойчивость штамма к щелочной реакции среды 30
4.12. Тест на устойчивость штамма к повышенным концентрациям соли 30
4.13. Выявление штаммов-антагонистов (при конструировании комплексных препаратов) 31
4.14. Определение наличия фагов 32
5. Определения вирулентности, токсигенности, токсичности, безвредности 32
5.1. Экспериментальные животные 32
5.2. Определение вирулентности испытуемых штаммов 33
5.3. Определение токсигенности испытуемых штаммов 34
5.4. Определение токсичности испытуемых штаммов 34
5.5. Определение безвредности испытуемых штаммов 35
5.6. Определение дермонекротических свойств испытуемых штаммов 35
6. Изучение «острой» и «хронической» токсичности штаммов и лекарственной формы пробиотиков 36
6.1. Экспериментальные животные 36
6.2. Изучение «острой» токсичности 36
6.3. Определение «хронической» токсичности 37
6.4. Патоморфологическое исследование 39
6.5. Фиксация и промывка материала 39
6.6. Методика окраски срезов 40

6.7. Содержание отчета об исследовании «острой» и «хронической» токсичности 43
7. Способы введения культуры штаммов животным 44
7.1. Внутривенный способ введения 44
7.2. Внутрибрюшинный способ введения 44
7.3. Пероральное введение 44
7.4. Подкожный способ введения 45
7.5. Внутрикожный способ введения 45
8. Хранение рекомендованных к производству штаммов 46
Приложение 1. Способы окраски мазков 47
Приложение 2. Рецепты приготовления красок и реактивов, необходимых для окрашивания бактериальных препаратов 50
Приложение 3. Состав питательных сред 54
Литература 60

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
21 апреля 2010 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков

Методические указания МУК 4.2.2602—10

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания (МУК) устанавливают требования к штаммам, используемым при производстве пробиотиков, и методам предрегистрационного доклинического изучения их биологических свойств, условиям сохранения и контроля основных показателей качества предлагаемых производственных штаммов, оценке безопасности штаммов и пробиотиков.

1.2. Соблюдение настоящих методических указаний обязательно для всех предприятий и организаций, осуществляющих разработку или производственный выпуск пробиотиков.

1.3. Новые штаммы, используемые при производстве пробиотиков, апробирует Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича» Роспотребнадзора (ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора).

1.4. ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора хранит коллекцию производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков. Изученные штаммы должны поступать в ФГУН ГИСК

им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора с соответствующей характеристикой.

1.5. Методические указания также предназначены для специалистов органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор за качеством продукции, выпускаемой соответствующими предприятиями.

2. Требования к отбору производственных штаммов и доклиническому испытанию лекарственной формы пробиотиков

К штаммам, на основе которых разрабатываются живые биопрепараты – пробиотики, предъявляются следующие требования:

2.1. Должен быть известен источник и дата выделения штамма. Для изготовления пробиотиков целесообразно использовать штаммы, выделенные от здорового человека. Предпочтение должно быть отдано видам микроорганизмов, которые являются представителями нормальной микрофлоры человека. Штамм должен быть депонирован в национальной или международной коллекции.

2.2. Штаммы должны относиться к виду, не вызывающему заболевания у людей.

2.3. Культура выделенного штамма должна быть однородной по культуральным и биохимическим свойствам, не диссоциировать на используемых питательных средах.

2.4. Выделенные штаммы должны быть идентифицированы до вида по фено- и генотипическим признакам; генетическая характеристика штамма должна иметь сведения по содержанию (отсутствию) внехромосомных факторов наследственности – плазмид, транспозонов, бактериофагов. При характеристике микроорганизмов следует использовать генетические и фенотипические методы, позволяющие сравнивать последовательности генов с музейными штаммами национальных или международных коллекций и выявлять их молекулярно-генетический полиморфизм.

2.5. Должна быть установлена природа резистентности штамма к антибиотикам, если такой факт выявлен. Для производства пробиотиков следует использовать штаммы, резистентность к антибиотикам которых обусловлена хромосомной природой.

2.6. Для генетически модифицированных штаммов должно быть установлено отсутствие неконтролируемого переноса клонируемой ДНК

«новым хозяевам», широкого распространения гибридной векторной плазмиды и вероятного нарушения микробной экосистемы, т. е. их биобезопасность. Кроме того, согласно требованиям ВОЗ штамм, используемый в качестве вектора, должен стабильно экспрессировать чужеродные антигены и не иметь маркеров антибиотикорезистетности. Должны быть представлены фактические материалы по стабильности изученных биологических свойств для рекомбинантных штаммов при многократном культивировании и длительном применении их на лабораторных животных.

2.7. Штаммы всех видов микроорганизмов, предлагаемые для производства пробиотиков, должны быть не вирулентными, не токсигенными, не токсичными, безопасными для людей, включая при необходимости иммунологическую безопасность.

2.8. Обоснование выбора штаммов должно быть подтверждено материалами исследования на лабораторных животных механизма их терапевтического действия.

2.9. Штаммы должны обладать антагонистическими свойствами по отношению к клиническим и тест-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, не должны угнетать рост представителей нормофлоры.

2.10. Штаммы должны быть охарактеризованы по способности продуцировать полезные для человека биологически активные вещества (например ферменты, витамины, биологически активные вещества, бактериоцины, бактериостатины, кислоты и др.).

2.11. Предлагаемые производственные штаммы должны быть изучены на устойчивость к действию желудочного сока, щелочи, желчи.

2.12. Рекомендуемые для производства штаммы должны удовлетворять технологическим требованиям:

• сохранять выработку полезных биологически активных веществ при «*n*» количестве пассажей штамма на используемых в производстве питательных средах;

• при разработанной технологии изготовления пробиотиков должно быть стандартное получение жизнеспособной биомассы до и после лиофильного высушивания или экспрессия заданных (встроенных) антигенов;

• сохранять стандартность и стабильность всех показателей качества на протяжении срока годности.

2.13. При разработке комплексных препаратов, включающих разные виды микроорганизмов или несколько штаммов одного вида:

• должен быть обоснован подбор штаммов для комплексного препарата (например подобранные штаммы отличаются друг от друга по ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам);

• все входящие в состав препарата ингредиенты, в т. ч. количественное соотношение производственных штаммов, должны быть лимитированы и колебаться в достаточно ограниченных пределах;

• при количественной оценке специфической активности – показателя количественного содержания живых бактерий, входящих в состав препарата, каждый вид микроорганизмов должен быть четко идентифицирован по морфологическим и культуральным свойствам.

2.14. Заключение о возможности испытания усовершенствованного или нового препарата на людях должно основываться на результатах доклинического изучения его токсичности, безвредности, а также сопоставления соотношения терапевтической и безопасной дозы с учетом пути введения разовой дозы для человека и схемы назначения человеку.

2.15. В случае включения в состав готового препарата дополнительных компонентов или вспомогательных веществ (сорбентов, наполнителей и др.) на них следует представить материалы, свидетельствующие о возможности (безопасности) их введения человеку, и изучена безопасность готовой формы препарата в опытах на животных.

2.16. Для определения терапевтической активности следует использовать лабораторные модели, позволяющие получать данные, коррелирующие в определенной степени с результатами применения препарата у людей.

2.17. «Острую» и «хроническую» токсичность предлагаемых штаммов (каждого в отдельности, а для комплексного препарата дополнительно и смеси штаммов) следует изучать на двух видах животных с применением разных доз и способов введения (внутривенное, внутрибрюшинное, пероральное и др.) в зависимости от способа введения препарата.

2.18. При испытании «острой» и «хронической» токсичности штаммов и лекарственной формы препарата определяют их побочное действие на внутренние органы лабораторных животных путем макроскопического и микроскопического исследования внутренних органов. При получении результатов, свидетельствующих о безопасности предполагаемых производственных штаммов, переходят на изучение терапевтической активности и безвредности лекарственной формы препарата.

2.19. В готовой форме препарата оценивают соотношение терапевтической и безопасной дозы, подтверждают механизм действия, сохранение продукции биологически активных веществ, живых микробных клеток на протяжении срока годности препарата.

3. Требования к характеристике предлагаемых производственных штаммов

3.1. Источником выделения штамма должен быть здоровый человек.

3.2. Предлагаемый штамм должен быть идентифицирован до вида по фено- и генотипическим признакам, по профилю плазмидной ДНК. Штамм, имеющий плазмиды, транспозоны, бактериофаги, не может быть использован при производстве пробиотиков.

3.3. Предлагаемый штамм не должен подвергаться генно-инженерным модификациям.

3.4. Штамм, независимо от вида и рода, должен обладать однородными морфологическими, тинкториальными, культуральными свойствами без признаков диссоциации. Штамм с неясной характеристикой не должен быть рекомендован для производственных целей. Не допускается наличие слизистых колоний и капсул.

3.5. Штамм должен быть однороден по физиолого-биохимическим свойствам, охарактеризованным с помощью регламентированных методов или с использованием зарегистрированных тест-систем. Штаммы с неясной характеристикой не могут быть рекомендованы в качестве производственных.

3.6. Штамм не должен продуцировать ферменты, относящиеся к факторам патогенности: каталазу, гиалуронидазу, фибринолизин, гемолизин, летициназу С.

3.7. Устойчивость штамма к антибиотикам должна быть обусловлена хромосомной природой.

3.8. Штамм должен быть охарактеризован по способности продуцировать биологически активные вещества (например лизоцим, бактериоцины, антибиотикоподобные вещества и др.).

3.9. Штамм должен обладать антагонистической активностью по отношению к клиническим свежевыделенным патогенным и условно-патогенным бактериям и к регламентируемым тест-штаммам. Зона угнетения роста тест-культур должна быть более 10 мм.

3.10. Штамм не должен обладать высокими адгезивными свойствами.

3.11. Штамм не должен быть вирулентным, токсигенным, токсичным.

3.12. Предполагаемый штамм не должен угнетать рост представителей нормофлоры: зона угнетения роста должна быть менее 10 мм.

4. Методы исследования биологических свойств предлагаемых штаммов

4.1. Идентификация штамма до вида по фено- и генотипическим признакам

Дифференциация и идентификация бактерий – определение родовой, видовой и типовой принадлежности микроорганизмов – наиболее ответственный этап микробиологического исследования. Он осуществляется на основании изучения комплекса свойств микроорганизмов: фенотипических и генотипических.

Фенотип – совокупность внешних признаков организма.

Генотип – совокупность генов определенного организма.

Организмы, обладающие одинаковыми генотипами, в разных условиях могут отличаться по фенотипу, т. е. может наблюдаться некоторое разнообразие фенотипов.

Определяется ряд фенотипических признаков: морфологические, тинкториальные, культуральные, специфические ферментативные свойства, антигенные особенности, спектр чувствительности к антибиотикам, фагам и бактериоцинам, а также генотип: определение нуклеотидного состава ДНК и содержание ГЦ-пар в ДНК, уровень гомологии ДНК, профиль плазмидной ДНК, электрофоретип, степень вирулентности, патогенности.

Классически идентификацию штаммов по генотипическим признакам проводят на основе данных ДНК-ДНК гибридизации и содержания Г + Ц пар оснований ДНК. В настоящее время приемлемым способом является ПЦР-анализ с видо- и типоспецифическими праймерами для генов 16SpPHK, выявляющих нуклеотидные консервативные последовательности исследуемых микроорганизмов.

Для дифференцирования патогенных и апатогенных штаммов внутри вида информативным является обнаружение в составе ДНК бактериальной клетки геномных «островков» патогенности. Повышенная их лабильность связана с тем, что они могут входить в состав транспозонов, плазмид и включаться в геном бактериофагов, формируя у разных непатогенных видов бактерий вирулентность.

Исследования должны быть выполнены в аккредитованной лаборатории с использованием современного оборудования и технологий.

4.2. Изучение морфологии и тинкториальных свойств культур

4.2.1. Микроскопия живых бактерий

Живые микробы исследуют в препаратах, приготовленных методом «раздавленной» и «висячей» капли.

Приготовление препарата «раздавленной» капли используют для выявления активной подвижности микробов. На предметное стекло наносят каплю 16—24-часовой бульонной культуры. При обильном росте микробов культуру предварительно разводят стерильным 0,9 %-м раствором натрия хлорида, т. к. наличие большого количества микробных тел в поле зрения затрудняет наблюдение за отдельными бактериями и их подвижностью. Нанесенную на предметное стекло каплю «раздавливают», накладывая на нее покровное стекло. При «раздавливании» капли нужно избегать образования в ней пузырьков воздуха. Для этого покровное стекло накладывают не сверху, а ставят на ребро у края капли и опускают постепенно, вытесняя воздух, находящийся между предметным и покровным стеклами. Если часть жидкости выходит за края покровного стекла, ее отсасывают фильтровальной бумагой, зажатой браншами пинцета, и затем бумагу с культурой помещают в сосуд с дезинфицирующим раствором. Препарат «раздавленной» капли, предназначенной для выявления подвижности микробов, рассматривают под микроскопом с увеличением (объектив ×40 или ×50, окуляр ×10 или ×15, при опущенном конденсоре).

При приготовлении «висячей» капли на середину обезжиренного покровного стекла наносят небольшую с четкими краями каплю бульонной культуры. После этого покровное стекло переворачивают каплей вниз и осторожно накладывают на предметное стекло с вышлифованным углублением-лункой так, чтобы капля не касалась дна.

«Висячую» каплю микроскопируют с плоским зеркалом и суженной диафрагмой. При малом увеличении (×8) находят край капли, отчетливо видимый в затемненном поле зрения. Найденный край капли устанавливают в центре поля зрения микроскопа при малом увеличении и, не сдвигая препарата, переходят на более сильное увеличение (×40) или иммерсионную систему, слегка расширив диафрагму микроскопа.

Подвижные бактерии проходят с одинаковой скоростью большие пространства, иногда через все поле зрения микроскопа, вращаясь вокруг своей оси. Неподвижные бактерии постоянно колеблются между двух близлежащих точек. Колебания эти обусловлены броуновским движением.

4.2.2. Исследования бактерий в окрашенном виде

Готовят мазок из микробных культур на обезжиренном предметном стекле, высушивают и фиксируют мазок над пламенем горелки или химическим способом. Под микроскопом изучают мазки, окрашенные по Граму – для выявления грамотрицательных и грамположительных бактерий; по методу Циля-Нильсена – для окрашивания кислотоустойчивых бактерий и выявления спор; по способу Бурри или Гинса – для выявления наличия капсул; по способу Ожешко или Пешкова – для выявления спор; по способу Нейссера – для выявления зерен валютина; по способу Романовского-Гимзе – для изучения структуры протоплазмы и ядра клеток (при необходимости).

Наличие у исследуемых микроорганизмов капсул также выявляют негативным контрастированием, применяя жидкую черную тушь или 10 %-й водный раствор нигрозина. Эти красители не проникают в капсулу и поэтому она хорошо видна на общем темном фоне препарата. Каплю исследуемой суспензии микроорганизмов помещают в каплю разбавленного раствора фуксина, смешивают с каплей туши, закрывают покровным стеклом и просматривают с объективом (×40).

Наличие спор можно обнаружить при изучении живых клеток: споры характеризуются более высоким показателем преломления света, поэтому в светлом поле они видны как более темные включения округлой или овальной формы. При обнаружении спор подготовленный препарат следует изучить с помощью фазово-контрастного устройства.

В отличие от вегетативных форм клеток споры обладают высокой термоустойчивостью и после пастеризации (температура прогрева выше 80 °С) остаются жизнеспособными.

Для идентификации культур следует описать вид спорообразования, расположение спор в клетке и их размеры.

Методы окрасок культур изложены в прилож. 1.

Предлагаемые штаммы не должны иметь капсулы.

4.3. Изучение культуральных свойств штамма

Культуральные свойства характерны для каждого вида бактерий, поэтому являются важным дифференцирующим признаком. Культуральные признаки бактерий определяют характером их роста на плотных, жидких и полужидких селективных и производственных питательных средах. Посев культуры на плотные питательные среды осуществляют методом Дригальского, чтобы получить изолированные колонии.

В паспорте на штамм следует описать размер, форму колоний, характер контура края, рельеф и поверхность колонии, цвет, структуру и

консистенцию колонии. Подробно описать характер роста культуры на жидких и полужидких средах. Рост культуры следует изучить при минимальной, оптимальной и максимальной температуре роста, при выращивании в аэробных, анаэробных или условно анаэробных условиях.

При правильном отборе и селекции штамма не должно быть признаков диссоциации культуры (клеток и колоний) и не допускается присутствие в исследуемых культурах клеток и колоний, отличающихся по морфологическим свойствам от клеток и колоний предлагаемого штамма.

4.4. Изучение физиолого-биохимических свойств штамма

4.4.1. Тест на сахаролитические ферменты

Предназначен для дифференциальной диагностики микроорганизмов. Сахаролитическую активность предлагаемого штамма изучают с помощью зарегистрированных диагностических тест-систем для идентификации бактерий.

Предлагаемый производственный штамм должен полностью соответствовать по этим свойствам типовым штаммам видовой принадлежности согласно современной классификации «Определителя бактерий Берджи». Штаммы с неясной характеристикой не могут быть рекомендованы в качестве производственных.

4.4.2. Протеолитические свойства бактерий

В процессе культивирования микроорганизмы выделяют во внешнюю среду различные протеолитические ферменты, которые можно разделить условно на две группы: в первую группу следует отнести ферменты, принимающие участие в обмене веществ микроорганизмов (дыхании, питании). Они расщепляют углеводы, белки, пептиды, аминокислоты, в результате чего образуются легкоусвояемые микроорганизмами продукты питания и продукты метаболизма – кислоты, перекиси, индол, сероводород и др. Во вторую группу следует включить ферменты, относящиеся к факторам патогенности (например: гиалуронидаза, фибринолизин, плазмокоагулаза, гемолизин, лицитиназа С, лизоцим, нейрамидаза).

Для оценки протеолитических свойств первой и второй групп чаще всего используются нижеприведенные методы.

Ферменты, относящиеся к факторам патогенности

Тест на каталазную активность

Каталазная активность свойственна большинству патогенных аэробных микроорганизмов. Облигатные анаэробы и многие микроаэрофилы каталазу не образуют.

Каталаза разлагает перекись водорода с образованием кислорода:

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$$

Для выявления каталазной активности наносят каплю 10 %-го раствора пероксида на колонию или суспензию клеток. Выделение O_2, хорошо заметное по образованию пузырьков газа, свидетельствует о продукции штаммами каталазы.

Предлагаемый штамм должен быть каталазоотрицательным.

Тест на продукцию лецитиназы

Готовят бульон с яичным желтком: один яичный желток асептически вносят в 400 мл стерильного МПБ, хорошо размешивают, разливают в стерильные пробирки по 4—5 мл и выдерживают в термостате при (37 ± 1) °С в течение 24 ч для проверки на стерильность (среда в пробирках не должна мутнеть).

В пробирку с бульоном вносят 1 петлю суточной культуры с плотной питательной среды и инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 24 ч. По истечении срока инкубации регистрируют наличие беловатой мути и всплывающих хлопьев, свидетельствующих о продукции микроорганизмом лецитиназы.

Предлагаемый штамм не должен продуцировать летициназу.

Определение плазмокоагулазной активности

Плазмокоагулазную активность изучают, используя сухую цитратную кроличью плазму или плазму крови, взятую из сердца. Перед исследованием сухую плазму разводят 1 : 5 стерильным 0,9 %-м раствором хлорида натрия, затем 0,5 мл разведенной плазмы вносят в стерильную пробирку и в ней суспендируют одну петлю 18—20-часовой агаровой культуры. Пробирки помещают в термостат при (37 ± 1) °С и через 1, 2, 3, 18 и 24 ч проверяют наличие свертывания плазмы. Реакция считается положительной независимо от степени свертывания плазмы. В качестве контроля ставят реакцию со стафилококком, обладающим и не обладающим плазмокоагулазой. Одновременно у испытуемого штамма можно установить наличие фибринолитической активности.

Определение фибринолитических свойств

В стерильные пробирки вносят 0,1 мл цитратной плазмы, по 0,4 мл 0,9 %-го хлорида натрия, 0,25 мл 18—20-часовой бульонной культуры испытуемого штамма, 0,25 мл 0,25 %-го раствора $CaCl_2$. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С на 15—20 мин. Если в пробирке образуется сгусток (так же как в контрольной, куда вместо бульонной культуры добавляют питательную среду),

то испытуемая культура не обладает фибринолитическими свойствами. Если отмечается разжижение сгустка через 2 ч – культура характеризуется наличием фибринолизина. При дополнительном выдерживании реакции при (37 ± 1) °С и обнаружении растворения сгустка можно заключить, что культура обладает фибринолитической активностью.

Предлагаемый штамм не должен продуцировать плазмокоагулазу и фибриноцим.

Тест на лизоцим (мурамидазу)

Лизоцимную активность штамма определяют микробиологическим методом, основанном на способности лизоцима расщеплять b-(1-4)-гликозидные связи мукополисахаридного комплекса клеточной стенки эталонного тест-штамма *Micrococcus luteus* (*Micrococcus lysodeikticus*).

Готовят плотную среду, содержащую убитую культуру *Micrococcus luteus* UBCR 2665. Для этого предварительно культуру *Micrococcus luteus* выращивают на чашках Петри, содержащих МПА, в течение 16 ч при температуре (37 ± 1) °С. Выросшую культуру смывают 0,9 %-м раствором натрия хлорида (3 мл на чашку), автоклавируют 15 мин при 120 °С и сохраняют впрок при 4 °С (срок хранения суспензии – не более 1 года). В стерильные чашки вносят расплавленную плотную питательную среду, содержащую автоклавированную суспензию микрококка в концентрации 2 млрд в 1 мл по ОСО 42-28-59-85-П мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Испытуемые штаммы выращивают в жидкой (или плотной) питательной среде, используемой для их культивирования. Культуру 2-го пассажа засевают по одной посевной петле (диаметром 2—3 мм) бляшками на подготовленную подсушенную плотную среду, содержащую убитую культуру микрококка. На одну чашку наносят не более 5 штаммов, посевы инкубируют в течение 2—4 суток при температуре (37 ± 1) °С в аэробных, анаэробных или микроаэрофильных условиях в зависимости от вида испытуемого штамма и регистрируют зону лизиса микрококка вокруг выросших макроколоний испытуемых штаммов.

О степени лизоцимной активности судят по ширине зоны просветления: низкая – 1—3 мм, средняя – 4—7 мм, 8 мм и более – высокая.

Перед экспериментом целесообразно проверить тест-штамм *Micrococcus luteus* на лизируемость лизоцимом. Для этого, используя отраслевой стандарт мутности, готовят микробную взвесь с содержанием в 1 мл 10^9 микр. кл. и разливают ее в 2 пробирки по 1 мл. В одну (опытную) добавляют 8 мкг лизоцима, растворенного в 1 мл физиологического раствора, создавая конечную концентрацию фермента 4 мкг/мл.

Во вторую (контрольную) прибавляют 1 мл 0,9 %-го раствора хлорида натрия. Пробирки выдерживают при комнатной температуре 30 мин. Культура считается пригодной для работы, если за этот период в опытной пробирке произойдет полный лизис клеток микрококка.

Примечание: некоторые виды нормальной микрофлоры (например, *L. fermentum*), при отсутствии других факторов патогенности продуцируют лизоцим, что считается положительным свойством микроорганизма для воздействия на патогенную и условно-патогенную микрофлору.

Тест на гемолизин

Некоторые бактерии продуцируют гемолизины (вещества, разрушающие эритроциты), относящиеся к факторам патогенности. В связи с этим продукция гемолизина во многих случаях является маркером вирулентности.

На кровяном агаре выросшие колонии окружают зоны просветления. Образование гемолизинов (и, соответственно, размеры зон гемолиза) может быть вариабельным, и для адекватного определения гемолитической активности следует просматривать чашки с посевами против источника света. Активность гемолизинов может проявляться в полном или неполном разрушении эритроцитов. Виды гемолиза подразделяют на:

α-гемолиз – разрушение эритроцитов может быть неполным, с сохранением клеточной стромы. Просветление среды вокруг колоний обычно незначительно, позднее среда вокруг колоний может приобретать зеленовато-коричневую окраску;

β-гемолиз – полное разрушение эритроцитов с ферментативным обесцвечиванием гемоглобина. Колонии бактерий окружены прозрачными зонами гемолиза различного размера;

γ-гемолиз – эритроциты остаются без изменения.

Гемолитические свойства микробов проявляются по-разному на средах с дефибринированной кровью человека, барана, кролика, морской свинки.

Проведение теста. В расплавленный и охлажденный до 48—50 °С 1,5 % МПА или в другую питательную среду прибавляют 5 % дефибринированной крови. После розлива среды в чашки Петри тонким слоем (1,5—2 мм) на застывшую и подсушенную поверхность штрихом делают посев 18-часовой культуры для получения изолированных колоний. Чашки инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч, после чего проводят учет результатов.

Для предохранения гемолизинов от разрушения кислородом посев культуры штрихом можно вначале произвести на питательный агар без

крови. Затем на первый слой наслоить 10 мл агара (при 48—50 °С) с 5 % крови. Вокруг погруженных в агар колоний гемолиз проявляется более четко. В некоторых случаях гемолиз лучше выявляется, если после 24—48-часовой инкубации чашек в термостате их помещают на 18—24 ч в холодильник.

При проведении реакции необходимо учитывать возможное воздействие на эритроциты образующихся в процессе жизнедеятельности ряда бактерий органических кислот (молочной, муравьиной, уксусной и др.), которые могут вызывать изменения гемоглобина, сходные с гемолизом, т. е. давать ложноположительную реакцию гемолиза. Поэтому следует представить фактические данные, подтверждающие, что данный штамм не продуцирует гемолизины (отсутствие плазмид или участка гена, кодирующих синтез гемолизина).

Предлагаемые штаммы не должны давать зон гемолиза.

Определение гиалуронидазы

Определение гиалуронидазы устанавливают внутрикожной инъекцией животным смеси исследуемого фильтрата культуральной жидкости с трипановым синим. Сравнением площади распространения красителя, введенного в смеси с фильтратами, и самой краски устанавливают наличие диффузного фактора. Для исключения влияния на распространение краски местного воспаления опыты ставят не только на коже живого кролика, но и снятой (предварительно депилированной) коже. Животным – кроликам или морским свинкам – вводят 0,1 мл испытуемого фильтрата и 0,1 мл 10 %-го раствора трипанового синего. Результаты учитывают по отношению площади распространения краски в опыте и контроле – индекс диффузии.

Предлагаемый штамм не должен продуцировать гиалуронидазу.

Ферменты, участвующие в обмене веществ

Тест на продукцию желатиназы

1. К питательной среде добавляют желатин (из расчета 10—15 г на 100 мл), разливают в пробирки столбиком. Посев испытуемой культуры осуществляют уколом, погружая петлю с культурой вглубь питательной среды. Засеянную культуру инкубируют в термостате при оптимальной для нее температуре в течение 1—2 сут. Вместе с опытными пробирками в термостат ставят две пробирки с незасеянной культурой для контроля. При регистрации результатов учитывают интенсивность роста и форму разжижения желатиновой среды.

2. О продукции желатиназы судят по обесцвечиванию полоски фотопленки, помещенной в пробирку с исследуемой культурой.

Полоски фотопленки размером 25 × 3 мм, освещенной и проявленной, прокладывают кусками фильтровальной бумаги, помещают в чашку Петри и автоклавируют при 110 °С (0,5 атм.) в течение 30 мин.

Исследуемую культуру бактерий засевают в пробирки с МПБ, под пробку пробирки вставляют полоску стерильной фотопленки так, чтобы верхняя часть ее оставалась не погруженной в среду. Посевы инкубируют в термостате при (37 ± 1) °С. Если культура разжижает желатину, погруженная часть пленки становится прозрачной, а черная пыль редуцированного серебра выпадает на дно пробирки. Большинство бактерий, продуцирующих желатиназу, обесцвечивают полоску в течение суток. При отрицательных результатах посевы оставляют в термостате до 7 суток.

Предлагаемый штамм не должен разжижать желатину.

Тест на продукцию протеазы

У некоторых видов патогенных бактерий продукция протеазы является одним из факторов патогенности.

О продукции протеазы судят по образованию прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре, содержащем казеин.

Приготовление агара с казеином. Готовят 2 %-й раствор казеина на 0,1 М трис-HCl буфере (pH 7—8). Раствор подогревают до (55 ± 0,5) °С и смешивают в равных объемах с раствором 2 %-го агара Дифко, охлажденного до той же температуры. Полученный казеиновый агар разливают в условиях стерильности по 10 мл в стерильные чашки Петри.

После застывания агара высевают культуру штрихом и инкубируют в термостате при (37 ± 1) °С в течение 18 ч. По окончании инкубации в чашки наливают 5 мл 5 %-го раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и наблюдают в течение 3 мин за появлением прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре.

Тест на продукцию амилазы

О продукции амилазы судят по образованию прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в картофельном агаре.

Приготовление картофельного агара. Очищенный от кожуры сырой картофель промывают, нарезают ломтиками, заливают водой из расчета 130 г на 1 л воды, кипятят 30 мин, фильтруют и к фильтрату добавляют 20 г агара и 2 г NaCl. Нагревают, помешивая стеклянной палочкой до полного расплавления агара, если необходимо снова фильтруют, разливают в пробирки по 5 мл, укупоривают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве 30 мин при 110 °С (0,5 атм.) в течение 30 мин.

Готовый картофельный агар разливают по 10 мл в стерильные чашки Петри. После застывания агара культуру засевают штрихом, инкуби-

руют в термостате при (37 ± 1) °С в течение 24 ч. Культуру в чашках заливают 5 мл раствора Люголя. Наблюдают в течение 5 мин за появлением светлых зон вокруг посевов.

Тест на продукцию липазы

О продукции липазы судят по образованию прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре, содержащем ТВИН-20.

Готовят 2 %-й агар на 0,06 М фосфатном буфере (pH 7,4—7,6). ТВИН-20 нагревают на водяной бане до (55 ± 5) °С и вносят в расплавленный агар до конечной концентрации 1 %. Быстро перемешивают встряхиванием и добавляют 10 %-й раствор $CaCl_2$ до конечной концентрации 0,1 %. Тщательно перемешивают, разливают в пробирки по 10 мл, укупоривают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют на водяной бане в течение 40 мин. Разливают по 10 мл в стерильные чашки Петри.

Культуру, выращенную на МПБ при (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч, высевают штрихом на агаровую среду с ТВИН-20 и инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 24 ч. По истечению срока инкубации регистрируют появление или отсутствие прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре.

Тест на продукцию аргениндегидрогеназы

Продукцию аргениндегидрогеназы изучают на среде Шеррис. Пробирку со средой Шеррис и контрольную (без аргинина) засевают 18-часовой культурой и заливают стерильным вазелиновым маслом. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 5 дней. О разложении аргинина свидетельствует появление фиолетовой окраски в опытной пробирке.

Для оценки этих свойств чаще всего используют желатин, молоко.

Тест на редукцию нитратов

Редукцию нитратов определяют после роста культуры на бульоне с нитратами в течение 24—72 ч. В каждую пробирку с засеянным нитратным бульоном прибавляют по 1 мл реактива (раствор № 1: 1 г растворимого крахмала, 0,5 г KJ, 100 мл дистиллированной воды; раствор № 2: 10 %-й раствор химически чистой H_2SO_4. Перед постановкой реакции равные части растворов смешивают. Реактив используется в течение 15 мин). Если нитрат восстановлен в нитрит, то наблюдается темно-синее окрашивание. Для этих целей можно использовать реактив Грисса. В присутствии нитратов отмечается розовое окрашивание.

Реакция Фогес-Проскауэра

Реакция Фогес-Проскауэра определяет наличие в среде ацетона. Для постановки реакции Фогес-Проскауэра культуру выращивают на среде Кларка 1—3 суток при температуре (37 ± 1) °С. Затем 1 мл куль-

туральной жидкости переносят в пробирку и добавляют 0,6 мл α-нафтола (5 % раствор в абсолютном спирте) и 0,2 мл 40 %-го раствора КОН и взбалтывают. При положительной реакции через 2—5 мин наблюдается розовое окрашивание. В случае отрицательной реакции розового окрашивания не наблюдается и раствор принимает цвет меди.

Тест на гидролиз мочевины

О способности к гидролизу мочевины судят по покраснению среды, содержащей мочевину.

Готовят бульон с мочевиной: к 100 мл стерильного МПБ (pH 7,0) добавляют 1 г мочевины и 0,2 мл крезолового красного (1,6 %-й спиртовой раствор). Разливают по 2—3 мл в стерильные пробирки, укупоривают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют текучим паром в течение 10 мин.

В пробирку с бульоном, содержащим мочевину, вносят 1 петлю суточной культуры с МПА, инкубируют в термостате при (37 ± 1) °С в течение 20—24 ч. Покраснение среды свидетельствует о наличии фермента уреазы и способности культуры гидролизовать мочевину.

Тест на расщепление тирозина

О разложении тирозина судят по исчезновению кристаллов тирозина вокруг посевов в агаре.

Готовят агар с тирозином: 0,5 г L-тирозина суспендируют в 10 мл дистиллированной воды, помещают в пробирку, укупоривают ватно-марлевой пробкой и автоклавируют при 110 °С (1,5 атм.) в течение 30 мин. Охлажденный до (50 ± 5) °С раствор тирозина в стерильных условиях смешивают с 100 мл расплавленного стерильного МПА и разливают по 10 мл в стерильные чашки Петри.

После застывания агара культуру высевают на чашки штрихом и инкубируют в термостате при (37 ± 1) °С в течение 24 ч. Наблюдают за исчезновением кристаллов тирозина вокруг посевов в агаре.

Тест на утилизацию цитрата

Штамм должен утилизировать цитрат. Об утилизации цитрата судят по наличию роста культуры на среде Козера.

Готовят среду Козера:

NaCl – 5 г, $MgSO_4$ – 0,2 г, $NH_4H_2PO_4$ – 1 г, K_2HPO_4 – 1 г, агар – 20 г, Na лимонно-кислого – 2 г, дистиллированной воды до 1 л. Среду помещают в бутыль вместимостью 3 л, укупоривают ватно-марлевой пробкой, оборачивают пергаментом и стерилизуют при 110 °С (0,5 атм) 30 мин. Разливают по 10 мл в стерильные чашки Петри.

После застывания агара культуру высевают на чашки с агаризованной средой Козера штрихом и инкубируют в термостате при (37 ± 1) °С

в течение 24 ч. По окончании срока инкубации регистрируют наличие роста культуры.

Тест на образование аммиака, индола, сероводорода

Об образовании газов судят по изменению цвета индикаторной бумаги, помещенной под пробку пробирки с исследуемой культурой.

Готовят индикаторную бумагу. Фильтровальную бумагу нарезают на полоски размером 3 × 10 мм и пропитывают индикаторными растворами.

А. Индикаторная бумага на аммиак по методу Крупа: смешивают 2 мл 1 %-го водного раствора фуксина, приготовленного из насыщенного спиртового раствора, с 1 мл 3 %-й серной кислоты. После того как раствор приобретет бурую окраску, им пропитывают фильтровальную бумагу и высушивают. Бумага должна быть бесцветной или слегка желтой. Хранят бумагу в банке с притертой пробкой.

Б. Индикаторная бумага на сероводород: полоски фильтровальной бумаги пропитывают раствором уксуснокислого свинца (в 100 мл дистиллированной воды 20 г уксуснокислого свинца и 1 г двууглекислой соды) и высушивают.

В. Индикаторная бумага на индол по Морелю: полоски фильтровальной бумаги пропитывают насыщенным водным раствором щавелевой кислоты и высушивают.

Готовят пробирки с мясо-пептонным бульоном, приготовленным на переваре Хоттингера, содержащем большое количество свободного триптофана.

В пробирки с МПБ вносят по 1 петле суточной исследуемой культуры, выросшей на чашках с МПА.

Тотчас же после посева приготовленные полоски индикаторной бумаги помещают в пробирку так, чтобы они не касались питательной среды.

Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч. При образовании аммиака индикаторная бумага краснеет, сероводорода – чернеет, при выделении индола бумага приобретает сиреневый или малиновый цвет.

Сквашивающая способность штамма

Односуточную культуру исследуемого штамма засевают в стерильное молоко из расчета 3—5 % посевного материала к объему молока. Пробирки с посевным материалом и со стерильным молоком без культуры (контроль) помещают в термостат и инкубируют при оптимальной температуре в течение 2—3 суток. При регистрации результатов учиты-

вают способность культуры сквашивать молоко, образовывать сгусток и определяют кислотность титрометрическим способом.

Данный метод рекомендован в качестве ориентировочного теста. Ряд штаммов кисло-молочных культур могут не сквашивать молоко с образованием сгустков, но продуцируют вещества, изменяющие кислотность питательной среды. Поэтому следует определять активность кислотообразования, показатель которой выражается в градусах Тернера (°Т), по методу, описанному в разделе 4.7.

4.5. Адгезивная активность

Адгезивная активность – способность бактерий прикрепиться к эпителию кишечника и размножиться прежде, чем клетки слизистого слоя будут обновлены.

Для обеспечения данной функции бактерии синтезируют ряд структур (пили/фимбрии), посредством которых происходит их прикрепление к эпителиальной клетке. Эти структуры называются факторами колонизации или адгезии. Бактерии способны экспрессировать различные типы фимбрий, которые кодируются различными хромосомальными и плазмидными генами. Это генетическое разнообразие позволяет клеткам адаптироваться к изменяющейся окружающей среде и использовать эту возможность по отношению к различным поверхностным структурам хозяина.

Механизм специфической адгезии включает две фазы: обратимую и необратимую. Обратимая фаза может быть обеспечена гидровзаимодействием, электростатическим притяжением, броуновским движением, а также атомными и молекулярными вибрациями. Необратимая специфическая фаза обеспечивается множеством связей типа замок-ключ между комплементарными молекулами на каждой из клеточных поверхностей, как только эти связи сформировались, прикрепление бактерий становится необратимым.

Для постановки методики адгезии используют суточные культуры штаммов. Суточную культуру штамма, выращенную на скошенной адекватной питательной среде, смывают забуференным фосфатным физиологическим раствором (ЗФР) и затем дважды отмывают ЗФР с pH 7,2 центрифугированием (1 500 об./мин – 10 мин). Кроме того, культуры можно выращивать на плотной среде, покрытой целлофаном, при 37 °С в течение 16—18 ч. Готовят суспензию, содержащую 2×10^9 КОЕ/мл (культуры, выращенные на целлофане, доводят до указанной концентрации без отмывания).

4.5.1. Метод определения адгезии микробов к эритроцитам

Эритроциты дважды отмывают от консерванта в ЗФР центрифугированием (1 000 об./мин – 10 мин) и доводят до нужной концентрации 1×10^8 КОЕ/мл.

Подсчет концентрации эритроцитов производят в камере Горяева под световым микроскопом по общепринятой методике.

Затем в пробирку с 0,5 мл взвеси микробов вносят 0,5 мл взвеси эритроцитов, инкубируют 30 мин при температуре (37 ± 1) °С, периодически встряхивая. Потом смесь трехкратно отмывают ЗФР от не прилипших микробов при 600 об./мин по 10 мин.

На предметном стекле готовят мазок, фиксируют смесью Никифорова, окрашивают по Романовскому-Гимзе, при микроскопировании проводят оценку уровня адгезии.

Средний показатель адгезии (СПА) определяют по среднему числу микробов, прилипших к поверхности одного эритроцита, подсчитывая все имеющиеся эритроциты в 5 полях зрения, но не менее 50 эритроцитов.

Степень адгезивности считают нулевой при СПА от 0 до 0,99; низкой – от 1,00 до 1,99; средней – от 2,00 до 3,99 и высокой > 4,00.

Из числа учитываемых эритроцитов подсчитывают процент эритроцитов (К %), имеющих на своих поверхностях прилипшие микробы.

Кроме того, подсчитывают индекс адгезивности микроба (ИАМ) – среднее количество микробных клеток на одном эритроците, участвующем в адгезивном процессе, по формуле:

$$ИАМ = (СПА \cdot 100\ \%) \div К$$

Микроорганизмы считают:

- неадгезивными при ИАМ от 1,00 до 1,75;
- низкоадгезивными – от 1,76 до 2,49;
- среднеадгезивными – от 2,50 до 3,99;
- высокоадгезивными > 4,00.

4.5.2. Метод определения адгезии микробов к эпителиальным клеткам кишечника крыс или мышей

Адгезивность штаммов изучают в системе *in vitro* на эпителиальных клетках тонкой и толстой кишки крыс линии Фишер или любой другой линии или б/п мышей. Крыс или мышей забивают углекислым газом, из кишечника выделяют кусочки размером 5 × 5 мм, тщательно отмывают от слизи и содержимого в ЗФР. Эпителиальные клетки получают из кусков слизистой кишечника на вибраторе модели ВПП.

Клетки дважды отмывают охлажденным ЗФР (pH 7,2) центрифугированием при 800 об./мин по 10 мин. После определения концентрации взвеси клеток с помощью камеры Горяева под световым микроскопом ее доводят до 2×10^6 кл./мл. Готовят суспензию испытуемой культуры концентрацией 2×10^9 КОЕ/мл. На 0,5 мл взвеси эпителиальных клеток наносят 0,5 мл взвеси бактериальной культуры. Клеточно-бактериальную смесь инкубируют в термостате при (37 ± 1) °С в течение 30 мин, периодически встряхивая. Затем смесь трехкратно отмывают ЗФР от неприлипших микробов при 600 об./мин по 10 мин. Все манипуляции осуществляют на холоде. К осадку добавляют 1—2 капли ЗФР и готовят мазки на стекле. Препараты фиксируют 96° спиртом и окрашивают по Романовскому-Гимзе.

Под световым микроскопом подсчитывают среднее количество бактерий, прилипших к 25 энтероцитам или колоноцитам.

При оценке адгезии каждого штамма микроорганизма опыт повторяют не менее 3 раз. Подсчитывают средний показатель адгезии (СПА), число микробов на 1 клетку – микроб/клетка в 10 полях зрения, учитывая результаты всех опытов.

Уровень адгезии отдельных штаммов бактерий условно дифференцирован на четыре степени:

- неадгезивную (СПА = 0);
- слабоадгезивную (СПА = 1—5);
- среднеадгезивную (СПА = 5—10);
- высокоадгезивную (СПА выше 10).

4.5.3. Определение уровня адгезивной активности штаммов пробиотиков на модели эпителиальных клеток влагалища

Забор материала для получения изолированных эпителиальных клеток производят при проведении диагностической гистероскопии и раздельном диагностическом выскабливании стенок шейки матки и цервикального канала при различных неинфекционных заболеваниях тела матки.

В асептических условиях под внутривенной анестезией шейка матки обнажается куско- или ложкообразными зеркалами. После этого производят соскоб эпителия слизистой боковых стенок влагалища.

После забора материал помещают в транспортный контейнер с жидкой питательной средой № 199. Контейнер обкладывается льдом.

Клетки дважды отмывают охлажденным ЗФР (pH 7,2) центрифугированием при 800 об./мин по 10 мин. После определения концентрации

взвеси клеток с помощью камеры Горяева под световым микроскопом, ее разводят до 1,5—2 × 10^6 кл./мл.

Далее готовят суспензию штамма с концентрацией 2 × 10^9 микробных кл./мл, 0,5 мл взвеси эпителиальных клеток смешивают с 0,5 мл взвеси бактериальной культуры.

Клеточно-бактериальную смесь инкубируют в термостате при (37 ± 1) °С в течение 30 мин, периодически встряхивая. Потом смесь трехкратно отмывают ЗФР от неприлипших микробов при 600 об./мин по 10 мин.

Все манипуляции осуществляют на холоде. К осадку добавляют 1—2 капли ЗФР и готовят мазки на стекле. Препараты фиксируют смесью равных частей медицинского эфира и 96° спирта и окрашивают по Романовскому-Гимзе.

Под световым микроскопом подсчитывают среднее количество бактерий, прилипших к 25 эпителиоцитам.

При оценке адгезии каждого штамма опыт повторяют не менее 3 раз. Подсчитывают средний показатель адгезии (СПА), число микробов на 1 клетку – микроб/клетка в 10 полях зрения, учитывая результаты всех опытов.

Степень адгезивности считают:

- неадгезивную (СПА = 0);
- слабоадгезивную (СПА = 1—5);
- среднеадгезивную (СПА = 5—10);
- высокоадгезивную (СПА выше 10).

Штаммы с высокой адгезивной активностью не следует рекомендовать для производства пробиотиков.

4.6. Определение чувствительности культур к антибиотикам

Чувствительность к антибиотикам определяют методами серийного разведения антибиотика в жидкой питательной среде и/или диффузионным в соответствии с утвержденными нормативными документами (МУК 4.2.1890—04). Определяют минимальную подавляющую концентрацию (МПК) для характеристики чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам. За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) принимают концентрацию, подавляющую видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре или на плотной среде. Эта концентрация определяет степень чувствительности штамма к антибиотику.

Исследованию по оценке антибиотикочувствительности подлежат чистые культуры микроорганизмов, принадлежность которых к опреде-

ленному виду подтверждена фено- и генотипическими методами исследования (п. 4.1).

Методы серийных разведений основаны на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность антибактериальных препаратов (АБП) – величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК).

Для определения МПК заданные концентрации АБП вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма, и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии АБП из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК.

Из существующих в настоящее время диффузионных методов наиболее приемлемым для оценки антибиотикочувствительности является Е-тест.

Е-тест представляет собой узкую полоску полимера (0,5 × 6,0 см), на которую нанесен градиент концентраций АБП (от минимальных до максимальных). Подавление роста микроорганизма вокруг полоски Е-теста происходит только в той зоне, где концентрация АБП, диффундирующего из носителя, выше МПК, при этом образуется каплевидная зона ингибиции. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны подавления роста вплотную подходит к носителю. Детальные инструкции по определению чувствительности с использованием Е-тестов прилагаются изготовителем к набору реактивов.

4.7. Тест на активность кислотообразования штамма

Микроорганизмы, относящиеся к представителям молочно-кислых бактерий, в т. ч. бифидобактерии, продуцируют разные кислоты, изменяющие pH окружающей среды (питательных сред *in vitro* или в кишечнике *in vivo*).

Изучаемую культуру смывают 0,9 %-м раствором натрия хлорида и по 2,5 мл полученной взвеси вносят в 25 мл среды Блаурокка или стерильного обезжиренного молока (засев осуществляют в 2 пробирки с каждой средой). Содержимое тщательно перемешивают и инкубируют в течение 48—72 ч при температуре (38 ± 1) °С. После инкубации проводят определение кислотности в каждой пробирке (по 2 параллельные пробы). Каждую пробу в объеме 10 мл титруют раствором натрия гидроксида в концентрации 0,1 моль/л в присутствии индикатора фенол-

фталеина (2—3 капли) до появления стойкого слаборозового окрашивания. Показатель pH контролируется потенциометрически: он должен составлять (8,5 ± 0,1). Кислотность выражают в градусах Тернера (°Т) и вычисляют по формуле:

$$°Т = A \times K \times 10, \text{ где}$$

A – количество миллилитров раствора натрия гидроксида, в концентрации 0,1 моль/л, пошедшее на титрование;

K – поправка к титру раствора натрия гидроксида в концентрации 0,1 моль/л;

°Т – условная величина, выраженная в миллилитрах щелочи, пошедшей на титрование 10 мл исследуемой суспензии.

Пример: на титрование 10 мл суспензии пошло 10,6 мл раствора натрия гидроокиси в концентрации 0,1 моль/л, K = 1,03, тогда

$$°Т = 10,6 \times 1,03 \times 10 = 109,18 °Т$$

Вычисляют средний показатель из двух пробирок (2 параллельные пробы из каждой пробирки) при условии, если показатели активности каждого из них близки.

4.8. Определение антагонистической активности исследуемых штаммов

4.8.1. Тест на антагонистическую активность методом отсроченного антагонизма

Исследования микробного антагонизма проводят для изучения механизма лечебного действия штамма. Вне зависимости от видовой принадлежности штамма антагонистическую активность изучают по отношению к свежевыделенным патогенным и условно патогенным бактериям и к тест-штаммам. Тест-штаммы получают из коллекции патогенных микроорганизмов. Определение антагонистической активности штамма проводят с помощью метода отсроченного антагонизма.

Взвесь испытуемой культуры (не менее 10^7 микробных кл./мл) высевают штрихом по диаметру чашки Петри петлей диаметром (3,5 ± 0,5) мм на подсушенную в течение 24—48 ч агаризованную среду (МПА, МРС-5, Гаузе № 2 и т. п. в зависимости от вида изучаемого штамма). После 24—72 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С в аэробных и/или анаэробных условиях перпендикулярно к выросшей культуре подсевают культуры свежевыделенных штаммов или тест-штаммов. Готовят суспензию суточной культуры бактерий 2—3 пассажа в 0,9 %-м растворе натрия хлорида с МПА в концентрации 5×10^8 кл./мл.

Посев свежевыделенных и тест-штаммов производят петлей шириной 2 мм в направлении, перпендикулярном зоне роста изучаемого штамма, не касаясь его. Чашки закрывают крышкой, помещают в термостат и инкубируют в течение 24 ч при температуре (37 ± 1) °С.

Учет результатов. Через 7 ч (предварительно) и 24 ч инкубации (окончательно) учитывают величину зоны угнетения роста тест-штаммов в мм. Чем больше величина угнетения роста тест-культур, тем выше антагонистическая активность испытуемого штамма, но не меньше 10 мм.

4.8.2. Тест на антагонистическую активность методом совместного культивирования

Культуру исследуемого штамма и тест-штаммов засевают на плотную питательную среду и инкубируют при 37 °С в течение 18 ч (тест-штаммы) и 24—48 ч (испытуемые штаммы). Выросшие культуры смывают 0,9 %-м раствором хлорида натрия и концентрацию микробной взвеси доводят до 10 ед. мутности по ОСО 42-28-59-85-П мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Медленно растущие испытуемые штаммы сеют на питательные среды раньше, чтобы смыв их по времени совпал со смывом тест-штаммов.

В пробирки с 9 мл адекватной питательной среды вносят по 1 мл суспензии каждого тест-штамма (в одну пробирку засевают один тест-штамм). Затем во все пробирки с тест-штаммами вносят культуру исследуемого штамма (опыт) в объеме 0,1 или 0,5 мл. В качестве контроля оставляют пробирки с тест-штаммами без добавления в них исследуемых тест-штаммов. Смешанные культуры инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 24 или 48 ч. Через 24 и 48 ч инкубации из опытных и контрольных пробирок готовят ряд последовательных десятикратных разведений физиологическим раствором. Из разведений 10^{-4} и 10^{-5} или 10^{-5} и 10^{-6} делают высевы по 0,1 мл на чашки Петри с селективной средой, выдерживают 18 ч при (37 ± 1) °С, после чего на каждой чашке подсчитывают число колоний тест-штаммов. Антагонистический показатель вычисляют по формуле:

$$A = \frac{K}{K + T} \times 100\ \%,\ \text{где}$$

K – число колоний испытуемой культуры;

T – число колоний тест-штамма.

Угнетение тест-штамма в смешанной культуре по сравнению с контролем должно быть не менее чем в два раза.

Кратность угнетения роста тест-штаммов испытуемой культурой рассчитывают по формуле:

$$K = \frac{N_K}{N_o}, \text{ где}$$

K – кратность угнетения роста тест-штамма;

N_K – число колоний тест-штамма, выросших в контрольной пробирке;

N_o – число колоний тест-штамма, выросших в опытных пробирках.

Показатель K рассчитывают для испытуемых культур через 24 и 48 ч роста тест-штаммов в контрольных и опытных пробирках для выбора оптимальных условий испытания антагонистической активности в смешанных популяциях.

4.9. Определение продукции бактериоцинов и чувствительности бактерий к его действию

На чашках с 1,5 %-м питательным агаром Difco размечают точки, соответствующие количеству исследуемых штаммов, и помещают 2—5 мкл 12-часовой культуры этих штаммов. Количество чашек должно соответствовать количеству тест-культур + контроль. Чашки инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 4—12 ч. Инициируют продукцию колицина ультрафиолетовым облучением в течение 30 с, затем инкубируют в тех же условиях еще 3—12 ч. После культивирования в течение 48 ч проводят инактивацию культур хлороформом. Убивают бактериальные клетки следующим образом: чашку Петри переворачивают вверх дном, снимают крышку и кладут во внутрь фильтровальную бумагу, смоченную 300 мкл $CHCL_3$. Экспозиция выдерживается около 30 мин, затем заменяют крышки на стерильные, инактивированные посевы проветривают около 15 мин. После этого наслаивают на нижний слой агара 3—5 мл верхнего 0,7 %-го агара, содержащего 10^7 КОЕ/мл тест-штамма. Инкубируют в течение 12—16 ч при (37 ± 1) °С. Регистрируют наличие зон просветления в слое тест-культуры вокруг пятен исследуемых штаммов. Таким способом можно одновременно оценить способность исследуемого штамма продуцировать колицин, а также чувствительность штамма к колицину.

4.10. Определение устойчивости штамма к действию желудочного сока

4.10.1. Способ 1

В пробирку, содержащую 9 мл желчи медицинской консервированной, засевают 1 мл испытуемой культуры с концентрацией 10^8—10^9 оптических единиц мутности. Культуры инкубируют в термостате при температуре 37—38 °С в течение 24—72 ч, в зависимости от вида микроорганизма. Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности, а также контролируют выборочно по микроскопическому препарату.

4.10.2. Способ 2

Исследуемый штамм засевают на целлофане, положенном на адекватную агаризованную среду, с последующим инкубированием при температуре 37 °С в течение 16—18 ч. После чего выросшую культуру смывают забуференным фосфатным натрия хлорида раствором 0,9 % (ЗФР) и доводят концентрацию до 10^9 КОЕ/мл. В пробирку с 1 мл бактериальной взвеси добавляют 9 мл биологической жидкости (желчь медицинская консервированная, желудочный сок «Эквин»), контроль – 9 мл ЗФР, все пробирки выдерживают в термостате при (37 ± 1) °С в течение двух часов, затем определяют количество жизнеспособных клеток методом серийных разведений с последующим высевом на адекватную среду.

4.11. Тест на устойчивость штамма к щелочной реакции среды

В питательную среду, используемую для культивирования штамма, с определенным pH засевают исследуемую культуру (1 петля на 8—10 мл среды).

Посевы выдерживают в термостате при оптимальной температуре в течение 24—48 ч. Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности.

4.12. Тест на устойчивость штамма к повышенным концентрациям соли

В питательную среду, используемую для культивирования штамма, содержащую 2,4 % и 6,5 % NaCl (pH 6,8—7,0), засевают исследуемую культуру (1 петля – 10 мл среды) и выдерживают в термостате при оптимальной для исследуемого штамма температуре в течение 48 ч.

Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности, а также контролируют выборочно по микроскопическому препарату.

4.13. Выявление штаммов-антагонистов (при конструировании комплексных препаратов)

4.13.1. Тест на совместимость штаммов

Совместимость штаммов в комплексном препарате определяют по антагонистическому действию штаммов друг на друга при совместном их культивировании.

1 способ. Моноштаммы, каждый в отдельности, засевают в адекватную для их роста полужидкую питательную среду, при росте в которой формируются четко дифференцируемые по морфологии колонии. По окончании времени культивирования определяют количественное содержание каждого штамма в 1 мл. Затем осуществляют совместное культивирование 2—3 штаммов на полужидкой среде и по истечении времени культивирования оценивают: а) возможность дифференциации испытуемых штаммов по морфологическим признакам; б) количественное содержание каждой выросшей культуры в 1 мл.

2 способ. Моноштамм засевают в полужидкую питательную среду. По окончании времени культивирования культуральную среду освобождают от бактериальных клеток сначала путем центрифугирования в условиях щадящего режима, а затем фильтрации надосадочной жидкости через миллипоры для полного освобождения от бактериальных клеток. Центрифугат культуральной среды используют в нативном виде или в соответствующем разведении для посева в него штаммов (последовательно) комплексного препарата с целью определения влияния продуктов метаболизма на рост испытуемой культуры.

Примечание: для стандартизации условий испытания необходимо:

1) определять мутность взвеси испытуемой культуры по стандарту ОСО 42-28-59-85-П мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича;

2) подтверждать количество жизнеспособных клеток в 1 мл при раздельном культивировании каждого штамма на питательной среде – контроль.

4.13.2. Штаммы антагонисты определяются методом отсроченного антагонизма (п. 5.3.5). Штаммы не должны угнетать рост друг друга.

Величина зоны угнетения роста изучаемых штаммов относительно друг к другу не должна быть более 10 мм.

4.14. Определение наличия фагов

Определение наличия фагов в предлагаемом штамме проводят путем высева взвеси культуры 2-го, 3-го пассажа на соответствующую плотную питательную среду в объеме не более 1 мл (с концентрацией от 10^7—10^9 в мл). Перед посевом чашки Петри с питательной средой подсушивают в термостате для удаления конденсата. Микробную взвесь равномерно распределяют по поверхности среды путем покачивания чашек, чтобы получить сплошной газон. Остатки взвеси отсасывают стерильной пастеровской пипеткой. Затем чашки помещают в термостат при температуре (22 ± 2) °С. Через 19—36 ч учитывают результат посева. На сплошном росте посеянной культуры не должно быть зон фаголизиса.

5. Определения вирулентности, токсигенности, токсичности, безвредности

5.1. Экспериментальные животные

Для токсикологических исследований используют здоровых животных, полученных из сертифицированных питомников. Вирулентность, токсигенность, токсичность (общую, «острую» и «хроническую»), безвредность, дермонекротические и другие свойства определяют не менее чем на двух видах (нелинейных или линейных) или двух линиях одного вида животных в зависимости от изучаемого штамма. Исследования проводят на животных обоего пола. Данные, полученные в опытах на самках и самцах, учитывают отдельно для оценки воспроизводимости результатов испытания.

Для исключения большого разброса в исследуемых показателях следует использовать животных одного возраста. Разброс по исходной массе тела не должен превышать ± 10 %. Рекомендуемая масса тела животных в начале опыта: мыши – от 10 до 14 г; крысы – от 100 до 140 г; морские свинки – от 250 до 350 г; кролики – от 1,5 до 2,5 кг.

Партия животных из питомника должна сопровождаться ветеринарным свидетельством или ветеринарной справкой. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляет не менее 3—4 суток. В течение карантина проводят ежедневный осмотр животных (общее состояние и поведение). В случае гибели в этот период более 10 % поступивших животных испытание токсичности на данной партии исключается.

Клетки с животными помещают в отдельные комнаты. Световой режим: 12 ч – свет, 12 ч – темнота. Температуру воздуха поддерживают в пределах 19—25 °С, относительную влажность – 30—70 %. Содержание экспериментальных животных должно соответствовать действую-

щим санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Рекомендуется давать животным стандартную диету в соответствии с действующими нормами. Для обеспечения водой мелких лабораторных животных целесообразно использовать автопоилки. Кормление следует производить в фиксированное время, т. к. прием пищи может изменить чувствительность животных. Наряду с подопытными животными из этой же партии в аналогичных условиях содержатся контрольные животные.

Формирование групп подопытных и контрольных животных проводят методом случайной выборки (единица выборки – животное).

5.2. Определение вирулентности испытуемых штаммов

Вирулентность – биологическое свойство микроорганизмов, характеризующее степень их патогенности. В отличие от патогенности вирулентность является не видовым, а индивидуальным признаком микроба, который может усиливаться или ослабляться вплоть до полного исчезновения под влиянием различных факторов.

Вирулентность испытуемых штаммов изучают на мышах массой тела от 10 до 14 г. Культуру 2-го пассажа, выращенную на плотной питательной среде, смывают 0,9 %-м раствором натрия хлорида. В полученной суспензии определяют концентрацию микробных клеток по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича соответствующего года изготовления. Из полученной суспензии делают ряд десяти- или пятикратных разведений. Полученную взвесь различной концентрации (дозы) микробов вводят различными способами: внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно, интраназально, перорально, в зависимости от целей и задач исследования. В опыте используют животных одного привоза, по 10 мышей на дозу. Вводимая доза должна содержаться в объеме 0,5 мл. Срок наблюдения должен быть в течение 7—14 суток в зависимости от способа введения испытуемой взвеси. Так, при внутримышечном и подкожном введении смерть животного наступает в более позднее время, чем при внутривенном или внутрибрюшинном способе заражения. Опытных животных маркируют, отсаживают отдельно в клетки, на этикетке каждой клетки указывают дату поступления животных, дату начала опыта, наименование испытуемого штамма, способ введения культуры, вводимую дозу. За животными наблюдают ежедневно, отмечая в протоколе опыта количество живых и павших животных. По истечении срока наблюдения рассчитывают LD_{50}.

LD_{50} – доза микробов, вызывающая гибель 50 % взятых в опыт животных.

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \sigma\ (\Sigma_{Li} - 0{,}5),\ \text{где}$$

D_N – максимальная из испытанных доз;

σ – логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей, т. е. логарифм кратности испытуемых разведений;

L_i – отношение числа животных, погибших от введения данной дозы, к общему числу животных, которым эта доза была введена;

Σ_{Li} – сумма значений, найденных для всех испытанных доз.

В случае если невозможно определить LD_{50} культуры, определяют максимально переносимую дозу, которая может быть использована как стартовая при оценке «острой токсичности».

При отсутствии гибели животных, признаков нарушения здоровья и потери массы тела к концу срока наблюдения при введении максимально переносимой дозы следует сделать заключение, что штамм не обладает вирулентностью.

5.3. Определение токсигенности испытуемых штаммов

Токсигенность микробов изучают по такому же принципу, как и вирулентность для определения максимальной дозы, вызывающей гибель подопытных животных в течение 7—14 суток наблюдения.

Для определения токсигенности культуру испытуемого штамма сеют на жидкую питательную среду, выдерживают в термостате при оптимальной для роста температуре в течение 10 суток для накопления в ней токсина, если он продуцируется штаммом. Затем фильтруют ее через бактериальный фильтр. Получаемый при этом прозрачный фильтрат вводят неразведенным или, если есть необходимость, разведенным в несколько раз, в зависимости от целей и задач исследования. Каждую дозу фильтрата испытывают одновременно на 10 мышах массой тела 10—14 г (на двух разных линиях мышей) при внутрибрюшинном введении или морских свинках массой тела 250—350 г.

При отсутствии гибели животных, признаков нарушения здоровья и потери массы тела к концу срока наблюдения при введении максимально переносимой дозы следует сделать заключение, что штамм не обладает токсигенностью.

5.4. Определение токсичности испытуемых штаммов

Токсичность испытуемых штаммов проверяют на мышах массой тела (15 ± 1) г при внутрибрюшинном введении убитой прогреванием при температуре 100 °С в течение 30 мин взвеси испытуемого штамма (в максимальной концентрации микробных клеток). Прогретую культуру, нативную или в разведении, вводят 10 мышам в объеме 0,5 мл. Определяют LD_{50} или максимально переносимую дозу. Наблюдение за жи-

вотными ведут в течение 7—14 суток. При отсутствии гибели животных, признаков нарушения здоровья и потери массы тела к концу срока наблюдения при введении максимально переносимой дозы следует сделать заключение, что штамм нетоксичен.

5.5. Определение безвредности испытуемых штаммов

Штамм должен быть безвредным для белых мышей при пероральном введении. Испытание проводят на 5 беспородных белых мышах обоего пола массой (15 ± 1) г (взвешивание производят непосредственно перед опытом). Взвесь штамма 2-го или 3-го пассажа в концентрации 10^8, 10^9, 10^{10} микробных клеток в объеме 0,5 мл вводят каждой мыши перорально при помощи насадки на шприц вместимостью 1 мл. Наблюдение за мышами осуществляют в течение 5 суток. В течение этого времени все животные должны быть живы и не терять в массе тела.

В случае гибели за этот срок хотя бы одной мыши или потери в массе тела испытание повторяют на удвоенном количестве животных. При отсутствии гибели животных, признаков нарушения здоровья и потери массы тела к концу срока наблюдения следует сделать заключение, что штамм безвреден.

5.6. Определение дермонекротических свойств испытуемых штаммов

Для этой цели используют белокожих кроликов породы шиншилла массой тела 1,5—2,5 кг или морских свинок массой тела 300—450 г. Разные концентрации микробной взвеси в объеме 0,1—0,2 мл вводят внутрикожно в область спины. При этом используют тонкие (№ 18—20) острые иглы с небольшим скосом. Кожу в месте введения взвеси предварительно освобождают от шерсти, обрабатывают 70° спиртом. В месте введения кожу растягивают пальцами левой руки, правой рукой вводят иглу под острым углом. Конец иглы должен быть виден через эпидермис: при введении материала эпидермис приподнимается в виде четко ограниченного бугорка, кожа над ним становится прозрачной и пористой. Результат учитывают ежедневно в течение 3—4 суток. Отмечают появление припухлости, красноты, наличие некроза. Следует иметь в виду, что вследствие неодинаковой чувствительности животных необходимо использовать не менее двух кроликов или морских свинок. Обязательно при испытании каждому животному следует ввести взвесь штамма бактерий, обладающего дермонекротической активностью (контроль чувствительности животных).

Испытуемые штаммы не должны обладать дермонекротической активностью.

6. Изучение «острой» и «хронической» токсичности штаммов и лекарственной формы пробиотиков

6.1. Экспериментальные животные (раздел 5.1)

6.2. Изучение «острой» токсичности

При изучении «острой» токсичности однократно вводят несколькими способами (внутривенно, внутрибрюшинно, перорально) 3 или 4 разные дозы испытуемых культур штаммов или препаратов для определения LD_{50} или максимально переносимой дозы. Контрольной группе животных тем же способом вводят 0,9 %-й раствор натрия хлорида. Из той же группы оставляют интактных животных (2-я контрольная группа). Внутривенные и внутрибрюшинные введения максимально переносимых доз позволяют выявить органы-мишени для испытуемого пробиотика, характер и степень выраженности морфологических изменений в них. Сравнение параметров токсичности при разных путях введения может дать представление о сходстве или различии в механизмах токсического действия испытуемых штаммов или препаратов и причинах летального исхода у животных.

Таблица 1

Максимально допустимые объемы жидкости для некоторых видов лабораторных животных в зависимости от пути введения, в мл

Вид животных	Масса тела (г)	Путь введения/объём введения, мл				
		в желудок	под кожу	в мышцу	в вену	в брюшную полость
Мышь	10—14	0,5	0,5—1,0	0,5	0,2—0,5	0,5—1,0
Крыса	100—140	3,0	5—10	5,0	2,0	5,0
Морская свинка	250—300	4,0—5,0	15	5,0	5,0—8,0	5,0
Кролик	1 500—2 500	100	30	15,0	20	20,0—30,0

Максимальные объемы должны вводиться мышам в течение 5 с, крысам и морским свинкам – в течение 10 с, кроликам – в течение 20 с.

Общая продолжительность наблюдений за животными должна составлять не менее 7 суток. Ежедневной регистрации подлежат гибель животных, масса тела, а также наличие или отсутствие возможных клинических симптомов интоксикации, в т. ч. нарушение координации движения, наличие судорог, их характер, а также состояние волосяного кожного покрова, окраска слизистых оболочек, положение хвоста. Через 24 ч и 7 суток осуществляют взятие материала от внутренних органов выживших животных, не менее чем по 5 животных соответственно.

Обязательному исследованию подлежат все животные, павшие в течение срока наблюдения. Перед забором внутренних органов осуществляют их визуальный осмотр. Макроскопические изменения каждого органа фиксируют в журнале. Допускается проведение гистологического исследования органов одного вида животных, оказавшегося более чувствительным к токсическому воздействию препарата. Во всех экспериментах, предусматривающих выполнение патоморфологических исследований, используют равное количество контрольных животных (после введения 0,9 %-го хлорида натрия и интактных).

Таблица 2

Схема определения «острой» токсичности производственных штаммов и лекарственной формы препарата

Способ введения	Доза	Кратность введения	Срок опыта (сут.)	Срок забора внутренних органов (сут.)
Внутрибрюшинное и при необходимости внутривенное	Не менее трех доз для вычисления LD_{50} или максимально переносимой дозы в случае невозможности определения LD_{50}	Однократно	7 С ежедневной регистрацией массы тела, признаков интоксикации, гибели животных	1 и 7
Перорально	Максимально переносимая доза	Однократно	7 С ежедневной регистрацией массы тела, признаков интоксикации	1 и 7

6.3. Определение «хронической» токсичности

Общие положения

Целью хронических токсикологических экспериментов является характеристика степени повреждающего действия исследуемых штаммов или препаратов при их длительном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, а также исследование степени обратимости вызываемых ими повреждений.

Продолжительность введения пробиотиков при изучении хронической токсичности зависит от предполагаемой длительности их применения в клинике (табл. 3).

«Хроническую токсичность» определяют не менее чем на двух видах животных (или двух линиях одного вида). Обязательным путем яв-

ляется пероральный способ введения, независимо от лекарственной формы готового препарата.

Препарат вводят не менее чем 20 животным один раз в сутки в дозе, эквивалентной предлагаемой для человека, при пересчете на 1 кг массы. Перерыв в курсе введения не допускается. Наблюдение за животными проводят в течение периода введения препарата и последующих 7 суток. Ежедневной регистрации подлежат гибель животных, масса тела, а также наличие или отсутствие возможных клинических симптомов интоксикации, в т. ч. нарушение координации движения, наличие судорог, их характер, а также состояние волосяного кожного покрова, окраска слизистых оболочек, положение хвоста. Для проведения гистологического исследования на 1 и 7 сутки после последнего введения препарата забивают по 5 животных соответственно. Гистологическому исследованию подвергают также органы всех животных, павших в течение периода наблюдения.

Допускается проведение гистологического исследования органов одного вида или линии животных, оказавшихся более чувствительными к токсическому действию препарата.

Таблица 3

Схема определения «хронической» токсичности производственных штаммов и лекарственной формы препарата

Способ введения	Доза	Кратность введения	Срок опыта (сут.)	Срок забора внутренних органов (сут.)
Перорально	Эквивалент* суточной человеческой дозы	Ежедневно в течение 14 или 30 сут., в зависимости от предполагаемого курса лечения	14 или 30 сут. с ежедневной регистрацией массы тела, признаков интоксикации	15 и 22 31 и 37

* **Примечание**. Суточную дозу, эквивалентную человеческой ($Э_д$) на кг массы тела животного, рассчитывают следующим образом:

$$Э_д = М_ж \times ЧД/М_ч, \text{ где}$$

$М_ж$ – масса тела животного;

$ЧД$ – человеческая доза;

$М_ч$ – масса тела человека (масса тела взрослого человека 70 кг, масса тела ребенка – 10 кг).

Пример расчета: $М_ж = 10$ г; $М_ч = 10$ кг $= 1 \times 10^4$; ЧД $= 1 \times 10^9$

$$Э_д = 10 \times 1 \times 10^9 / 1 \times 10^4 = 1 \times 10^6$$

6.4. Патоморфологическое исследование

Забой животных проводят эфирным наркозом с последующей декапитацией. Вскрытие и осмотр внутренних органов проводят сразу после забоя, обращая внимание на состояние серозных покровов и содержимое полостей. Определяют, сравнивая с контролем, массу, цвет, степень кровенаполнения органов, цвет и вязкость крови, наличие кровоизлияний.

Таблица 4

Органы, подлежащие гистологическому исследованию

Способ введения испытуемого материала	Исследуемые органы
Внутривенный	Головной мозг, печень, легкие, сердце, почки, надпочечники, тимус, лимфатические узлы разной локализации, стенка вены и подкожная клетчатка в месте введения
Внутрибрюшинный	Головной мозг, печень, легкие, сердце, почки, надпочечники, тимус, лимфатические узлы разной локализации
Пероральный	Головной мозг, печень, легкие, сердце, почки, надпочечники, тимус, корень языка, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник, мезентериальные лимфатические узлы

6.5. Фиксация и промывка материала

Таблица 5

	Крепость исходящего спирта, °												
	95	90	85	80	75	70	65	60	55	50	45	40	35
90	6,41												
85	13,33	6,56											
80	20,95	13,79	6,83										
75	29,52	21,89	14,48	7,2									
70	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64								
65	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15							
60	63	53,65	44,48	35,4	26,47	17,58	8,76						
55	77,99	67,87	57,9	48,07	38,42	28,63	16,02	9,47					
50	95,89	84,71	73,99	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	10,35				
45	117,57	105,34	93,3	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	22,9	11,41			
40	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	38,46	25,55	11,7		
35	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	58,31	43,59	27,6	14,4	
30	224,08	206,22	188,57	171,1	153,61	136,04	118,94	101,71	84,54	67,45	50,6	33,4	17,8

Примечание. В приведенной таблице дано количество воды, которое нужно прибавить к 100 $см^3$ исходного спирта желаемой крепости. Например, чтобы получить 70-градусный спирт из 90-градусного, к 100 $см^3$ последнего надо прибавить 31,05 $см^3$ воды.

Фиксацию проводят в 10 %-м растворе нейтрального формалина, для чего 1 часть 40 %-го раствора формальдегида разводят 9 частями воды. Готовят раствор обязательно на водопроводной воде, т. к. дистиллированная вызывает набухание тканей. После промывания кусочки подвергают дальнейшему уплотнению путем обезвоживания в спиртах увеличивающейся концентрации. Спирты нужной крепости готовят заранее по специальной таблице разведения из 90 или 95° этилового спирта (табл. 5).

6.6. Методика окраски срезов

6.6.1. Депарафинирование срезов

Парафиновые срезы перед окрашиванием освобождают от парафина с помощью любого его растворителя – бензола, толуола, ксилола, бензина. Особенно тщательно удаляют парафин перед исследованием ткани в поляризационном микроскопе, т. к. парафин обладает двоякопреломляющим свойством.

Депарафинирование осуществляют по следующей схеме:

Среда	Время
Ксилол 1	10—15 мин, можно в термостате при 37 ° С
Ксилол 2	3—5 мин
Спирт абсолютный 1	1—2 мин
Спирт абсолютный 2	Ополоснуть
Спирт 96° 1	Ополоснуть
Спирт 96° 2	Ополоснуть
Дистиллированная вода	2 смены

После депарафинирования 100—150 препаратов реактивы заменяют. Для окрашивания ядер используется гематоксилин. Наиболее распространенным является гематоксилин Эрлиха. Для его приготовления 2,0 г гематоксилина растворяют в 100 мл 96° спирта и к полученному раствору добавляют 100 мл дистиллированной воды, 100 мл глицерина, 3,0 г калийных квасцов и 10 мл ледяной уксусной кислоты. Все ингредиенты нужно добавлять в указанной последовательности. Полученный раствор необходимо поставить на свету и при доступе воздуха не менее

чем на 15 дней с тем, чтобы гематоксилин успел окислиться в гематеин, который и является красящим веществом. Банку с раствором при этом накрывают бумажным колпачком или сложенной в несколько раз марлей. Для доокрашивания цитоплазмы после окраски ядер гематоксилином чаще всего используется 1 %-й водный раствор эозина.

6.6.2. Методика окрашивания срезов гематоксилин-эозином

Окрашивание срезов гематоксилин-эозином наиболее часто применяется и поэтому должно быть описано более детально. Этим методом можно окрашивать целлоидиновые срезы, депарафинированные, парафиновые или замороженные срезы. Порядок окрашивания срезов гематоксилин-эозином следующий:

1) срезы переносят в дистиллированную воду на 5—10 мин;

2) окрашивают гематоксилином Эрлиха 2—5 мин;

3) промывают в дистиллированной воде 1—2 с;

4) затем промывают в водопроводной воде 3—5 мин;

5) осуществляют контроль под микроскопом;

6) дифференцируют 1 %-м раствором хлористоводородной кислоты в 70°-м спирте 1—2 с;

7) быстро переносят срезы в водопроводную воду на 30 мин при частой смене; в водопроводной воде вишневая окраска ядер сменяется синей;

8) осуществляют контроль под микроскопом; если хроматин и ядрышко видны недостаточно четко, то дифференцировку следует повторить (срезы можно смотреть под большим увеличением, накрыв их покровным стеклом);

9) промывают в дистиллированной воде 5—10 мин;

10) 1 %-й водный раствор эозина 0,5—1,0 мин;

11) промывают в дистиллированной воде (и дифференцируют, т. к. вода смывает эозин); время промывки контролируют по цвету среза;

12) проводят обезвоживание, осветляют в ксилоле, заключают в бальзам.

В спиртах эозин также отмывается, так что проводить срезы по спиртам следует быстро. Время окрашивания в гематоксилине нужно установить на первых 2—3 срезах и затем все срезы данного блока окрашивать одинаково.

При необходимости для уточнения характера выявленных изменений могут быть использованы другие методы окраски (окраска на фибрин, липиды, мукополисахариды и т. д.).

При изучении микропрепаратов обращают внимание на следующие факторы:

1. Нарушение в системе микроциркуляции (перераспределение крови с депонированием ее в паренхиматозных органах, стаз, агрегация эритроцитов в капиллярах и тромбообразование, повышение проницаемости стенок сосудов с развитием геморрагий, плазморрагий, мукоидной, фибриноидной дезорганизации, фибриноидного некроза).

2. Дистрофические и воспалительные изменения во внутренних органах.

3. Состояние бронхиальной системы (признаки бронхоспазма, отек стенок бронхов, десквамация слизистой оболочки, присутствие эритроцитов в просвете бронхов и альвеол) и перибронхиальных лимфатических узлов.

4. Изменения миокарда, эндокарда и перикарда (отек стромы, миоцитолиз, мукоидное набухание миокардиоцитов, воспалительная инфильтрация и продуктивная реакция).

5. Характер и степень выраженности изменений в клубочковом и канальцевом аппарате почек.

6. Характер перестройки в органах иммунитета и кроветворения (тимусе, селезенке, лимфатических узлах, костном мозге).

7. Дистрофические и микроциркуляторные изменения в ЦНС.

Патологические изменения, возникающие у животных после введения высоких доз пробиотиков, дают ценную информацию для характеристики его токсических свойств. Однако эта информация должна быть подвергнута тщательному анализу и полученные результаты следует рассматривать в качестве предупреждения, а не противопоказания для клинических испытаний.

При решении вопроса о возможности передачи препарата на клиническое изучение исследователь должен учесть следующие факторы:

1. Соотношение терапевтической и безопасной дозы (LD_{50} или максимально переносимой дозы).

2. Характер и обратимость выявленной патологии.

Заключение должно содержать суждения исследователей о степени воздействия штамма или препарата на внутренние органы испытуемых животных при исследовании «острой» и «хронической» токсичности для оценки возможных побочных реакций и определения необходимых ограничений при клинических испытаниях.

6.7. Содержание отчета об исследовании «острой» и «хронической» токсичности

Введение (цель и задачи исследования).

Материалы и методы (биологические характеристики производственного штамма и препарата, характеристики животных, условия их содержания, методы формирования групп и отработки доз, способы забоя животных, методы приготовления гистологических препаратов).

Результаты исследований (описание макро- и микроскопических изменений).

Заключение о наличии или отсутствии «острой» и «хронической» токсичности испытуемого штамма или препарата, указываются возможные побочные эффекты и ограничения для проведения клинических испытаний.

Результаты макро- и микроскопического исследования органов животных, получивших исследуемый препарат, препарат сравнения, а также контрольных животных регистрируют в протоколах и заносят в регистрационную карту; документируют микрофотографиями. На основании полученных результатов оформляют заключение о токсических свойствах испытуемого препарата. Указанные материалы вместе с другими формами документации представляют в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора. Гистологические препараты и парафиновые блоки сохраняют до принятия Комитетом МИБП решения по результатам доклинического испытания препарата.

Форма протокола для макроскопического исследования

Сроки опыта	Испытуемый материал	Способ введения испытуемого материала	Вид/линия животных	№№ животных	Описание макроскопических изменений

Форма протокола для микроскопического исследования

Сроки опыта	Испытуемый материал	Способ введения испытуемого материала	Вид/линия животных	№№ животных	Внутренние органы												ЦНС
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	головной мозг

Примечание. 1 – легкие, 2 – печень, 3 – селезенка, 4 – сердце, 5 – почки, 6 – надпочечники, 7 – тимус, 8 – место введения, 9 – желудок, 10 – тонкий кишечник, 11 – толстый кишечник, 12 – регионарные л/у.

7. Способы введения культуры штаммов животным

7.1. Внутривенный способ введения

При внутривенном заражении мышей и крыс пользуются самыми тонкими иглами (лучше всего туберкулиновыми – очень тонкими, короткими, с косым срезом). Непосредственно перед введением материала хвост животного, для того чтобы вызвать гиперемию сосудов, погружают в сосуд с водой, подогретой до 50 °С, смазывают его ксилолом или толуолом. После того как сосуды заметно набухнут, корень хвоста сдавливают пальцами для еще большего набухания вен. При введении иглы в вену шприц держат под острым углом почти параллельно оси хвоста. Иглу поворачивают отверстием наружу. Корень хвоста освобождают от сдавливания. Нахождение иглы в вене определяют легкостью введения материала и отсутствием заметного уплотнения в месте нахождения иглы.

7.2. Внутрибрюшинный способ введения

При внутрибрюшинном способе заражения помощник держит животное вниз головой. В этом положении кишечник смещается в сторону диафрагмы, что в значительной мере уменьшает возможность его повреждения в момент прокола. У животных (за исключением мышей) в нижней трети живота по средней линии делают скальпелем или остроконечными ножницами надсечку кожи величиной 2—3 мм и через нее вводят притупленную иглу, держа шприц перпендикулярно к брюшной стенке. Преодолевая сопротивление, очень осторожно, буравящими движениями иглу продвигают вглубь. Чувство «провала», исчезновение ощущения сопротивления на пути указывает на проникновение иглы в брюшную полость. После этого иглу переводят в вертикальное положение и вводят содержащийся в шприце материал в полость брюшины.

7.3. Пероральное введение

Крыс и мышей фиксируют перед введением суспензии в вертикальном положении: одной рукой помощник держит животное за складку кожи на затылке, около ушей, другой – за корень хвоста.

Материал вводят шприцем, игла которого имеет незначительный изгиб и утолщение на конце в виде оливы. Наличие изгиба допускает введение иглы в пищевод животного. Диаметр иглы для мышей должен быть не более 1 мм, для крыс – 1—1,5 мм, длина соответственно 35—45 и 70—75 мм. Иглу, введенную в рот, продвигают по задней стенке глот-

ки на глубину 1 см у мышей и 2—2,5 см у крыс. На указанной глубине игле придают вертикальное положение. Процесс введения иглы, как правило, затруднений не представляет, конец ее проникает непосредственно в желудок или нижний отдел пищевода. Количество материала, вводимого за один раз в желудок мышей, должно быть от 0,5 до 1,0 мл, взрослым крысам – не более 3,5 мл.

7.4. Подкожный способ введения

Кожу в месте введения материала приподнимают большим и указательным пальцами левой руки. Иглу шприца вкладывают внизу образовавшейся складки. Проколов кожу и пройдя вглубь на несколько миллиметров, иглу от прямой линии отклоняют вправо или влево и затем медленно вводят материал, содержащийся в шприце. Изменение направления иглы под кожей рекомендуется для того, чтобы введенное вещество не выступало через прокол кожи наружу. После введения материала на место укола кладут кусочек ваты, смоченной спиртом или 3—5 %-м раствором хлорамина, после чего иглу быстро вынимают, а вату придерживают еще несколько секунд, чтобы предотвратить вытекание введенного материала.

Наиболее удобным местом для подкожного введения материала у морских свинок и кроликов является область спины или живота несколько ниже подмышечных впадин, у мышей и крыс – область крестца. Мышам вводят не более 1 мл, крысам – 1,0—1,5 мл материала.

7.5. Внутрикожный способ введения

Для проведения опыта используют белокожих кроликов массой 1,5—2 кг. Участок кожи, на котором предполагается инъекция, обрабатывают непосредственно перед операцией: выстригают шерсть, а затем дезинфицируют это место, зафиксировав животное в удобном положении.

У кроликов, морских свинок и крыс шерсть выстригают ножницами с закругленными концами. Чтобы не поранить кожу в месте выстригания волос, ее растягивают большим и указательным пальцами левой руки.

Для полного удаления шерсти пользуются депилятором. После удаления волос участок кожи дезинфицируют, протирая: спиртом, эфиром и спиртом, смешанным в отношении 1 : 1, или в начале 70°-м спиртом, а затем 10 %-ой настойкой йода.

При внутрикожном способе заражения применяют очень тонкие, острые иглы с небольшим скосом. Кожу в месте введения материала

растягивают большим и указательным пальцами левой руки; правой рукой вводят иглу под очень острым углом, почти касаясь кожи. Материал, введенный внутрикожно, приподнимает эпидермис в виде бугорка, кожа над которым делается прозрачной и пористой, вследствие чего ее сравнивают иногда с лимонной корочкой.

8. Хранение рекомендованных к производству штаммов

Апробированный и рекомендованный к производству пробиотиков штамм необходимо задепонировать в национальной коллекции.

Штамм хранят в лиофильно высушенном состоянии. На ампулу высушенного штамма наносят следующие сведения: наименование и номер штамма, дата лиофилизации, порядковый номер лиофилизации, срок годности. Коллекцию производственного штамма хранят в специальном помещении при температуре минус 15—20 °С. Производственный штамм регистрируют в специальном журнале, в который вносят движение производственного штамма и все результаты контроля. За производственный штамм несет ответственность определенный назначенный сотрудник.

Производственный штамм, находящийся в коллекции предприятия, проверяется 1 раз в год по всем показателям, утвержденным в разработанной для него нормативной документации.

При необходимости использования штамма при производстве лекарственной формы препарата готовят производственную серию штамма в количестве, необходимом для выпуска определенного количества серий препарата. Для этого из коллекции штаммов берут 2—3 ампулы полностью отконтролированного штамма и осуществляют его посев на оптимальные для штамма питательные среды. Для высушивания производственной серии штамма используют 2—4-й пассаж. Штамм может быть высушен во флаконах, обеспеченных вакуумной крышкой. На этикетку флакона наносят следующие сведения: наименование штамма, порядковый номер серии, дата лиофилизации, срок годности, номер хранилища или контейнера.

Производственную серию штамма контролируют 2 раза в год по основным показателям качества, указанным в нормативной документации. Результаты контроля фиксируют в специальном журнале и отражают в паспорте штамма.

Приложение 1

Способы окраски мазков

Окраска по методу Грама

1. Фиксированный на огне мазок окрашивают генциан-, метил- или кристаллвиолетом 2 мин (положив на мазок фильтровальную бумагу, пропитанную краской).

2. Наливают раствор Люголя на 2 мин. Мазок приобретает серо-бурую окраску.

3. Сливают раствор Люголя.

4. Для обесцвечивания вносят несколько капель 70°-го спирта на 2 мин; следят, чтобы он равномерно распределился по поверхности всего мазка.

5. Препарат промывают водой.

6. Докрашивают фуксином Пфейффера 2 мин.

7. Бумажку снимают, препарат промывают водой.

8. Промывают водой, высушивают, микроскопируют.

Результат окраски: грамположительные бактерии окрашиваются основной краской в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные бактерии, воспринимая дополнительную окраску, приобретают ярко-малиновый цвет.

Окраска по методу Циля-Нильсена

1. Фиксированный на пламени горелки мазок окрашивают в течение 3—5 мин раствором карболового фуксина Циля или окрашенной фуксином бумажкой с подогреванием до появления паров, но не доводя краситель до кипения.

2. Дают препарату остыть, бумажку снимают, сливают избыток красителя, препарат промывают водой.

3. Окрашенный препарат обесцвечивают 5 %-м раствором серной кислоты в течение 3—5 с или 96°-м этиловым спиртом, содержащим 3 % по объему хлористоводородной кислоты, несколько раз погружая стекло с мазком в стаканчик с солянокислым спиртом.

4. После обесцвечивания остаток кислоты сливают и тщательно промывают препарат водой.

5. Докрашивают дополнительно метиленовым синим Леффлера 3—5 мин.

6. Окрашенный препарат промывают водой, подсушивают и микроскопируют.

При окраске препаратов кислоустойчивые бактерии окрашиваются фуксином в рубиново-красный цвет и не обесцвечиваются кислотой.

Некислотоустойчивые бактерии, а также элементы ткани и лейкоциты под действием кислоты обесцвечиваются и приобретают цвет дополнительного красителя.

Окраска по методу Бурри для выявления капсул

На узкий конец предметного стекла наносят каплю туши в петлю исследуемого материала. Смесь перемешивают тщательно петлей, делают мазок, как мазок из крови, высушивают на воздухе и, не фиксируя, микроскопируют с иммерсионной системой. Фон препарата окрашен в темно-дымчатый цвет, микробные тела и их капсулы не окрашиваются тушью и остаются бесцветными, вследствие чего этот способ получил название негативного.

Окраска по методу Гинса для выявления капсул

1. Приготавливают негативно окрашенный по методу Бурри препарат.
2. Фиксируют любым химическим способом: метиловым спиртом, смесью Никифорова или другими смесями.
3. Промывают водой.
4. Окрашивают карболовым фуксином Циля, разведенным 1 : 3, в течение 3—5 мин.
5. Препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой.

При микроскопировании на темном фоне препарата контрастно выделяются неокрашенные капсулы, внутри которых находятся бактерии ярко-малинового цвета.

Окраска по методу Ожешко – для выявления спор

1. На высушенный нефиксированный препарат (мазок готовится толстым и на краю стекла) наливают несколько капель 0,5 %-го раствора соляной кислоты и подогревают 1—2 мин над пламенем горелки до закипания, после чего остатки кислоты сливают.
2. Остывший препарат промывают водой, подсушивают на воздухе и фиксируют на пламени горелки.
3. Окрашивают карболовым фуксином Циля (фуксин наливают на фильтровальную бумажку) с подогреванием до появления паров.
4. Обесцвечивают 5 %-м раствором серной кислоты в течение нескольких секунд.
5. Промывают водой.
6. Докрашивают синькой Леффлера или 1 %-м водным раствором малахитовой зелени в течение 3—5 мин.

Споры, окрашенные фуксином, имеют рубиново-красный цвет, вегетативные тела микробных клеток при докрашивании синькой Леффлера – синий цвет, при применении малахитовой зелени – зеленый цвет.

Окраска по методу Пешкова – для выявления спор

1. На фиксированный мазок наливают синьку Леффлера и дают краске закипеть. Окрашивание мазка происходит кипящей синькой в течение 20—30 с.

2. Препарат промывают водой.

3. Докрашивают 0,5 %-м водным раствором нейтральрота в течение 30—60 с.

4. Промывают водой и высушивают. Споры, окрашенные синькой Леффлера, имеют голубой цвет, вегетативные тела бактерий – красный цвет.

Окраска по методу Нейссера – для выявления зерен волютина

1. Фиксированный на пламени горелки мазок окрашивают 1—2 мин синькой Нейссера.

2. Синьку сливают, на препарат наносят несколько капель раствора Люголя на 1 мин.

3. Мазок промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой.

4. Докрашивают в течение 2 мин раствором хризоидина или 1—3 мин раствором везувина.

5. Промывают водой, подсушивают и микроскопируют.

Зерна волютина окрашиваются в синий цвет, тела микробных клеток – в светло-коричневый цвет.

Окраска по методу Романовского-Гимза

Краска Романовского-Гимза состоит из смеси азура, эозина и метиленовой сини. Непосредственно перед употреблением к 10 мл дистиллированной воды нейтральной или слабо щелочной реакции (pH 7,0—7,2) прибавляют 10 капель коммерческого красителя Романовского–Гимза. Приготовленный раствор краски тотчас же наливают на фиксированный мазок или, лучше, предметное стекло с окрашиваемым препаратом погружают в стаканчик с краской. Через 1 ч краску сливают, препарат промывают водой и высушивают на воздухе.

Краска Романовского-Гимза, имеющая в растворе сине-фиолетовый цвет, окрашивает протоплазму форменных элементов ткани в голубовато-синий цвет, а ядра клеток, также как и микробные тела, в фиолетово-красный.

Приложение 2

Рецепты приготовления красок и реактивов, необходимых для окрашивания бактериальных препаратов

1. Приготовление насыщенных спиртовых растворов красок

Для приготовления 100 мл спиртового насыщенного раствора берут следующие количества красок:

а) основного фуксина 8—9 г;

б) метиленовой сини 8—9 г;

в) генциан-, кристалл-, метилвиолета 5—10 г.

Порошки красок в количествах, указанных выше, высыпают во флаконы, заливают спиртом и ставят на 18—24 ч в термостат при 37 °С, периодически взбалтывая. В течение указанного времени значительная часть красок растворяется, на дне флакона остается лишь небольшой осадок, свидетельствующий о насыщении раствора.

Насыщенные растворы красок могут храниться долгое время во флаконах из темного стекла.

2. Спирто-водные растворы красок

Спирто-водные растворы готовятся из насыщенных спиртовых растворов в следующих соотношениях:

1. Спирто-водный раствор фуксина: 1 мл насыщенного раствора фуксина на 10 мл дистиллированной воды.

2. Спирто-водный раствор метиленовой сини: 1 мл насыщенного раствора краски на 30 мл дистиллированной воды.

3. Спирто-водный раствор генциан-, метил- или кристаллвиолета: 1 мл насыщенного раствора на 10 мл дистиллированной воды.

3. Карболовый раствор генциан- (метил- или кристалл-) виолета

Метил- (кристалл- или генциан-) виолета	1 г
Карболовой кислоты кристаллической	2 г
Спирта 96°	10 мл
Воды дистиллированной	100 мл

Карболовый раствор метил- (генциан- или кристалл-) виолета готовят аналогично 1-й прописи карболового раствора фуксина Циля или следующим образом: смешивают 10 мл насыщенного спиртового раствора краски со 100 мл 2 % карболовой кислоты; полученную смесь тщательно взбалтывают и фильтруют через бумажный фильтр. Растворы метил- (генциан-, кристалл-) виолета нестойкие, поэтому их приготовление в большом количестве с расчетом на длительное хранение не рекомендуется.

4. Раствор Люголя

Кристаллического йода	1 г
Йодистого калия	2 г
Дистиллированной воды	300 мл

Йодистый калий растворяют в 5—10 мл дистиллированной воды, затем прибавляют кристаллический йод, жидкость сильно взбалтывают до полного растворения йода и после доливают остальное количество воды.

5. Карболовый фуксин Циля

Основного фуксина в порошке	1 г
Карболовой кислоты кристаллической	5 г
Глицерина	0,5 мл
Спирта 96°	10 г
Воды дистиллированной	100 г

Пропись первая. 1 г основного кристаллического фуксина Циля растирают в фарфоровой ступке с 5 г кристаллической карболовой кислоты и несколькими каплями глицерина. Во время растирания небольшими порциями прибавляют спирт. После того как краска хорошо разотрется, доливают при постоянном помешивании 100 мл дистиллированной воды. Раствор краски фильтруют через влажный бумажный фильтр. Фуксин Циля очень стойкий и может храниться долгое время во флаконе с притертой пробкой.

Пропись вторая. К 10 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина доливают 90 мл 5 %-й карболовой кислоты (карболовую кислоту вливают в краску, а не наоборот). Смесь в течение нескольких минут энергично встряхивают, фильтруют через бумажный фильтр и после этого сливают во флакон для хранения.

Разведенный фуксин или спирто-водный раствор Пфейффера К 1 части карболового фуксина Циля приливают 9 частей дистиллированной воды. Раствор очень нестойкий, поэтому его готовят в небольших количествах непосредственно перед употреблением.

6. Метиленовая синь (Леффлера)

Насыщенного спиртового раствора	
Метиленовой сини	30 мл
Дистиллированной воды	100 мл
Едкого калия 1 %	1 мл

Насыщенный раствор метиленовой сини фильтруют через бумажный фильтр, прибавляют к нему едкий калий и разбавляют дистиллированной водой. Приготовленный таким образом раствор краски может храниться во флаконе в течение длительного времени, не изменяя свойств.

7. Водный раствор малахитовой зелени

Малахитовой зелени в порошке 5 г
Дистиллированной воды 100 мл

Указанное количество малахитовой зелени ссыпают во флакон и заливают горячей дистиллированной водой, ставят на сутки в термостат, периодически взбалтывая. На дне флакона остается небольшой осадок, свидетельствующий о насыщении раствора.

8. Нейтральный красный (нейтральрот) водный раствор

Нейтральрота (0,5 %-й раствор) 0,5 г
Нейтральрота (1 %-й раствор) 1 г
Нейтральрота (1,5 %-й раствор) 1,5 г
Дистиллированной воды (кипящей) 100 мл

Водный раствор краски готовят так же, как раствор хризоидина. Порошок краски, количество которой соответствует необходимой концентрации раствора, высыпают на стенки бумажного фильтра, находящегося в воронке, и заливают кипящей дистиллированной водой. При длительном стоянии из раствора краски выпадает осадок в виде микроскопических игольчатых кристаллов. При образовании осадка краску профильтровывают, после чего она вновь становится пригодной к употреблению.

9. Синька Нейссера

Готовят отдельно два основных раствора:
первый раствор:
метиленовой сини 0,1 г
этилового спирта 96° 2 мл
ледяной уксусной кислоты 5 мл
дистиллированной воды 100 мл
второй раствор:
кристаллвиолета 1 г
этилового спирта 96° 10 мл
дистиллированной воды 300 мл

Для окраски зерен волютина непосредственно перед окраской смешивают 2 ч. первого раствора с 1 ч. второго раствора.

10. Водный раствор хризоидина

Хризоидина в порошке 1 г
Дистиллированной воды 150 г

В воронку на бумажный фильтр насыпают отвешенное количество краски, после чего вливают указанное количество кипящей воды.

Везувин или бисмаркбраун (коричневая краска)
Везувина в порошке 2 г
Спирта этилового 96° 60 мл

Дистиллированной воды 40 мл

Перечисленные ингредиенты смешивают, нагревают до кипения на слабом огне и после остывания фильтруют через бумажный фильтр.

11. Приготовление красящих бумажек по Синеву

Для приготовления красящих бумажек пользуются стандартной фильтровальной бумагой, которую предварительно испытывают на пригодность. Для этого отрезают полоску бумаги и погружают в спиртовой раствор краски, затем высушивают на воздухе. Хорошая бумага окрашивается равномерно без пятен. Затем от нее отрезают небольшой кусок и кладут на стекло с несколькими каплями воды. Пригодная для окраски бумага сразу пропитывается водой и через несколько секунд «отдает» краску, вследствие чего вода вокруг становится интенсивно окрашенной в соответствующий цвет. Если этого не происходит, бумага для приготовления красящих бумажек не пригодна.

Техника приготовления красящей бумаги. Краску, предназначенную для пропитывания бумаги, наливают в лоток или глубокую тарелку. Бумагу нарезают в виде полосок шириной 2—2,5 см и длиной 30—50 см. Полоску погружают на несколько секунд в краску так, чтобы смачивались обе ее поверхности. Окрашенные полосы вынимают пинцетом, дают краске стечь и подвешивают на веревке для высушивания. Бумагу сушат на воздухе при комнатной температуре или в термостате при 37—50 °С. Высушенные полоски бумаги разрезают на кусочки размером 2 × 2 см или 2,0 × 4,5 см.

Прописи растворов красок для приготовления бумаги.

1. Кристалл- (генциан- или метил-) виолет для окраски по Граму.

Кристаллвиолета	1 г
Спирта этилового 96°	100 мл
Глицерина	5 мл

2. Фуксин (основной)

Фуксина	2 г
Спирта этилового 96°	100 мл
Глицерина	1 мл

3. Фуксин карболовый Циля

На 100 мл приготовленной краски прибавляют 1—2 мл глицерина

4. Метиленовая синь

Метиленовой сини	1 г
Спирта этилового 96°	100 мл
Глицерина	1 мл

5. Малахитовая зелень

Малахитовой зелени	5 г
Дистиллированной воды горячей	100 мл
Глицерина	5 мл

Приложение 3

Состав питательных сред

1. Модифицированная печеночная среда Блаурокка

В 100 мл печеночной воды последовательно растворяют:

Пептон ферментативный сухой	100,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар микробиологический	0,75 г

Устанавливают pH 7,6—7,8. Кипятят в течение 15 мин, после кипячения добавляют:

Лактозу	5,0 г
L-цистин	0,1 г

pH среды – (6,9 ± 0,1)

Стерилизация: 121 °С 30 мин.

Состав и приготовление печеночной воды:

Печень говяжья	500 г
Вода очищенная	1 000 мл

Кипятят 1 ч, фильтруют.

2. Среда Гаузе № 2, агаризованная

Бульон Хоттингера с содержанием аминного азота 700 мг %	30 мл
Пептон ферментативный сухой	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	10,0 г
Агар микробиологический	30,0 г
Вода очищенная	до 1 л

3. Бульон Хоттингера

Гидролизат Хоттингера из расчета сухого остатка	(24,0 ± 1,0) г
Натрия хлорид	5,0 г
Вода очищенная	до 1 л

4. Мясо-пептонный агар с 0,5 % глюкозы

Вода мясная (1 : 2)	1 000 мл
Пептон ферментативный сухой	10 г
Натрия хлорид	5 г
Глюкоза	5 г

pH среды – 7,2 ± 0,2

Стерилизация: (120 ± 1) °С в течение 30 мин.

5. МРС-5

Марганец серно-кислый	50,0 мг
Магний серно-кислый	200,0 мг
Цистеин соляно-кислый	200,0 мг
Калий фосфорно-кислый двузамещенный 3-водный	2,0 г
Глюкоза	20,0 г
Пептон сухой ферментативный	10,0 г
Дрожжевой аутолизат с содержанием аминного азота (0,15 ± 0,03) %	50,0 мл
Печеночный экстракт	200,0 мл
Гидролизат обезжиренного молока	500,0 мл
Вода дистиллированная	до 1 000 мл
Агар микробиологический	15,0 г

pH (7,0 ± 0,1).

Дрожжевой аутолизат с содержанием аминного азота (0,15 ± 0,03) %:

Дрожжи хлебопекарные	1000,0 г
Вода питьевая	4000,0 мл
Хлороформ	40,0 мл

Стерилизация при температуре 110 °С 20 мин.

Печеночный экстракт с содержанием аминного азота (0,050 ± 0,005) %:

Печень КРС	1,0 кг
Вода очищенная	1,0 л

Стерилизация при температуре 110 °С 20 мин

Гидролизат обезжиренного молока по Богданову:

Молоко коровье пастеризованное, нежирное

pH (6,7 ± 0,1)	1,0 л
Панкреатин	1,0 л
Хлороформ	5,0 мл

Стерилизация при температуре 110 °С 20 мин.

6. Среда Кларка для реакции с метиловым красным (MR) и Фогеса-Проскауэра (VP)

Состав:

Пептон	0,5 г
Гидроортофосфат калия	0,5 г
Глюкоза	0,5 г
Дистиллированная вода	80 мл

Перечисленные ингредиенты размешивают при подогревании в течение 20 мин. Фильтруют через бумажный фильтр, охлаждают до 20 °С и доводят объем до 100 мл дистиллированной водой. Разливают по 5 мл в пробирки и стерилизуют 3 дня в текучепаровом аппарате по 30 мин.

А. Реактив к реакции с метиловым красным

Метиловый красный	0,1
Спирт этиловый	300 мл
Вода дистиллированная	200 мл

Краску растворяют в спирте, затем прибавляют воду. Для испытания реагент добавляют в количестве 5—6 капель.

Б. Реактив к реакции Фогеса-Проскауэра

Реактив 1. Навеска α-нафтола 5 г растворяется в 100 мл 96 %-го этилового спирта.

Реактив 2. Навеска КОН 40 г растворяется в 100 мл дистиллированной воды.

7. Жидкая среда с крахмалом (к тесту на гидролиз крахмала)

Состав:	
Пептон	5,0 г
Гидроортофосфат натрия	1,0 г
Лошадиная сыворотка	250 мл
Картофельный крахмал	25,0 г
Картофельная вода	325 мл
Спиртовой раствор фенолового красного (0,02 %)	40 мл
Дистиллированная вода	1 250 мл

Картофельный крахмал в количестве 25,0 г несколько раз промывают теплой дистиллированной водой для удаления растворимых частиц. Затем заваривают 500 мл горячей дистиллированной воды и отстаивают. Надосадочный слой крахмальной воды сливают для дальнейшего использования. Отдельно готовят пептонно-сывороточную воду: растворяют 5,0 г пептона и 1,0 г гидроортофосфата натрия в 1 250 мл дистиллированной воды, добавляют 250 мл лошадиной сыворотки, устанавливают pH 7,6.

Крахмальную воду 325 мл смешивают с 1 250 мл пептонно-сывороточной воды, к смеси прибавляют 4 мл 0,02 %-го спиртового раствора фенолового красного и все кипятят на водяной бане в течение часа, затем фильтруют через бумажный фильтр, разливают по 5 мл и стерилизуют текучим паром 3 дня подряд.

Готовая среда имеет насыщенно-розовый цвет.

Результат ферментации учитывают через 3 суток после посева испытуемой культуры.

При расщеплении крахмала цвет среды изменяется на желтый и она свертывается.

8. Плотная среда с крахмалом (к тесту на гидролиз крахмала)

Состав:	
Пептон	1,0 г
Натрия хлорид	0,5 г/100 мл
Крахмал	0,5—1,0 г/100 мл
Агар-агар	1,5 г/100 мл
Сыворотка лошади или крупного рогатого скота	10 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Для обогащения среды для культивирования микробов, требовательных к биологически активным соединениям, к средам добавляется 10 % сыворотки лошади или крупного рогатого скота.

К 100 мл горячей дистиллированной воды добавляют 1,0 г пептона, 0,5 г химически чистого натрия хлорида. Устанавливают pH 7,4, кипятят 5 мин, фильтруют через бумажный фильтр, доводят до первоначального объема горячей дистиллированной водой. К полученной основе добавляют 0,5—1,0 г взвеси крахмала в нескольких миллилитрах воды.

Среду стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин или при 112 °С 30 мин. Готовые среды разливают в чашки Петри. Среда бесцветна.

Индикатором для плотной среды на крахмал, не измененный и гидролизированный, является люголь.

9. Кровяной агар для определения гемолиза

К 100 мл растопленного и остуженного до 45—50 °С 2 %-го питательного агара pH 7,4—7,6, соблюдая правила асептики, добавляют 5 мл стерильной дефибринированной крови: кроличьей, лошадиной, бараньей или человеческой, не содержащей консервантов или антибактериальных препаратов.

Смесь тщательно перемешивают, остерегаясь образования пены, и разливают в стерильные чашки Петри, предварительно подогретые в термостате.

Перед розливом чашки устанавливают на ровную поверхность. Слой агара должен быть не более 3 мм, одинаковым по всей площади чашки.

10. Питательный желатин (для определения желатиназы)

Состав:	
Бульон Хоттингера	1 000 мл
Желатин пищевой высшего сорта	100,0 г

Желатин вносят в бульон для набухания на 1,5—2 ч, нагревают на водяной бане при 40—50 °С до полного расплавления. Устанавливают

pH 7,2. При необходимости среду фильтруют или осветляют с помощью суспензии куриных яиц (2 яйца, размешанных в двойном объеме холодной воды, вносят в среду, нагревают до свертывания белка, затем снова фильтруют). Разливают в пробирки по 8—9 мл. Стерилизуют при 112 °С 30 мин. Готовая среда имеет желтовато-коричневый цвет.

11. Среда для определения летициназы

Среда предназначена для выявления фермента у стафилококков, иерсиний, анаэробов.

Состав:

Казеин панкреатического расщепления	40,0 г
Na_2HPO_4	5,0 г
K_2HPO_4	1,0 г
NaCl	2,0 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 г
Глюкоза	2,0 г
Агар-агар	25,0 г

Ингредиенты смешивают, растворяют при нагревании в 1 000 мл воды. Устанавливают pH 7,6, стерилизуют при 121 °С 15 мин. Основа среды бледно-желтого цвета. К охлажденной до 50—55 °С основе добавляют желтки куриного яйца (1 желток на 500 мл среды). Перед использованием яйца тщательно моют в теплой воде, выдерживают 1 ч в 96 % этиловом спирте. Готовую среду разливают в чашки Петри.

12. Мясо-пептонный агар

Среда общего назначения. Используется для выращивания и подсчета на чашках Петри КОЕ нетребовательных микроорганизмов, высеянных из определенных объемов объектов внешней среды (воздуха, смывов с инвентаря, хирургического материала и др.).

Состав:

Пептон	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар микробиологический	0,5—2,0 г
Мясная вода	1 000 мл
pH 7,2—7,4	

В мясную воду вносят 10 г пептона и 5 г хлорида натрия, кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения добавленных ингредиентов.

Приготовленный бульон фильтруют, устанавливают pH 7,2—7,4 и добавляют измельченный агар в количестве, зависящем от его качества

и назначения среды. После добавления агара среду кипятят на слабом огне при постоянном перемешивании до полного растворении агара.

13. Среда Эндо (коммерческая)

Состав:

Панкреатический гидролизат кильки	11,5 г
Экстракт кормовых дрожжей	0,86 г
Лактоза	12,9 г
Фуксин основной	0,22 г
Сульфат натрия двузамещенный	0,48 г
Сульфит натрия	0,83 г
Хлорид натрия	3,6 г
Карбонат натрия	0,01 г
Агар	9,6 г

pH 7,3 ± 0,2

Навеску препарата, указанную на этикетке, размешать в 1 000 мл дистиллированной воды. Прокипятить до полного расплавления агара, профильтровать и снова довести до кипения. Остудить до температуры 45—50 °С и разлить в стерильные чашки Петри слоем 4—5 мм. После застудневания агара среду подсушить в термостате при температуре 37 °С. Готовая среда бледно-розового цвета.

14. Среда Кесслера с лактозой

Состав:

Пептон	10,0 г
Стерильная бычья желчь	50,0 мл
Лактоза	2,5 г
Раствор генцианового (кристаллического) фиолетового 1 %	4 мл
Дистиллированная вода	1 000 мл

К 1 000 мл дистиллированной воды добавляют 10 г пептона и 50 мл стерильной бычьей желчи. Смесь нагревают на водяной бане при перемешивании 20—30 мин, затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр, добавляют 2,5 г лактозы, доводят объем до 1 000 мл.

Устанавливают pH 7,4—7,6, добавляют 4 мл 1 %-го водного раствора генцианового фиолетового, разливают в пробирки и колбы с поплавками в необходимых количествах. Стерилизуют при 121 °С 15 мин.

Готовая среда имеет фиолетовый цвет.

Возможно также использование коммерческой сухой среды Кесслера. Подготовку для ее стерилизации и посева проводят согласно прописи на этикетке.

Литература

1. Бондаренко В. М. Молекулярно-генетические исследования бифидобактерий и лактобацилл //Микробиология, 2006.

2. Бондаренко В. М. «Острова» патогенности бактерий //Микробиология. 2001. № 4. С. 67—74.

3. Галынкин В. А., Заикина Н. А., Потехина Т. С. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии с основами асептики и биотехнологии. Курск, 2002.

4. Галынкин В. А., Заикина Н. А., Кочеровец В. И., Курбанова И. З. Питательные среды: Справочник. Санкт-Петербург, 2006.

5. Ганина В. И. Пробиотики. Назначение, свойства и основы биотехнологии.

6. Горская Е. М., Манохина И. М., Горелов А. В., Поспелова В. В, Рахимова Н. Г. Методические рекомендации по определению адгезии бактерий кишечного происхождения к эпителиальным клеткам тонкого и толстого кишечника. М., 1989.

7. Государственная фармакопея СССР, XI, выпуск 2. М.: «Медицина», 1984.

8. СП 3.3.2.561—96 «Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов». М., 1998.

9. РД 42-28-8—89 «Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения». М., 1989.

10. Лабинская А. С. Практикум по микробиологическим методам исследования. М., 1963.

11. СП 3.3.2.1288—03 «Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов». М., 2003.

12. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований /Под ред. А. С. Лабинской, Л. П. Блинковой, А. С. Ещиной. М.: «Медицина», 2004.

13. МУК 4.2.1890—04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

14. Определитель бактерий Берджи, 1997.

15. РД 64-126—91 «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)». М., 1991.

16. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2000.

17. Сбойчаков В. Б. Микробиология с основами эпидемиологии и методами микробиологических исследований. Санкт-Петербург: «СпецЛит», 2007.

18. ФС 42-0054—00, лактобактерин сухой.

19. ФС 42-3947—00, бифидумбактерин сухой.

20. ФС 42-3268—96, бификол сухой.

21. List of Bacterial names, april 1992. A Service provided by the DSM and the ICECC.

gost.e-ecolog.ru