

# ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар

## МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар

ОФС.1.2.4.0010.15  
Взамен ст. ГФ XII, ч.1,  
ОФС 42–0068–07

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Определение антимикробной активности антибиотиков основано на их способности угнетать рост микроорганизмов. Определение проводят методом диффузии в агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста тест–штаммов микроорганизмов, которые образуются при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата определенных концентраций. Метод основан на логарифмической зависимости размеров зон угнетения роста тест–микроорганизмов от концентрации антибиотика, которая должны быть линейной.

Антимикробная активность антибиотиков выражается в единицах действия — ЕД или «мкг» на единицу объема препарата. Для большинства антибиотиков 1 ЕД или 1 мкг соответствуют 1 мкг активного вещества (кислоты или основания); для антибиотиков, имеющих иное количественное выражение единицы, соответствующие указания даются в фармакопейных статьях.

При определении антимикробной активности антибиотиков используют стандартные образцы, активность которых, как правило, устанавливают в соответствии с международными биологическими стандартами. При отсутствии последних для указанных целей могут быть использованы химические стандартные образцы, антимикробную активность которых рассчитывают на основании показателей качества, установленных физико–химическими методами. Антимикробную активность стандартных образцов антибиотиков, не имеющих аналогов в международной коллекции стандартов, рассчитывают также на основании показателей качества, установленных физико–химическими методами.

Стандартные образцы антибиотиков хранятся и используются в соответствии с рекомендациями, указанными на этикетке стандартного образца.

## Методика испытания

Тест–микроорганизмы, растворители, буферные растворы, питательные среды и прочие условия проведения испытания указаны в табл. 1.

В стеклянные или пластмассовые чашки Петри размером 20×100 мм или 20×90 мм, установленные на столиках со строго горизонтальной поверхностью, разливают расплавленные питательные среды определенного состава в 1 или 2 слоя. Для нижнего слоя используют стерильные незасеянные среды, для верхнего или одного слоя — стерильную агаровую среду, предварительно засеянную соответствующим тест–микроорганизмом. Если культура представляет собой суспензию вегетативных клеток, то температура расплавленной среды, в которую вносят тест–штамм, должна быть  $(49 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ; при использовании суспензии спор — от 65 до 70  $^\circ\text{C}$ . К среде следует добавить такое количество суспензии вегетативных клеток или спор, которое обеспечивает оптимальный рост тест–микроорганизма и четкость зон угнетения его роста. Количество посевной дозы определяют опытным путем, начиная с объема суспензии микроорганизмов, указанного в табл. 2. Оптимальное количество посевной дозы должно быть таким, чтобы диаметр зон угнетения для минимальной концентрации антибиотика был не менее 14 мм.

Стерильные цилиндры (6 штук) единого размера и массы высотой  $(10,0 \pm 0,1)$  мм и внутренним диаметром  $(6,0 \pm 0,1)$  мм из нержавеющей стали или алюминия расставляют на поверхности засеянной среды на равном расстоянии друг от друга и от края чашки. Вместо цилиндров могут быть использованы лунки диаметром от 6 до 8 мм, сделанные в толще агара с помощью стерильного сверла, либо другого соответствующего приспособления.

В цилиндры или лунки каждой чашки вносят равные объемы рабочих растворов стандартного и испытуемого образцов антибиотика. Основные растворы стандартных и испытуемых образцов готовят в стерильных растворителях с концентрацией 1 мг/мл. Затем из основных растворов в зависимости от применяемого варианта метода диффузии в агар (трехдозного или с построением стандартной кривой) готовят рабочие растворы трех или одной концентраций испытуемого образца и растворы трех или пяти концентраций стандартного образца. Рабочие растворы испытуемых образцов готовят из основных растворов таким образом, чтобы их концентрации не имели существенных отличий от концентраций раствора стандартного образца.

Для уменьшения влияния колебаний во времени между закапыванием растворов, используемых в опыте, рекомендуется после внесения выдерживать их в чашках при комнатной температуре в течение 1—2 ч. Затем чашки инкубируют при температуре  $(36 \pm 1)$  °С в течение 16—18 ч.

Диаметры зон угнетения роста тест-микроорганизма при помощи соответствующих приборов измеряют с точностью до 0,1 мм.

## **Определение антимикробной активности антибиотиков с использованием трехдозного варианта метода диффузии в агар.**

Для проведения испытания готовят 3 раствора стандартного образца ( $C_1, C_2, C_3$ ) и 3 раствора испытуемого образца ( $I_1, I_2, I_3$ ). Концентрации растворов, содержащих малую, среднюю и большую дозы, должны находиться между собой в кратном соотношении (1:2:4). При необходимости это соотношение может быть изменено. Концентрация раствора  $C_2$  должна быть близка к контрольной концентрации раствора стандартного образца, указанной в табл. 2. Все растворы стандартного и испытуемого образцов вносят в цилиндры или лунки одной чашки Петри таким образом, чтобы растворы с большими концентрациями не соприкасались между собой. Предлагаемый вариант закапывания:  $C_1 I_3 C_2 I_1 C_3 I_2$ . Число чашек, используемых в каждом опыте, должно быть достаточным для обеспечения статистической достоверности результатов, но не менее 6 штук.

Последовательность внесения растворов стандартного и испытуемого образцов в цилиндры или лунки каждой чашки должна быть следующей: первым вносят раствор с малой концентрацией стандартного образца ( $C_1$ ) и соответствующий раствор испытуемого образца ( $I_1$ ), затем растворы со средней концентрацией ( $C_2$  и  $I_2$ ), последними вносят растворы с большими концентрациями ( $C_3$  и  $I_3$ ).

Допускается проводить испытание с использованием квадратных чашек Петри размером  $20 \times 245 \times 245$  мм, при этом растворы стандартного образца и испытуемого препарата вносятся по схеме латинского квадрата. Количество среды и объем суспензии тест-микроорганизма подбирают опытным путем.

Расчет активности и дисперсионный анализ при использовании трехдозного варианта метода диффузии в агар осуществляют в соответствии со статьей [ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами»](#), при проведении испытания с использованием круглых чашек Петри расчет проводят в соответствии с разделом 3.2. (обработка результатов трехдозовой рандомизированной), квадратных – с разделом 3.5. (обработка результатов трехдозовой постановки методом латинского квадрата). Растворы определенных концентраций стандартного ( $C$ ) и испытуемого ( $I$ ) образцов обозначены S и U соответственно.

Условия получения достоверных результатов с использованием трехдозного варианта метода диффузии в агар: соотношение 2 последовательных доз должно быть постоянным; число разведений рабочих концентраций должно быть одинаково для стандартного и испытуемого образца; взаимосвязь между логарифмом доз и диаметром зон угнетения роста должна быть представлена в виде прямой линии во всем диапазоне исследованных доз; прямая линия испытуемого должна быть параллельна соответствующей прямой линии стандартного образца.

## Определение антимикробной активности антибиотиков с использованием стандартной кривой.

В день постановки анализа из основного раствора готовят 5 рабочих растворов стандартного образца  $C_1$ ;  $C_2$ ;  $C_3$ ;  $C_4$ ;  $C_5$  с концентрациями, увеличивающимися в геометрической прогрессии ( $Z$ ), обычно в соотношении 1:1,25. Средняя концентрация ( $C_3$ ) является контрольной и должна быть близка к концентрации, указанной в табл. 2: концентрация  $C_1$  – наименьшая,  $C_5$  – наибольшая. Для исследования растворов каждой концентрации (кроме контрольной) используют по 3 чашки. Раствор контрольной концентрации  $C_3$  закапывают в 3 цилиндра (или лунки) каждой из взятых в опыт чашек, в 3 другие цилиндра (лунки) закапывают раствор одной из концентраций стандартного образца, чередуя его с раствором контрольной концентрации. Таким образом, для построения стандартной кривой используют 12 чашек.

После инкубации в термостате измеряют диаметры зон угнетения роста тест-микробов. Далее вычисляют среднюю величину диаметров зон для раствора контрольной концентрации стандартного образца в каждой группе из 3 чашек, затем среднюю величину диаметров зон для раствора контрольной концентрации стандартного образца из всех 12 чашек (общую среднюю из 36 зон). По разности между средней величиной зоны контрольной концентрации, установленной из 12 чашек, и средней величиной зоны контрольной концентрации, установленной из 3 чашек с каждой отдельной концентрацией, находят поправку к величине зоны данной концентрации.

Найденную поправку прибавляют к средней величине диаметра зоны данной концентрации, если она положительная, и вычитают, если она отрицательная.

*Пример.* Общая средняя величина зоны для раствора контрольной концентрации стандартного образца 1 мкг/мл, рассчитанная из 36 зон, равна 19,2 мм. Средняя величина зоны для раствора той же концентрации, установленная из 3 чашек, на которых испытывался раствор с концентрацией 0,83 мкг/мл стандартного образца, равна 19 мм. Следовательно, величина поправки будет + 0,2 мм. Средняя величина зоны для концентрации 0,83 мкг/мл равна 17,9 мм; прибавляя поправку +0,2 мм, получаем величину 18,1 мм. Таким образом исправляют значение величины зон для растворов всех концентраций стандартного образца и получают величины  $d_1$ ;  $d_2$ ;  $d_4$ ;  $d_5$ .

Для исследования активности испытуемого образца проводят несколько определений, используя для каждого по 3 чашки, в которые закапывают раствор контрольной концентрации стандартного образца и раствор испытуемого образца с концентрацией, близкой к контрольной. Внесение растворов контрольной концентрации стандартного и испытуемого образцов в каждой группе из 3 чашек должно проводиться одновременно. После инкубации измеряют зоны угнетения роста тест-микроба, образуемые растворами контрольной концентрации стандартного и испытуемого образцов. Находят среднее значение величин зон из 3 чашек.

Расчет антимикробной активности испытуемых образцов по стандартной кривой может быть проведен 2 способами: графическим методом или путем непосредственного расчета с использованием соответствующих формул.