

**ЕВЛАШКИНА**

**Вера Францевна**

**Специфическая активность бифидосодержащих  
моно- и комплексных биопрепаратов и  
усовершенствование методов их контроля**

03.00.07 - микробиология

**Автореферат**

диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2009 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А.Тарасевича» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук Чуприна Раиса Павловна

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор Поспелова Вероника Владимировна

доктор биологических наук, профессор Блинкова Лариса Петровна

**Ведущая организация:** Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию.

Защита состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_2009 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 125212 г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского»

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_2009 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

### Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Широкое распространение различных болезней, патогенетически связанных с дисбактериозом, и высокая частота выделения лекарственноустойчивых форм патогенных и условно патогенных микроорганизмов, высеваемых при обследованиях на дисбактериоз, делает актуальной проблему обеспечения практического здравоохранения средствами коррекции микробиоценоза разных биотопов организма человека. (Грачева Н.М. с соавт., 1982; Алешкин В.А. с соавт., 2006; Феклисова Л.В. с соавт., 2008). Применение бактериальных препаратов (пробиотиков) разнонаправленного действия неуклонно расширяется и включает не только заболевания желудочно-кишечного тракта, но и разные формы патологии полости рта, женских гениталий, кожные болезни, нарушения иммунного статуса и др. (Грачева Н.М. с соавт., 1982; Анкирская А.С. с соавт., 2000; Алешкин В.А. с соавт., 2005; Пospelова В.В. с соавт., 2007; Бондаренко В.М., Лиходед В.Г., 2008; Добрица В.П. с соавт., 2008; Hoffman F.A, 2008; Sutton A., 2008). Для целей бактериальной терапии используют биопрепараты из живых микроорганизмов нормального микробиоценоза человека: бифидобактерий, лактобацилл, кишечной палочки, энтерококков и других представителей нормофлоры (Гончарова Г.И., 1970, 1982; Пospelова В.В. с соавт., 2000, 2008; Алешкин В.А. с соавт., 2003; Амерханова А.М., 2003; Brow A.C., Valiere A, 2004; Pospelova V.V., 2007; Camilleri M., 2008). В России зарегистрированы отечественные и зарубежные моно- и комплексные биопрепараты (бифидумбактерин, бификол, пробифор, бифилиз, колибактерин, ацилакт, аципол, флорин форте, споробактерин, гастрофарм, бифиформ, линекс, экофемин, бактисубтил и др).

Первый отечественный бифидосодержащий биопрепарат бифидумбактерин содержит в своем составе бифидобактерии вида *B.bifidum*, штаммы № 1, 791 или ЛВА-3 (Гончарова Г.И., 1970, 1982; Козлова Э.П с соавт., 1987). В настоящее время бифидумбактерин сухой выпускают 10 предприятий РФ. Кроме препарата

во флаконах и порошке выпускают бифидумбактерин в форме таблеток, капсул и суппозиториев.

Комплексный биопрепарат бификол создан на основе таксономически отделенных микроорганизмов двух видов – *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17, один из которых строгий анаэроб, а другой растет в условиях аэробноза. Препарат получают путем совместного культивирования обоих штаммов. В основе композиции препарата лежит природный синергизм бактерий названных видов (Рахимова Н.Г., 1977; Поспелова В.В., 1979). По данным Государственных клинических испытаний бификола выявлена его высокая терапевтическая эффективность и отмечено оптимальное соотношение производственных штаммов, позволяющее уменьшить на 3 порядка содержание колибактерий, предусмотренное для колибактерина без ущерба для клинической эффективности препарата (Рахимова Н.Г., 1975; Грачева Н.М., 1982; Поспелова В.В.с соавт., 1986; Pospelova V.V., 2006). Выпуск бификола освоен 7 предприятиями РФ и 2 зарубежными.

Созданные в 70-е годы прошлого столетия пробиотики бифидумбактерин и бификол не утратили своего значения и продолжают пользоваться спросом в здравоохранении (Михайлова Н.А. с соавт., 2006; Осипова И.Г. с соавт., 2006, Бондаренко В.М., 2007). Согласно современным тенденциям развития проблемы бактериальной терапии будущее, несомненно, принадлежит поликомпонентным препаратам-пробиотикам (Алешкин В.А., 2006; Бондаренко В.М., Лиходед В.Г).

Качество бактериальных препаратов формируется на всех технологических этапах, начиная от штаммов и сырья, используемых питательных сред, условий культивирования бактерий, замораживания, способа их высушивания и кончая готовой продукцией в зависимости от формы выпуска, условий хранения, транспортирования и определяется адекватностью методов контроля. Биопрепараты должны быть стандартными, стабильными, соответствовать требованиям нормативной документации (НД) в течение всего срока годности, поэтому важное значение имеет контроль готовой продукции (Чуприна Р.П., 2002; Осипова И.Г., 2006).

Основным показателем качества бифидумбактерина и бификола является специфическая активность, под которой для бактериальных препаратов понимается количество живых бактерий в дозе (ОСТ 91500.05.001.00).

Разработанная технология производства бификола в условиях стационарного культивирования штаммов на предприятии МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского обеспечивала требуемое количественное соотношение живых микроорганизмов обоих видов в дозе препарата - не менее  $10^7$  КОЕ бифидобактерий и колибактерий.

Однако освоение производства бификола новыми предприятиями и модификация исходной технологии (использование нового оборудования, глубинного культивирования без соблюдения коррекции кислотности с аэрацией различной степени интенсивности и разных по составу питательных сред) привело к нестандартности препарата по специфической активности. Она колебалась на разных предприятиях от серии к серии. Неконтролируемый рост кишечной палочки и низкое содержание бифидобактерий не позволяли с помощью существующего метода контроля объективно определять количество живых бифидобактерий в дозе бификола как в готовом препарате, так и в полуфабрикате.

Опыт работы контролирующих организаций показывает, что улучшению качества коммерческих препаратов способствует наличие стандартных образцов разных уровней: международных, национальных, отраслевых и стандартных образцов предприятий, использование которых обеспечивает стандартизацию и сравнительное изучение контролируемых параметров препаратов, выпускаемых на разных предприятиях (Дзагуров С.Г., 1970; Бектимиров Т.А., 2004).

Разработанный ранее Отраслевой стандартный образец (ОСО) колибактерина с успехом применяют в течение многих лет для контроля колисодержащих препаратов. (Лесняк с соавт., 1975; Шимчук Л.Ф., 1983) До настоящего времени разработок ОСО бифидумбактерина не предпринималось.

В связи с изложенным представлялось необходимым разработать, изучить и внедрить в практику производства ОСО бифидумбактерина для более

достоверного определения количества живых бифидобактерий в дозе бифидосодержащих препаратов, а также изучить разные способы ингибирования кишечной палочки в смешанной культуре, не влияющие на рост бифидобактерий и позволяющие учитывать количественное содержание бифидо- и колибактерий при совместном выращивании.

**Цель исследования** - экспериментально разработать и апробировать в производственных условиях новые методы контроля специфической активности бифидосодержащих моно- и комплексного биопрепаратов (бифидумбактерина и бификола).

**Задачи исследования:**

1. Оценить информативность метода контроля содержания живых бифидо- и колибактерий в дозе бификола по ВФС 42-65ВС-86.
2. Разработать, изучить и внедрить в практику Отраслевой стандартный образец бифидумбактерина, предназначенный для сравнительной оценки специфической активности бифидумбактерина и бификола.
3. Изучить чувствительность штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17, входящих в бификол, к воздействию высоких температур и к 19 антибиотикам разных химических групп.
4. Изучить кислотообразующую активность бифидо- и колибактерий в смешанной культуре.
5. Изучить чувствительность штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17, составляющих бификол, к ингибирующему действию азидата натрия и разработать условия приготовления питательной среды с этим ингибитором, готовой к применению, для контроля содержания живых бифидо- и колибактерий в бификоле.
6. Разработать и апробировать в условиях производства точный метод контроля специфической активности бификола (по содержанию живых бифидо- и колибактерий в дозе).

Диссертация выполнена в соответствии с основными планами научных исследований ГИСК им. Л.А. Тарасевича:

- Характеристика производственных штаммов-продуцентов колибактерина, бифидумбактерина и лактобактерина по антагонистической активности, устойчивости к антибиотикам и жизнеспособности. УДК 578.085.1-612.336.3, № гос. Регистрации 79049914.

- Разработка, усовершенствование и стандартизация методов контроля лекарственных форм биопрепаратов из лакто- и бифидобактерий. УДК 612.336.358.

09.003.12:658.516. № Гос. Регистрации 0186.

- Договоры № 737/089/024 и 034/ 089/009 с Минздравом России – Отраслевая научно-исследовательская программа «Эпидемиология и микробиология» и договор с Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 73-Д в рамках отраслевой научно-исследовательской программы «Научные аспекты обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в Российской Федерации на 2006-2010 годы».

### **Научная новизна**

1. Выявлено избирательное действие азидата натрия по отношению к кишечной палочке в смешанных культурах с бифидобактериями в жидких питательных средах. Подобраны концентрации и показана возможность использования азидата натрия для ингибирования роста кишечной палочки, что позволило разработать, апробировать и внедрить надежный метод оценки количества жизнеспособных бифидобактерий в препарате бификол.

2. Изучена кислотообразующая активность бифидо- и колибактерий при совместном культивировании и выявлена прямая связь между содержанием в исследуемом разведении бифидобактерий (чувствительность до 1 колонии) и показателем титруемой кислотности питательной среды. Показатель кислотности не ниже 100 °Т свидетельствует о присутствии бифидобактерий в данном разведении и позволяет определить количество бифидобактерий в препарате.

3. Показано, что чувствительность к антибиотикам культур *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 в моно- и комплексном препаратах изменяется в зависимости от состава питательных сред и условий культивирования.

4. Разработана модификация питательной среды Блаурокка с использованием азида натрия, обеспечивающая точность количественного учета бифидобактерий в препарате.

### **Практическая значимость работы**

1. Разработан, апробирован на разных предприятиях и внедрен в нормативную документацию метод контроля количественного содержания живых бифидо- и колибактерий в комплексном препарате бификол.

2. Разработан и апробирован на предприятиях Отраслевой стандартный образец бифидумбактерина (ОСО-42-28-161-89), предназначенный для контроля содержания жизнеспособных бифидобактерий в производственных сериях бифидумбактерина, бификола и других бифидосодержащих препаратов. ОСО внесен в Государственный Реестр.

3. Новый метод учета количества живых микроорганизмов в бификоле с использованием модифицированной питательной среды Блаурокка позволил усовершенствовать технологию совместного культивирования штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 и способствовал повышению качества препарата.

### **Внедрение результатов работы**

Результаты научной работы отражены в НД:

1. Изменения № 2 к ВФС 42-65ВС-86 на бификол (ФС 42-3268-96, ФСП 42-0010160601, ФСП 42-0028220201, ФСП 42-0109220501, ФСП 42-0108220601, ФСП 42-0381241702, ФСП 42-01003753002, ФСП 42-0061231902, ФСП 42-0504676205, ФСП 42-6203-06, ФСП 42-1606-06).

2. РП на бификол

3. Свидетельство на ОСО бифидумбактерина 42-28-161-89. Утв. ГИСК им. Л.А. Тарасевича 5.01.89. ОСО бифидумбактерина внесен в Государственный Реестр.

4. Инструкция по применению ОСО бифидумбактерина.

5. Бифидумбактерин сухой (ФС 42-132 ВС-94, ФС 42- 3947-00; ФСП 42-0028-212701, ФСП 42-0135112201, ФСП 42-0100-228902, ФСП 42-0110332002, ФСП 42-0338284602, ФСП 42-0269231802, ФСП 42-0109453403, ФСП 42-0108453203, ФСП 42-0381454003, ФСП 42-0022580804, ФСП 42-0010508904, ФСП 42-0504722405) .

6. Бифидумбактерин в свечах (ВФС 42-224ВС-89, ФС 42-3240-95; бифидумбактерин суппозитории ФСП 42-0109027000, ФСП 42-0108027100, ФСП 42-0100-229002, ФСП- 42-0504229004, ФСП 42-0109027005, ФСП 42-0108027105, ФСП 42-0107026605).

7. Бифидумбактерин в таблетках (ФС 42-3449-97, ФСП 42-0135112201,

ФСП 42-01070-61705).

8. Биомасса бифидобактерий (ВФС 42-3378-99, ФСП 42-0134137550-01, ФСП 42-0110-305402).

9. Бифидумбактерин в капсулах (ВФС 42-3356-99, ФСП 42-0109137801, ФСП 42-0108138101, ФСП 42-0109137806, ФСП 42-0338353202).

10. Бифидумбактерин форте (ВФС 42-2459-95, ФС 42-3784-99).

11. Бифилиз сухой (ВФС 42-2631-95, ФСП 42-0110027200, ФСП 42- 01081380-01, ФСП 42-0109137901, ФСП 0110-0272-05).

12. РП на бифидумбактерин сухой, таблетки, свечи, капсулы и порошки.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Разработанный метод определения количества живых бифидо- и колибактерий в бификоле позволяет объективно оценить качество выпускаемого на предприятиях страны комплексного препарата.

2. Модифицированная и апробированная на предприятиях отрасли питательная среда Блаурокка с азидом натрия, предназначенная для контроля количества жизнеспособных бифидобактерий в комплексном бифидосодержащем препарате, оптимальна по составу, способу приготовления и чувствительности.

3. Показатели кислотообразующей активности штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 позволяют определить количество жизнеспособных бифидобактерий и колибактерий в составе комплексного препарата бификол.

4. Разработанный ОСО-42-28-161-89 бифидумбактерина позволяет стандартизовать условия проведения контроля бифидумбактерина и бификола на этапах технологического процесса и в готовых препаратах.

**Апробация работы.** Диссертация апробирована и рекомендована к защите на заседании Ученого совета ФГУН ГИСК им.Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора, протокол № 18 от 16.12.2008 г.

Результаты проведенных исследований доложены на: VI Всероссийском съезде микробиологов, эпидемиологов и паразитологов (Н.Новгород, 1991); в школе ОБК (Москва, 1992, 1993, 1998); 2 Международной конференции, посвященной 100-летию Пермского НПО «Биомед» (Пермь, 1998); Международном конгрессе «Ликвидация и элиминация инфекционных болезней» (С-Петербург, 2003); Международной конференции «Пробиотики, пребиотики,

симбиотики и функциональные продукты питания». (Москва, 2004); III конгрессе педиатров - инфекционистов России (Москва, 2004); Всероссийских научно-практических конференциях «Вакцинология». (Москва, 2006; 2008).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 2 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объём диссертации.** Диссертационная работа изложена на 129 страницах, иллюстрирована 25 таблицами, 5 рисунками, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, 4 глав с изложением результатов собственных исследований, заключения, выводов, приложения. Список использованной литературы содержит 128 отечественных и 96 иностранных источников.

Все исследования выполнены в лаборатории бактериальных вакцин ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича и получены автором самостоятельно.

## Содержание работы

### Материалы и методы исследования

► Производственные штаммы *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17, находящиеся в коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Характеристики данных штаммов изложены в ФС на бифидумбактерин, колибактерин, бификол.

Таблица 1. Бактерийные препараты, использованные в работе

| Название препаратов                  | Кол-во серий | Предприятие - изготовитель  |
|--------------------------------------|--------------|---|
| Бификол - коммерческие серии         | 205          | МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, НПО "Биомед" им. И.И. Мечникова, НПО "Иммунопрепарат" г. Уфа, НПО «Биомед» г. Пермь, Тюменский НИИНИП, Харьковское предприятие по производству бактериальных препаратов, Тбилисский НПО "Бактериофаг", |
| Бифидумбактерин – коммерческие серии | 36           | МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, НПО "Биомед" им. И.И. Мечникова, НПО "Иммунопрепарат" г. Уфа, НПО «Биомед» г. Пермь, «ИмБио» г. Н. Новгогод, Тюменский НИИНИП, Тбилисский НПО "Бактериофаг»  |
| Колибактерин - коммерческие серии    | 34           | Тюменский НИИКИП, «ИмБио» г. Н. Новгогод, НПО "Биомед" им. И.И. Мечникова   |

|   |    |  |
|---|----|--|
| Экспериментальные варианты бификола   | 15 | Приготовлены в ГИСК им. Л.А. Тарасевича из коммерческих серий колибактерина и бифидумбактерина |
| Экспериментальные серии бифидумбактерина для приготовления ОСО бифидумбактерина | 4  | МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского совместно с ГИСК им. Л.А. Тарасевича                             |

► ОСО колибактерина, серия 1.

► Антибиотики - 19 наименований, относящиеся к разным химическим группам отечественного и зарубежного производства: эритромицин, олеандомицин, бензилпенициллин, ампициллин, карбенициллин, линкомицин, оксациллин, цепорин, тетрациклин, тетраолеан, гентамицин, метициллин, мономицин, стрептомицин, левомецетин, неомицин, канамицин, леворин, нистатин.

► Питательные среды: Блаурокка, КД-5, МПБ, Эндо.

► Химические вещества: натрия азид фирмы SERVA, натрия хлорид фирмы «Химмед», натрия гидроксид, фенолфталеин фирмы «Реахим».

### **Методы исследования**

- Количество живых бифидобактерий и колибактерий в одной дозе бификола с подсчетом КОЕ определяли с помощью десятикратных разведений в среде КД-5 с последующим высевом кишечной палочки на среду Эндо (ВФС 42-65ВС-86 на бификол сухой).

- Количество живых бифидобактерий в одной дозе бифидумбактерина с подсчетом КОЕ определяли с помощью десятикратных разведений в среде Блаурокка (ФС 42-3947-00 на бифидумбактерин сухой).

- Количество живых колибактерий в одной дозе колибактерина с подсчетом КОЕ определяли с помощью десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом на среду Эндо (ФСП 42-0504722505)

- Определение активности кислотообразования (титруемая кислотность) бифидо- и колибактерий проводили титриметрическим методом при выращивании в среде Блаурокка и выражали в градусах Тернера (°Т) (ФС 42-3947-00 на бифидумбактерин сухой).

- Антибиотикорезистентность штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 изучали в отношении 19 антибиотиков методом 2 кратных серийных разведений в пробирках со средой Блаурокка и МПБ соответственно в объеме 10 мл. Изучаемые культуры *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 разводили вышеуказанными средами и в концентрации  $10^5$ - $10^6$  клеток/мл вносили в объеме 1 мл в пробирки с разведенными антибиотиками. Контролем служили пробирки с тем же количеством культуры, не содержащей антибиотиков. За МИК (минимальную ингибирующую концентрацию) в соответствии с требованиями действующих МУК 4.2.1890-04 принимали концентрацию, при которой отсутствовал видимый рост культуры.

- Термостабильность ОСО бифидумбактерина изучали на основании кривой деградации живых микробов при разных температурах и сроках хранения (WHO/ТВ/ Technical Guide, 1977).

- Точность розлива, остаточную влажность, наличие вакуума в ампулах определяли по методам, изложенным в МУК 4.1/4.2.588-96.

- Морфологические, тинкториальные и физиолого-биохимические свойства культур изучали общепринятыми методами бактериологии.

- Достоверность различий между результатами исследований вычисляли с помощью методов вариационной статистики (Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962).

Результаты оценивали на основании данных 5 опытов.

## **Результаты исследования и их обсуждение**

### **Анализ стандартности производственных серий бификола по содержанию жизнеспособных *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 и разработка ОСО бифидумбактерина**

Согласно исходной НД на бификол, определение количества живых бифидо- и колибактерий в бификоле проводили при совместном культивировании штаммов в среде КД-5. Однако трудность определения количественного содержания бифидобактерий заключается в том, что этот микроорганизм является строгим анаэробом и при культивировании на полужидкой среде КД-5

характерные колонии бифидобактерий видны только на 3 - 4 сутки инкубации. Колибактерии обладают на этой среде более высокой скоростью роста, с визуальным проявлением мутности на первые сутки роста, не формируют четких изолированных колоний. Поэтому регламентированный метод был неприемлем для количественной оценки содержания бифидобактерий в бификоле.

На первом этапе исследований изучали морфологию роста бифидо- и колибактерий при культивировании в средах КД-5 и Блаурокка. Для этой цели использовали штаммы *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17, ОСО колибактерина, коммерческие серии колибактерина, бифидумбактерина, бификола и экспериментальные варианты бификола. Испытуемые препараты разводили согласно ФС, титровали методом десятикратных разведений в пробирках со средой КД-5 и Блаурокка и инкубировали при температуре  $(38\pm 1)$  °С в течение 4-х суток. В посевах бифидумбактерина в среде Блаурокка выростали изолированные колонии в форме «гвоздиков» и плотных «тяжиков» длиной 2-5 мм. При посеве колибактерина отмечали неравномерное помутнение среды с удлинёнными рыхлыми «тяжами» длиной 15-20 мм. В опытах с бификолом отмечался рост, аналогичный росту при посеве колибактерина (табл.2).

Таблица 2. Характер роста штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 на среде Блаурокка

| Препараты       | Характер роста микроорганизмов в разведениях:  |           |           |           |
|-----------------|--|-----------|-----------|-----------|
|                 | $10^{-6}$  | $10^{-7}$ | $10^{-8}$ | $10^{-9}$ |
| БИФИДУМБАКТЕРИН | Просматриваются изолированные колонии в виде «гвоздиков» или плотных «тяжиков» длиной 2-5 мм |           |           | Роста нет |
| КОЛИБАКТЕРИН    | На фоне помутнения среды просматриваются удлинённые рыхлые «тяжи» длиной 15-20 мм.           |           |           |           |
| БИФИКОЛ         | На фоне помутнения среды просматриваются удлинённые рыхлые «тяжи» длиной 15-20 мм.           |           |           |           |

Таким образом, было установлено, что вследствие неравномерного помутнения среды, вызванного ростом кишечной палочки, учесть количество бифидобактерий в смешанной культуре невозможно.

В среде КД-5, регламентированной НД, морфология роста кишечной палочки была аналогична росту в среде Блаурокка, тогда как у бифидобактерий в среде КД-5, в отличие от роста на среде Блаурокка, отмечена нечеткая форма колоний:

они были мелкими и более рыхлыми. Поэтому дальнейшее изучение препаратов проводили на среде Блаурокка.

Необходимость стандартизации условий изучения специфической активности бифидосодержащих препаратов требовала разработки ОСО бифидумбактерина по аналогии с действующим ОСО колибактерина, успешно используемым при контроле препаратов, начиная с 1979 г.

Для приготовления серий предполагаемого ОСО бифидумбактерина культуру штамма *B.bifidum* 1 выращивали в стационарных условиях в бутылках с питательной средой Блаурокка при температуре  $(38\pm 1)$  °С 48 часов. Полученную биомассу соединяли с защитной средой, разливали по 3 мл в вакуумные ампулы. Замораживали при температуре минус  $(39\pm 1)$  °С в течение 120 часов с последующим высушиванием в аппарате ТГ-50 в течение 65 часов.

Согласно экспериментально разработанным условиям, на базе МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского были приготовлены 4 серии предполагаемого ОСО. После изучения серий с учетом физических свойств, точности розлива по весу сухого вещества в ампулах, количеству жизнеспособных бифидобактерий в 1 мл, активности кислотообразования, остаточной влажности и наличию вакуума была отобрана серия, максимально отвечающая ОСО в соответствии с ГОСТ 8.315-78. ОСО бифидумбактерина в ампулах имеет вид мелкопористой массы кремового цвета, которая образует гомогенную суспензию при добавлении 0,9 % раствора натрия хлорида. Изучение свойств предполагаемого ОСО показало: точность розлива по сухому веществу –  $(482,4\pm 1,29)$  мг с коэффициентом вариации 1,34; остаточная влажность - 1,07 %, активность кислотообразования -  $(120\pm 6)$  °Т, содержание живых бифидобактерий  $-(2,0\pm 0,18)\times 10^7$  КОЕ/мл. В процессе хранения ОСО при температуре минус 15 °С не отмечено отмирания живых бифидобактерий ( $p>0,05$ ). С целью прогнозирования стабильности ОСО в процессе хранения, изучена его термостабильность (методика ВОЗ) в течение 42 дней при температуре  $(37\pm 1)$  °С. При этом выявлена достаточно высокая

термоустойчивость препарата. Разработанный ОСО бифидумбактерина апробирован на предприятии МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (41 серия) и в Тюменском НИИКИП (20 серий). Свидетельство на ОСО-42-28-161-89 бифидумбактерина и Инструкция по применению утверждены Ученым Советом ГИСК им. Л.А. Тарасевича 05.01.89 г и постоянно используются производствами при контроле коммерческих серий бифидумбактерина с 1989 г, бификола - с 1992 г и других бифидосодержащих препаратов.

### **Изучение устойчивости штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 в составе бификола к термическим воздействиям и антибиотикам разных химических групп**

Нами изучено влияние термического воздействия на жизнеспособность штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17. С этой целью образцы бифидумбактерина и колибактерина прогревали на водяной бане при температуре 56 °С и 100 °С. Показано, что количество жизнеспособных бифидобактерий и колибактерий снижалось с одинаковой закономерностью. Таким образом, исследования показали, что попытка ингибировать кишечную палочку термической обработкой не дала положительных результатов (табл.3).

Таблица 3. Влияние термического воздействия на выживаемость штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17

| Название препарата | Исходное кол-во в дозе           | Температура и время воздействия | Содержание жизнеспособных бактерий |                    |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------|
|                    |                                  |                                 | <i>B.bifidum</i> 1                 | <i>E.coli</i> М-17 |
| Бифидумбактерин    | 10 <sup>7</sup>                  | 100 °С - 1 мин                  | 10 <sup>4</sup> – 10 <sup>5</sup>  | –                  |
|                    |                                  | 56 °С - 10 мин                  | 10 <sup>4</sup> – 10 <sup>5</sup>  | –                  |
| Колибактерин       | 10x10 <sup>9</sup>               | 100 °С - 1 мин                  | –                                  | 10 <sup>8</sup>    |
|                    |                                  | 56 °С - 10 мин                  | –                                  | 10 <sup>8</sup>    |
| Бификол            | 10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> | 100 °С - 1 мин                  | Учету не подлежит*                 | 10 <sup>6</sup>    |
|                    |                                  | 56 °С - 10 мин                  |                                    | 10 <sup>6</sup>    |

Примечание: \*Учету не подлежит вследствие помутнения среды, вызванного ростом колибактерий

С целью выбора антибиотика, способного ингибировать рост кишечной палочки и не влиять на рост бифидобактерий, были проведены исследования по

определению чувствительности штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 к 19 антибиотикам разных химических групп.

Из тех антибиотиков, к которым штамм *B.bifidum* 1 устойчив (леворин, нистатин, канамицин, неомицин, левомицетин, мономицин, стрептомицин), штамм *E.coli* М-17 был чувствителен только к мономицину, стрептомицину и канамицину (табл.4). Поскольку устойчивость бифидобактерий оказалась наиболее высокой к канамицину (МИК 226,0 мкг/мл), для дальнейших исследований был выбран этот антибиотик.

При анализе чувствительности к канамицину штаммов, входящих в бификол, выявлено, что после совместного культивирования устойчивость штамма *E.coli* М-17 повышалась до МИК 128 мкг/мл (табл. 5). При выращивании штамма *B.bifidum* 1 в среде с концентрацией канамицина 128 мкг/мл снижалось количество колоний, изменялась их форма и уменьшался размер. Это не позволило использовать канамицин для ингибирования роста кишечной палочки с целью учета количества бифидобактерий в комплексном препарате бификол. По-видимому, в

процессе совместного культивирования выделяемые бифидобактериями метабо-

Таблица 4. Сравнительная чувствительность к антибиотикам штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17

| Антибиотики      | Испытуемые штаммы и степень их чувствительности к антибиотикам (МИК мкг/мл) |                          |
|------------------|---|--------------------------|
|                  | <i>B.bifidum</i> 1  | <i>E. coli</i> М-17      |
| Леворин          | > 2040; высокоустойчив  | > 2040; высокоустойчив   |
| Нистатин         | > 2040; высокоустойчив  | > 2040; высокоустойчив   |
| <b>Канамицин</b> | <b>226,0; высокоустойчив</b>  | <b>8,0; чувствителен</b> |
| Неомицин         | 75,0; высокоустойчив  | 32,0; устойчив           |
| Левомицетин      | 75,0; высокоустойчив  | 32,0; устойчив           |
| Мономицин        | 25,0; устойчив  | 8,0; чувствителен        |
| Стрептомицин     | 25,0; устойчив  | 8,0; чувствителен        |

Таблица 5. Чувствительность штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 к различным концентрациям канамицина в монокультурах и при совместном культивировании

| Способ<br>выращи-<br>вания<br>штаммов   | Концент-<br>рация ка-<br>намицина<br>мкг/мл | Степень разведения выращенных культур |                  |                  |                  |                    |                  |                  |                  |
|---|---|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
|   |   | <i>E.coli</i> М-17                    |                  |                  |                  | <i>B.bifidum</i> 1 |                  |                  |                  |
|   |   | 10 <sup>-6</sup>                      | 10 <sup>-7</sup> | 10 <sup>-8</sup> | 10 <sup>-9</sup> | 10 <sup>-6</sup>   | 10 <sup>-7</sup> | 10 <sup>-8</sup> | 10 <sup>-9</sup> |
| Моно-<br>культура                       | 256   | Р/Н                                   | Р/Н              | Р/Н              | Р/Н              | Р/Н                | Р/Н              | Р/Н              | Р/Н              |
|   | 128   | Р/Н                                   | Р/Н              | Р/Н              | Р/Н              | 7                  | 3                | Р/Н              | Р/Н              |
|   | 64  | Р                                     | Р/Н              | Р/Н              | Р/Н              | >100               | 21               | 2                | Р/Н              |
|   | 32  | Р                                     | Р                | Р                | Р/Н              | >100               | 23               | 1                | Р/Н              |
|   | 8   | Р                                     | Р                | Р                | Р                | >100               | 25               | 2                | Р/Н              |
|   | Контроль                                    | Р                                     | Р                | Р                | Р                | >100               | 20               | 2                | Р/Н              |
| Совмест-<br>ное<br>культиви-<br>рование | 256   | Р/Н                                   | Р/Н              | Р/Н              | Р/Н              | Р/Н                | Р/Н              | Р/Н              | Р/Н              |
|   | 128   | Р/Н                                   | Р/Н              | Р/Н              | Р/Н              | 9                  | 2                | Р/Н              | Р/Н              |
|   | 64  | Р                                     | Р                | Р                | Р/Н              | Р                  | Р                | Р                | Р/Н              |
|   | 32  | Р                                     | Р                | Р                | Р                | Р                  | Р                | Р                | Р                |
|   | 8   | Р                                     | Р                | Р                | Р                | Р                  | Р                | Р                | Р                |
|   | Контроль                                    | Р                                     | Р                | Р                | Р                | Р                  | Р                | Р                | Р                |

Примечание: Контроль – рост *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 в отсутствии канамицина;  
Р – рост кишечной палочки; Р/Н - роста не имеется

литы повышают устойчивость кишечной палочки к антибиотику. Аналогичное явление в отношении лактобактерий отмечено и другими исследователями (Петров Л.Н., 2008).

### **Разработка метода оценки содержания живых бифидобактерий в бификоле по активности кислотообразования штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17**

В основу этого метода заложены отличительные свойства двух микроорганизмов отдаленных таксономических групп - *B.bifidum* и *E.coli*. Как известно, бифидобактерии сбраживают глюкозу главным образом до уксусной и L+ молочной кислот. Кроме того, в небольших количествах образуются муравьиная и янтарная кислоты. Ферментативной особенностью *E.coli* является сбраживание глюкозы и других углеводов с образованием пирувата, который затем превращается в молочную, уксусную и муравьиную кислоты. (Bergey). Различный уровень кислотообразующей активности предположительно мог быть

использован для дифференциации штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 в смешанной культуре.

Активность кислотообразования изучали на монопрепаратах, производственных штаммах и ОСО. В пробирках со средой Блаурокка готовили ряд последовательных десятикратных разведений и инкубировали при температуре  $(38\pm 1)$  °С в течение 4 суток. По истечении срока инкубации из каждого разведения, в котором отмечался видимый рост, переносили по 2,5 мл суспензии в пробирки с 25 мл среды Блаурокка. Посевы инкубировали в течение 72 ч. По окончании срока инкубации во всех посевах определяли показатель кислотности по Тернеру (рис. 1). Полученные показатели активности кислотообразования культур *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17 сравнивали с количеством колоний, выросших в каждом разведении.

Установлено, что, независимо от степени разведения монопрепаратов и количества колоний, выросших в каждом учитываемом разведении в пределах  $10^1$ - $10^{-10}$ , показатели кислотности в образцах после посева из этих разведений колебались в небольших пределах для каждой серии и от серии к серии (табл.6). При этом показатель кислотообразующей активности бифидобактерий был не менее  $(100\pm 5)$  °Т, у кишечной палочки существенно ниже – не более  $(73\pm 2)$  °Т.

Следует отметить, что выявление бифидобактерий возможно также в случае,

## Среда Блаурокка

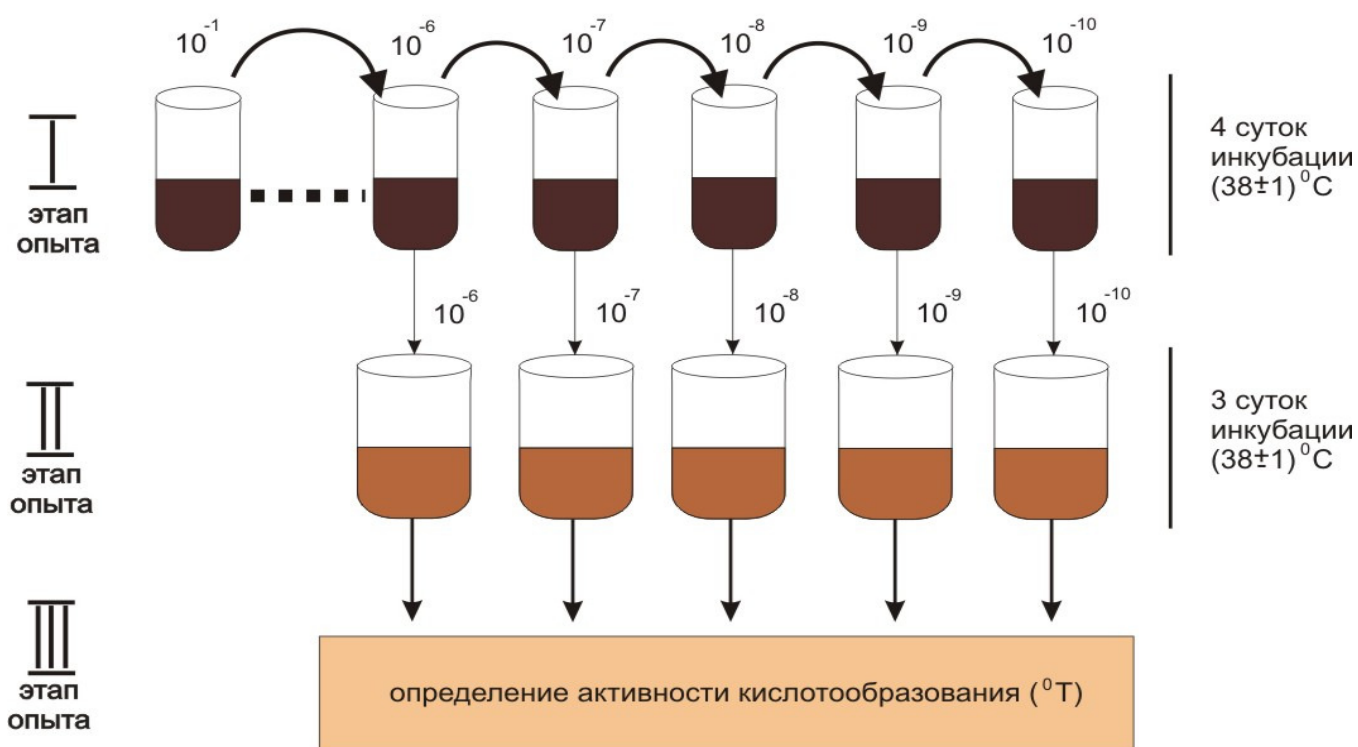


Рис.1. Схема 3-х этапов опыта по выявлению разведения бифидокола, содержащего бифидобактерии.

Таблица 6. Показатели кислотообразующей активности бифидумбактерина и колибактерина ( $^\circ\text{T}$ ) в разных разведениях при титровании культур

| Разведение | Показатели активности кислотообразования в $^\circ\text{T}$ ( $\text{M} \pm \text{m}$ ) |                       |                              |                     |                       |                              |
|------------|---|-----------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------------|
|            | Название препарата / производство   |                       |                              |                     |                       |                              |
|            | БИФИДУМБАКТЕРИН   |                       | Штамм<br><i>B. bifidum</i> 1 | КОЛИБАКТЕРИН        |                       | Штамм<br><i>E. coli</i> М-17 |
|            | МНИИЭМ<br>им.Г.Н.Габричевского  | «ИмБио»<br>Н.Новгород |                              | Тюменский<br>НИИКИП | «ИмБио»<br>Н.Новгород |                              |
| $10^{-1}$  | 160±2   | 126±4                 | 164±2                        | 72±3                | 65±2                  | 69±3                         |
| $10^{-2}$  | 148±9   | 115±8                 | 160±2                        | 73±2                | 58±3                  | 70±2                         |
| $10^{-3}$  | 160±5   | 120±6                 | 158±4                        | 70±2                | 62±5                  | 65±4                         |
| $10^{-4}$  | 165±3   | 122±8                 | 158±3                        | 68±5                | 64±4                  | 64±7                         |
| $10^{-5}$  | 157±8   | 116±8                 | 150±5                        | 70±2                | 60±3                  | 67±3                         |
| $10^{-6}$  | 148±1   | 120±9                 | 157±2                        | 72±2                | 65±2                  | 70±3                         |
| $10^{-7}$  | 133±8   | 115±5                 | 148±3                        | 73±1                | 59±3                  | 65±3                         |
| $10^{-8}$  | 125±9   | 100±5                 | 140±2                        | 73±2                | 65±5                  | 65±4                         |
| $10^{-9}$  | 22*   | 22*                   | 126±4                        | 68±2                | 62±2                  | 65±5                         |
| $10^{-10}$ | 22*   | 22*                   | 22*                          | 22*                 | 22*                   | 65±3                         |
| КОЕ/доза   | $10^7$  | $10^7$                | $10^7$                       | $10^8$              | $10^8$                | $10^{10}$                    |

Примечание: \* кислотность среды

когда для определения кислотности берут разведение препарата, содержащее только одну видимую колонию. При этом культура, выросшая через 72 часа, закисляет среду до показателя кислотности, характерного для роста бифидобактерий - 100 °Т и более (табл. 7). Рост кишечной палочки, независимо от засеянной концентрации, закисляет среду не более чем до 75 °Т.

Таблица 7. Показатель кислотности (°Т) среды в зависимости от количества выросших колоний бифидобактерий в дозе

| производство                    | № образца | Высев из разведения 10 <sup>-8</sup>               |                        |
|---------------------------------|-----------|--|------------------------|
|                                 |           | Количество бифидобактерий (КОЕ x 10 <sup>7</sup> ) | Показатель кислотности |
| «ИмБио»<br>Н.Новгород           | 1         | 2  | 100                    |
|                                 | 2         | 1  | 100                    |
|                                 | 3         | 1  | 102                    |
|                                 | 4         | 4  | 105                    |
|                                 | 5         | 3  | 105                    |
| МНИИЭМ<br>им. Г.Н.Габричевского | 1         | 5  | 130                    |
|                                 | 2         | 7  | 129                    |
|                                 | 3         | 4  | 125                    |
|                                 | 4         | 6  | 130                    |
|                                 | 5         | 5  | 119                    |
| Штамм<br><i>B.bifidum</i> I     | 1         | 8  | 130                    |
|                                 | 2         | 9  | 130                    |
| ОСО<br>бифидум-<br>бактерина    | 1         | 1  | 125                    |
|                                 | 2         | 3  | 126                    |
|                                 | 3         | 2  | 120                    |
|                                 | 4         | 2  | 130                    |
|                                 | 5         | 2  | 119                    |

Разработанный метод определения кислотообразования единичными колониями апробирован на 31 серии бификола разных производств. Полученные показатели варьировали от серии к серии и в ряде случаев не соответствовали предъявляемым требованиям НД (рис 2). Так, только 5 серий МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского и 2 серии Харьковского предприятия содержали количество бифидобактерий 10<sup>7</sup>, соответствующее НД. Низкое содержание бифидобактерий в бификоле отмечалось на фоне высокого содержания кишечной палочки.

Таким образом, разработанный метод информативен для контроля содержания живых бифидобактерий в дозе бификола, поскольку показатель

кислотообразования 100 °Т гарантировано подтверждает их присутствие в данном разведении препарата. Учитывая, что данный метод трудоемок и длителен, возникла необходимость разработать более удобный способ определения живых бифидобактерий в бификоле с использованием ингибитора роста кишечной палочки.

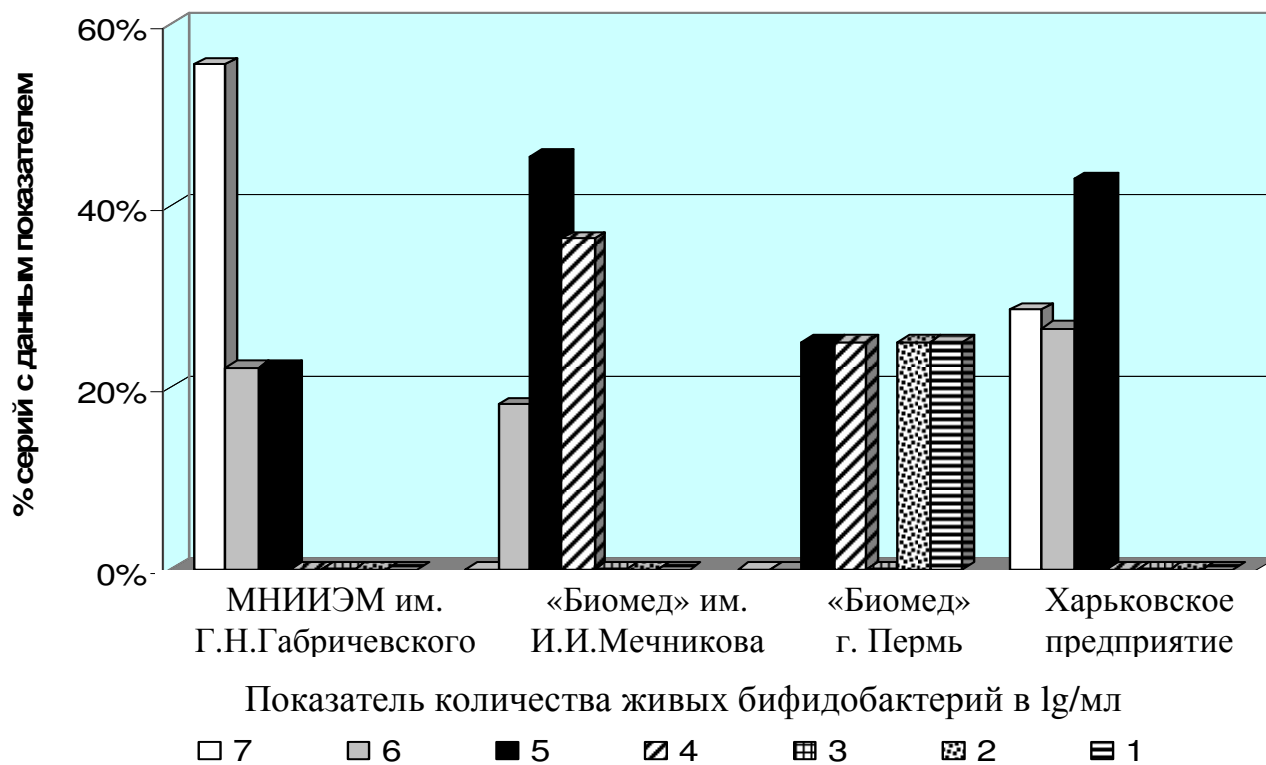


Рис.2. Оценка качества бификола различных производств при использовании для контроля метода активности кислотообразования

**Чувствительность штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17, входящих в бификол, к азиду натрия и использование его ингибирующей активности в отношении кишечной палочки для учета роста бифидобактерий**

При подборе ингибитора роста кишечной палочки в смешанных культурах мы остановили свой выбор на азиде натрия, который известен подавляющим действием в отношении грамотрицательных бактерий в условиях плотных сред. Поэтому необходимо было изучить свойства азиды натрия в полужидкой среде Блаурокка и подобрать такую концентрацию, которая не влияла бы на рост бифидобактерий.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что азид натрия в концентрации 0,5; 1,0; 1,5 мг на 10 мл среды Блаурокка не оказывал существенного влияния на жизнеспособность бифидобактерий, в концентрации 2 и 2,5 мг угнетал, а в концентрации 3 и 3,5 мг полностью ингибировал его. В опытах с колибактерином установлено, что между количеством жизнеспособных колибактерий и концентрацией азидата натрия, необходимой для подавления роста кишечной палочки, существует прямая зависимость. Так, для ингибирования роста кишечной палочки в количестве  $10^3$  КОЕ, требуется 0,6 мг азидата натрия на 10 мл среды Блаурокка, а при содержании  $10^7$  КОЕ нужно 1,6 мг ингибитора.

В результате исследования подобрана концентрация азидата натрия 1 мг на 10 мл среды Блаурокка, которая не влияла на жизнеспособность бифидобактерий и была достаточной для полного угнетения роста кишечной палочки в учитываемых разведениях ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ ). В опыте с экспериментальным вариантом бификола показано, что количество КОЕ бифидо- и колибактерий в дозе соответствовало их количеству в монопрепаратах (табл.8). Так, количество бифидоколоний в среде Блаурокка с азидом натрия и без него в бифидумбактерине и в бификоле в среде с азидом натрия было одинаковым. Количество КОЕ колибактерий в дозе бифико-

Таблица 8. Оценка жизнеспособности бифидо- и колибактерий в моно- и комплексном препаратах

| Препарат                | Среда Блаурокка    | Количество колоний <i>B.bifidum</i> 1 и рост <i>E.coli</i> М-17 в разведениях: |           |           |           |           |           |           |           |           |            |
|-------------------------|--------------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
|                         |                    | $10^{-1}$  | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ | $10^{-7}$ | $10^{-8}$ | $10^{-9}$ | $10^{-10}$ |
| <b>КОЛИ-БАКТЕРИН</b>    | без азидата натрия | Р  | Р         | Р         | Р         | Р         | Р         | Р         | Р         | Р         | Р/Н        |
|                         | с азидом натрия    | слабый рост  |           |           | Р/Н       | Р/Н       | Р/Н       | Р/Н       | Р/Н       | Р/Н       | Р/Н        |
| <b>БИФИДУМ-БАКТЕРИН</b> | без азидата натрия | Учет невозможен вследствие большого количества <i>B.bifidum</i> 1              |           |           |           |           | >100*     | 20*       | 1*        | Р/Н       | Р/Н        |
|                         | с азидом натрия    | Учет невозможен вследствие большого количества <i>B.bifidum</i> 1              |           |           |           |           | >100*     | 22*       | 1*        | Р/Н       | Р/Н        |
|                         | без азидата натрия | Р  | Р         | Р         | Р         | Р         | Р         | Р         | Р         | Р         | Р/Н        |

|                 |                 |   |       |     |    |     |     |
|-----------------|-----------------|---|-------|-----|----|-----|-----|
| <b>БИФИ-КОЛ</b> | с азидом натрия | Учет невозможен вследствие большого количества <i>B.bifidum</i> 1 | >100* | 20* | 2* | Р/Н | Р/Н |
|-----------------|-----------------|---|-------|-----|----|-----|-----|

Примечание: Р - рост *E.coli* М-17; Р/Н- роста не имеется

\* количество колоний *B.bifidum* 1

ла и колибактерина было одинаковым при посеве на среду Эндо и в среду Блаурокка без азида натрия.

Таким образом, разработан простой метод количественного учета жизнеспособных бифидо- и колибактерий в комплексном препарате бификол, доказана его достоверность и информативность.

В связи с тем, что азид натрия добавляли в среду Блаурокка ex-temproe, необходимо было разработать условия изготовления модифицированной среды с азидом натрия, готовой к применению для контроля количества живых бифидо- и колибактерий в производстве (отработать режим стерилизации), а также проверить чувствительность среды Блаурокка с ингибитором. Для этого в 1 литр среды Блаурокка вносили 100 мг азида натрия и перемешивали, получая при этом среду с 0,01 % концентрацией ингибитора. Среду разливали в пробирки по 10 мл и стерилизовали. Нами апробированы разные режимы стерилизации (120 °С-15 мин; 112 °С - 20 мин; 110 °С - 30 мин) и доказано, что автоклавирование при температуре 110 °С в течение 30 минут не разрушает азида натрия, сохраняет оптимальные ростовые свойства для бифидобактерий и высокую ингибирующую активность в отношении кишечной палочки. Пять партий питательной среды оценивали в опытах по контролю жизнеспособности бифидобактерий на 5-и сериях коммерческого бификола, по 3 образца от каждой серии.

Модифицированная питательная среда Блаурокка с азидом натрия была апробирована на предприятиях отрасли и признана оптимальной по составу и способу приготовления для выявления роста бифидобактерий в двухкомпонентном препарате бификол.

С помощью разработанного метода контроля проведена оценка стандартности коммерческих серий бификола по показателю количества КОЕ бифидобактерий в дозе препарата (рис. 3). Показано, что все отконтролированные

серии бификола (n=40) отвечали требованиям НД ( $10^7$  КОЕ/дозе) по количественному содержанию жизнеспособных колибактерий и только 11 соответствовали по этому показателю для бифидобактерий. В 29 сериях содержание КОЕ в дозе бифидобактерий было ниже регламентированного показателя.

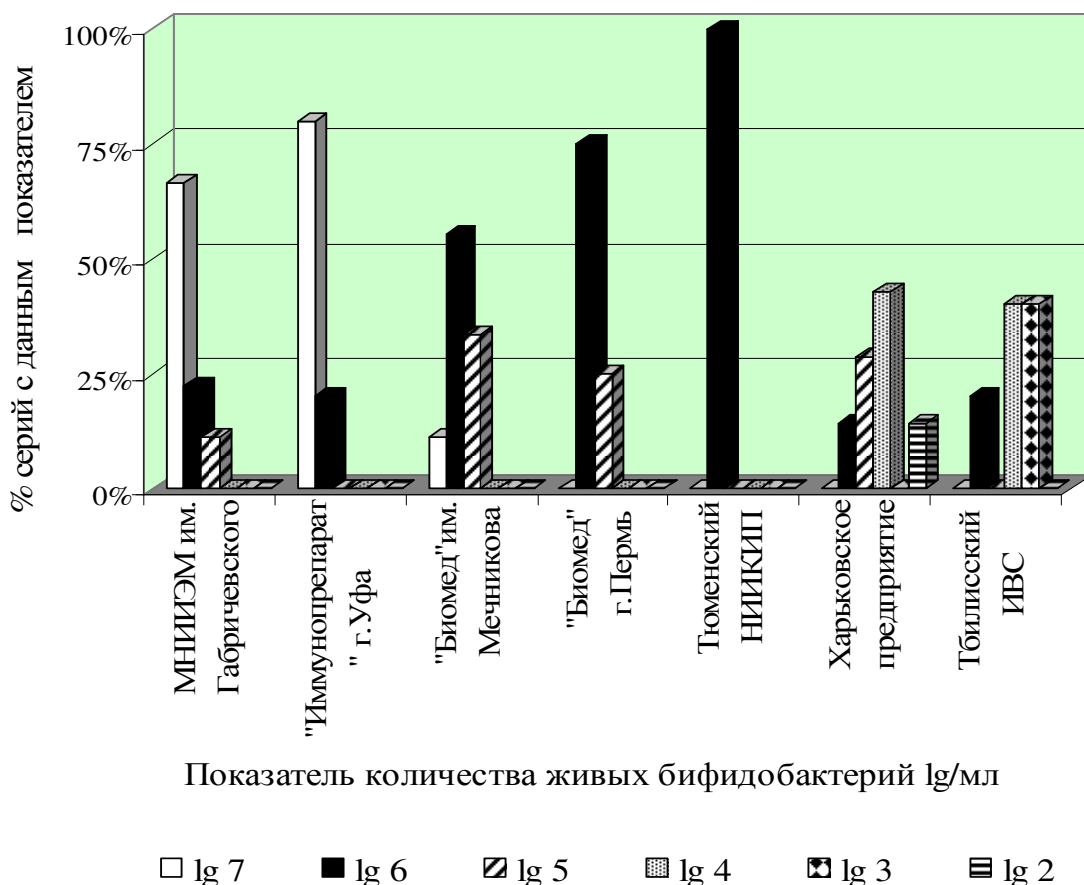


Рис.3 Оценка качества бификола различных производств при использовании нового метода контроля

Внедрение в производство нового метода контроля бификола позволило предприятиям выявить нестандартность технологии изготовления препарата вследствие неточности в определении количества жизнеспособных бифидобактерий на этапах технологического процесса и разработать меры по усовершенствованию производства бификола. Среди отконтролированных в ГИСК им. Л.А. Тарасевича 87 коммерческих серий бификола, приготовленных после внедрения нового метода контроля, 66 соответствовали требованиям НД по содержанию КОЕ бифидобактерий в дозе и только 21 серия (24,1 %) не

соответствовала. Эти серии представлены на предварительный контроль в связи с освоением нового производства и были забракованы (рис. 4).

Таким образом, разработанные и внедренные в производство новый метод контроля специфической активности бификола (по жизнеспособности) и ОСО бифидумбактерина способствовали усовершенствованию и стандартизации на каждом предприятии технологии совместного культивирования бифидо- и колибактерий, что отразилось на их соотношении в готовом препарате и привело к повышению качества и стандартности бификола.

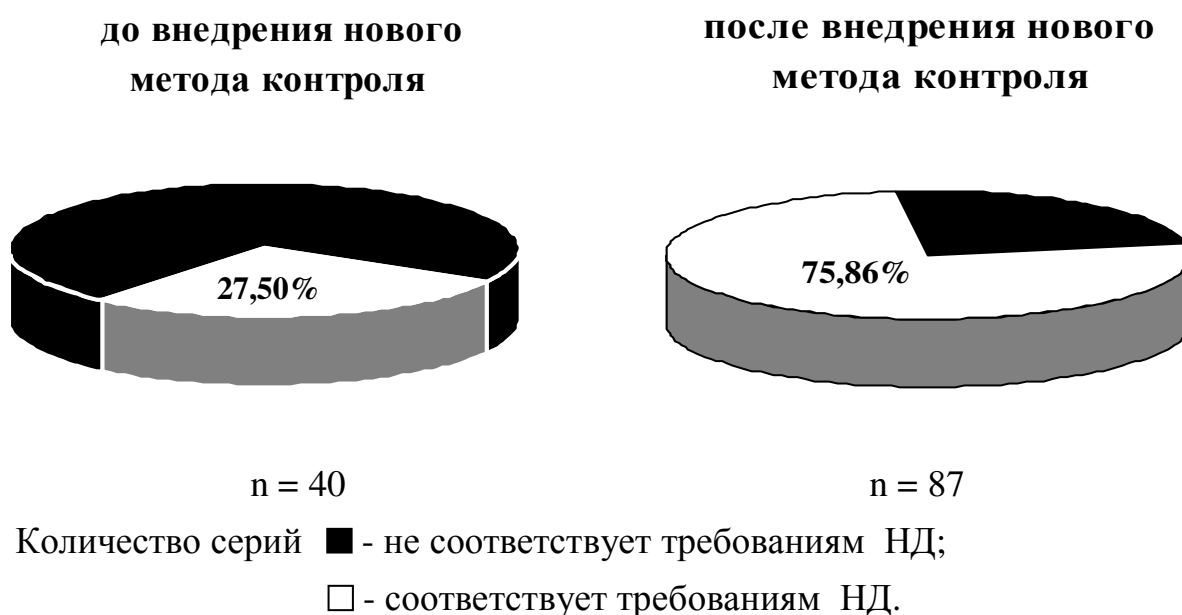


Рис. 4. Эффективность внедрения нового метода контроля бификола при определении количества живых бифидобактерий ( $p < 0,05$ ).

### Выводы

1. Установлено, что метод контроля по ВФС 42-65ВС-86 двухкомпонентного пробиотика бификол не обеспечивал точного учета содержания живых бифидо- и колибактерий в дозе препарата.

2. Выявлены различия по кислотообразующей активности у штаммов *B.bifidum* 1 (не ниже 100 °Т) и *E.coli* М-17 (не выше 75 °Т), что служит одним из надежных показателей для определения количества живых бифидо- и колибактерий в дозе препарата бификол.

3. Предложена готовая к применению на производстве модифицированная среда Блаурокка с добавлением азидата натрия, ингибирующая рост штамма *E.coli*

М-17 в смешанных культурах и сохраняющая ростовые свойства штамма *B.bifidum* 1. Это позволяет надежно определять количество бифидо- и колибактерий в двухкомпонентном препарате бификол.

4. Разработан, апробирован и утвержден Отраслевой стандартный образец (ОСО-42-28-161-89) бифидумбактерина, который обеспечивает точный учет содержания живых *B.bifidum* 1 в моно- и комплексных бифидосодержащих препаратах (бифидумбактерин, бификол, бифилиз, бифидумбактерин форте и т.д.).

5. Показано, что ингибирующее действие высоких температур и различия по чувствительности к антибиотикам разных химических групп не могут быть использованы для надежного разделения бифидо- и колибактерий в препарате бификол.

6. Разработанные методы оценки количества жизнеспособных бифидо- и колибактерий (кислотообразующая активность, определение КОЕ штаммов на модифицированной среде Блаурокка с азидом натрия и использование ОСО бифидумбактерина) обеспечили стандартизацию основных этапов технологии совместного культивирования штаммов *B.bifidum* 1 и *E.coli* М-17. Это положительно отразилось на количественном соотношении бифидо- и колибактерий в готовом препарате и привело к повышению качества и стандартности производственных серий бификола на всех выпускающих его предприятиях.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1.Евтухова Л.Н., **Евлашкина В.Ф.**, Скорикова И.Г. Качество препаратов из нормальной микрофлоры кишечника человека //Сб.научн.тр. Ташкентского НИИВС "Медицина", 1988 - С. 74-79.

2. Евтухова Л.Н., Скорикова И.Г., **Евлашкина В.Ф.** К вопросу об усовершенствовании метода контроля содержания бифидобактерий в бификоле // Сб.научн.тр. Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. М.,1989 - С. 98-105.

3. Чупринина Р.П., Евтухова Л.Н. **Евлашкина В.Ф.** Проблемы стандартизации препаратов из нормальной микрофлоры организма человека //Тезисы докладов VI Всероссийского съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. Н.Новгород, 1991.- С. 135-136 .

4. **Евлашкина В.Ф.**, Чуприна Р.П., Евтухова Л.Н. Метод оценки жизнеспособных бифидобактерий в препарате "Бификол" //Микробиол. журн., Украина, 1993, Т.55, № 5, с. 84-88.

5. **Евлашкина В.Ф.**, Чуприна Р.П., Евтухова Л.Н. Разработка метода оценки жизнеспособных бифидобактерий в бификоле //Ж. Клиническая лабораторная диагностика.- 1993.- № 4.- С. 73-74.

6. Чуприна Р.П., Осипова И.Г., **Евлашкина В.Ф.** Препараты для профилактики и лечения дисбактериозов различной этиологии. //В кн.: «Актуальные проблемы создания и применения иммунобиологических препаратов для диагностики и профилактики инфекционных болезней. – Пермь. - 1993, Т.1 - С. 264-279.

7. **Евлашкина В.Ф.**, Чуприна Р.П., Осипова И.Г., Лукьянова О.Ю., Рыбачок А.В. К вопросу о стандартизации технологии изготовления бификола // Роль иммунобиологических препаратов в современной медицине. Материалы междунар. симпозиума, посвященного 150-летию со дня рождения И.И. Мечникова и 90-летию Уфимского НИИВС НПО «Имунопрепарат».Уфа, 1995, ч.1, с.179-182.

8. Чуприна Р.П., Конькова Н.К., **Евлашкина В.Ф.**, Рыбачок А.В. Перспективы повышения качества препаратов эубиотиков//Современная вакцинология. Тез. док. 2 Междунар. конф., посвящ. 100-летию Пермского НПО «Биомед» Пермь, 16-18.06.1998. с.143.

9. Колганова Т.В., Ватанабэ Х., Далин М.В., Васильева Е.А., Осипова И.Г., Лившиц В.А., Лукьянова О.Ю., **Евлашкина В.Ф.** К вопросу о механизме защитного действия пробиотиков//Сб.тр.: Биомедицинские технологии. Вып. 16, - М., 2001. с.23-29.

10. Чуприна Р.П., Ладыгина А.В., **Евлашкина В.Ф.** Пробиотики и механизм их лечебного действия//Международ. конгресс «Ликвидация и элиминация инфекционных болезней - прогресс и проблемы» С-Петербург, 3-5 сентября 2003,- С16-18.

11. Чуприна Р.П., Осипова И.Г., **Евлашкина В.Ф.**, Ладыгина А.В. Доклинические испытания новых пробиотиков//Матер. Международной конференции.: "Пробиотики, пребиотики, симбиотики и функциональные продукты питания.- Москва, 2004.-С. 10.

12. Осипова И.Г., **Евлашкина В.Ф.**, Васильева Е.А. Классификация пробиотиков, достоинства и недостатки//Материалы 3-го конгресса педиатров-инфекционистов России: Актуальные вопросы инфекционной патологии у детей. Инфекция и иммунитет. Москва 8-10.12.2004. - С.247.

13. Чуприна Р.П., Осипова И.Г., **Евлашкина В.Ф.**, Ладыгина А.В. Доклиническая оценка безопасности (безвредности) производственных штаммов и лекарственной формы пробиотиков//Тез. Всероссийской научно-практической конф. «Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» М., 2006, с.105.

14. Терешкина Н.В, Григорьева Л.В., Осипова И.Г., Чуприна Р.П., **Евлашкина В.Ф.** Исследование «острой» и «хронической» токсичности -

необходимый элемент доклинического изучения пробиотиков//Клиническое питание.- 2007.- № 1-2.- С. 69.

15. Осипова И.Г., **Евлашкина В.Ф.**, Терешкина Н.В., Васильева Е.А. Коррекция экспериментального дисбактериоза пробиотиками// Вестник Российского университета дружбы народов. 2008.- № 1.- С. 91-95.

16. Осипова И.Г., Васильева Е.А., **Евлашкина В.Ф.** Дисбиозы кишечника// Методические рекомендации. М.: Изд. РУДН, 2008, 39 с.

17. Чуприна Р.П., Осипова И.Г., **Евлашкина В.Ф.**, Ладыгина А.В., Терешкина Н.В, Абрамцева М.В. Система предварительного доклинического изучения безопасности пробиотиков//Тез. Всероссийской научно-практической конф. «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» 11-12 ноября М. 2008 с.124.

### **Список сокращений**

ВФС - временная фармакопейная статья

КД-5 - казеиново- дрожжевая среда

КОЕ - колониеобразующая единица

МИК - минимальная ингибирующая концентрация

МНИИЭМ - Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

МПБ - мясопептонный бульон

НД - нормативная документация

НИИКИП - научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии

ОБК - отдел бактериологического контроля

ОСО - отраслевой стандартный образец

РП - регламент производства

<sup>0</sup>T - градусы Тернера

ФС - фармакопейная статья

ФСП - фармакопейная статья предприятия

