

С.В. Бірюкова¹, О.В. Колокова¹, П.Д. Пашнев², М.Л. Сятиня³, В.П. Попович³, Н.О. Федоритенко³

ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЧИСТОТИ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ «МІКОДАР»

1 – Харківська медична академія післядипломної освіти

2 – Національний фармацевтичний університет

3 – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Ключові слова: мікробіологічні дослідження, клас чистоти, поживне середовище.

Ключевые слова: микробиологические исследования, класс чистоты, питательная среда.

Keywords: microbiological researches, class of cleanness, nourishing environment.

Проведено мікробіологічні дослідження нового лікарського засобу „Мікодар”, одержаного на основі біомаси гриба Шіітаке.

Проведены микробиологические исследования нового лекарственного средства «Микодар», полученного на основе биомассы гриба Шиттаке.

Microbiological researches of new remedy of “Mikodar” are conducted on the basis of biomass of mushroom of Shiitake.

Вивчення МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЧИСТОТИ розробленого лікарського засобу (ЛЗ) проводилось на базі кафедри клінічної імунології та мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти під керівництвом проф. С.В. Бірюкової та доц. О.В. Колокової згідно методичних рекомендацій та вимог ДФУ I видання 1.1.2004 категорія 2 (п.5.1.4 N) [1,3].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Визначення показника «мікробіологічна чистота» проводились як безпосередньо після виготовлення лікарської форми (ЛФ) так і в процесі їх зберігання: за природних умов при різних температурних режимах: +2+8°C; +8+15°C; +15+25°C та умов прискореного старіння при +40°C та +60°C протягом часу, що відповідає 24 місяцям природного зберігання. [2].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для перевірки придатності методики використовували музейні штами тест-культур та поживні середовища, які наведені в *табл. 1*

Таблиця 1

Тест-культури та поживні середовища для проведення досліджень

Тест-мікроорганізми	Поживні середовища
Bacillus subtilis ATCC 6633	Поживне середовище № 1
Escherichia coli ATCC 25922	Поживне середовище № 1 (густе), № 3 (рідке), № 4 (густе)
Staphylococcus aureus ATCC 6538	Поживне середовище № 1 (густе), № 10 (рідке), № 8 (рідке)
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	Поживне середовище № 8 (рідке), № 9 (густе)
Salmonella aboni УКМ В - 921	Поживне середовище № 3 (рідке), № 5 (густе), № 12 (густе), № 13 (густе)
Candida albicans ATCC 885-653	Поживне середовище № 2
Aspergillus niger ATCC 16404	Поживне середовище № 2

Для тестування використовували робочі суспензії мікроорганізмів близько 100 колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 мл та розчини розведень:

1. Фосфатний буферний розчин (ФБР) з пептоном та NaCl рН 7,0 – для одержання емульсії.

2. Рідке поживне середовище № 15 – для виявлення індолу.

3. Рідке поживне середовище № 7 - для визначення відновлення нітратів у нітрити.

4. Рідке поживне середовище № 14 - для виявлення ферментації цитрату.

Перед випробуванням перевіряли ростові властивості поживних середовищ та контролювали їх стерильність. Дослідження проводили методом прямого висівання на поживне середовище.

I. Перевірка придатності методики визначення загального числа бактерій та грибів (ДФУ I вид., п. 2.6.12.)

Для перевірки придатності методики визначення загального числа бактерій та грибів ЛЗ розводили у співвідношенні 1:10 та 1:100 (5 зразків) у фосфатному буферному розчині з рН 7,0, який містив 4 % твіну-80 з натрію хлоридом і пептоном. У кожний зразок додавали суспензії монокультур 100 КУО/мл. Готували зразки досліджуваного препарату в розведенні 1:10, 1:100 та контрольні зразки, в яких замість препарату в розведенні 1:10 та 1:100 був підігрітий до 40 – 45°C ФБР з рН 7,0. Із досліджуваних та контрольних зразків, які містили суспензії Bacillus subtilis ATCC 6633, Escherichia coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus ATCC 6538, відбирали по 1 мл в чашки Петрі і заливали густим поживним середовищем № 1, яке попередньо розплавляли на водяній бані при температурі + 42° - 45° С.

Із досліджуваних та контрольних зразків, які містили суспензії грибів Candida albicans ATCC 885-653 та Aspergillus niger ATCC 16404, відбирали по 1 мл в чашки Петрі та заливали густим поживним середовищем № 2, попередньо розплавленим при + 42° + 45° С.

Результати перевірки придатності методики визначення загального числа бактерій та грибів методом прямого висівання колонієутворюючих одиниць (КУО) представлені в *табл. 2*.

Результати перевірки придатності методики визначення загального числа бактерій та грибів методом прямого висівання

Назва зразка	Середнє число КУО в перерахунку на 10 мл зразка				
	Bacillus subtilis ATCC 6633	Escherichia coli ATCC 25922	Staphylococcus aureus ATCC 6538	Candida albicans ATCC 885-653	Aspergillus niger ATCC 16404
Суспензія мікроорганізмів + препарат 1:10	90,92	80,82	89,90	84,98	85,99
Суспензія мікроорганізмів + препарат 1:100	94,97	79,87	85,93	0	0
Контрольна суспензія без препарату	91,98	87,94	93,99	84,90	82,88

Аналіз отриманих результатів досліджень лікарського засобу «Мікодар» показав, що препарат у розведенні 1:10 та 1:100 не має антимікробної дії до Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus на поживному середовищі №1. До Candida albicans та Aspergillus niger на поживному середовищі №2 препарат в розведенні 1:10 не виявляє антимікробної дії.

II. Перевірка придатності методики при випробуванні на окремі види мікроорганізмів (ДФУ 2001, доп. 1, 2004, п.2.6.13.)

Для дослідження готували суспензії монокультур Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, Escherichia coli ATCC 8539, Salmonella abony УКМ В – 921 (1000 КУО/МЛ). Відбирали рівні об'єми і використовували 0,4 мл змішаної культури (100 КУО кожного тест-штаму мікроорганізму) як інокулянт.

Для випробування на наявність Enterobacteriaceae 10 мл препарату поміщали в стерильний флакон ємкістю 250 мл і доводили об'єм до 100 мл ФБР з пептоном та натрію

хлоридом рН 7,0 і отримали зразок А (розведення 1:100). 10 мл зразка А переносили в 100 мл рідкого поживного середовища №3, додаючи 0,4 мл інокуляту.

Для випробування на наявність Staphylococcus aureus ATCC 6538 та Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 10 мл препарату поміщали в стерильний флакон ємкістю 250 мл і доводили до 100 мл ФРБ з пептоном та натрію хлоридом рН 7,0 та отримали зразок В (розведення 1:100). 10 мл зразка В переносили в 100 мл рідкого поживного середовища №8, додаючи 0,4 мл інокуляту. Результати перевірки придатності методики наведені в табл. 2.

Результати, що наведені в таблиці 2, показали, що при прямому висіванні на поживних середовищах №3, №4, 5, 8, 9, 10 в присутності досліджуваного препарату в розведенні 1:10, ріст тест-штамів не пригнічується, тобто препарат не виявляє антимікробної дії. В присутності та відсутності досліджуваного зразка були отримані позитивні результати ідентифікаційних тестів, що підтвердили придатність методики для кожного з тест-мікроорганізмів.

Таблиця 2

Результати перевірки придатності методики висівання на рідке поживне середовище №3 та №8 (розведення 1:10)

Тест-штами	Поживні середовища		Наявність росту на середовищах				КУО
	рідкі	густі	Дослід		Контроль		
			на рідких	на густих	на рідких	на густих	
Escherichia coli ATCC 25922	№3	№4	+	+	+	+	87,94
Salmonella abony УКМ В - 921	№3	№5	+	+	+	+	99,102
Staphylococcus aureus ATCC 6538	№8	№10	+	+	+	+	93,99
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	№8	№9	+	+	+	+	73,78

Примітка: + - наявність росту.



Результати дослідження ЛЗ «Мікодар» за показником «мікробіологічна чистота»

№ з/п	Терміни та умови зберігання	ЛЗ «Мікодар» в капсулах	
		№ зразка	Сумарна кількість бактерій і грибів
1.	Безпосередньо після виготовлення	1	менше 100
2.	Зберігання 3 роки за природніх умов		
2.1.	при +15 +25 °С	1а	менше 100
2.2.	при +2 +8 °С	1б	менше 100
2.3.	при +8 +15 °С	1в	менше 100
3.	Умови прискореного старіння, що відповідає 24 місяцям природного зберігання		
3.1.	при +40 °С протягом 50 днів	1д	менше 100
3.2.	при +60 °С протягом 14 днів	1е	менше 100

Наступним етапом наших досліджень було проведення випробування, згідно розроблених методик, за показником «мікробіологічна чистота» зразків лікарського засобу «Мікодар», які зберігалися за різних умов. Випробування проводили згідно вимог ДФУ 2001, доп. 1, 2004, п.2.6.13., категорія 3А (5.1.4 N).

Для визначення загального числа бактерій 10 г препарату переносили в стерильний мірний циліндр місткістю 250 мл і доводили об'єм до 100 мл стерильним ФБР с пептоном та натрію хлоридом рН 7,0. рН зразка доводили до 7,0. (зразок А). Відбирали двічі по 1 мл зразка А, переносили у чашки Петрі, заливали 15-20 мл розплавленого на водяній бані при + 42°+45° С густого поживного середовища № 1.

Для визначення загального числа грибів 10 г препарату переносили в стерильний мірний циліндр місткістю 250 мл і доводили об'єм до 100 мл стерильним ФБР з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0. рН зразка доводили до 7,0 (зразок В). Відбирали двічі по 1 мл зразка 2, переносили в дві чашки Петрі, заливали 15 - 20 мл розплавленого при + 42°+45° С густого поживного середовища № 2.

Для визначення бактерій родини Enterobacteriaceae 10 г препарату переносили у стерильний мірний флакон, доводили об'єм до 100 мл стерильним ФБР з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0. рН зразка доводили до 7,0 (зразок С). 10 мл зразка С (у розведенні 1:10) вносили в 100 мл рідкого поживного середовища № 3.

Для визначення бактерій видів *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus* 10 мл зразка С (у розведенні 1:10) вносили у 100 мл поживного середовища № 8.

Результати дослідження ЛЗ «Мікодар» за показником

«мікробіологічна чистота» наведені в табл. 3.

Отже, встановлено, що в лікарському засобі «Мікодар» загальне число життєздатних аеробних бактерій не перевищує 100 в 1 г бактерій та грибів сумарно; не виявлено *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* та представників ентеробактерій та деяких інших грамнегативних бактерій, що відповідає вимогам ДФУ. Досліджувані терміни та умови зберігання лікарського засобу «Мікодар» не впливають на показник «мікробіологічна чистота».

ВИСНОВКИ

1. Розроблено методику випробувань опрацьованого лікарського засобу «Мікодар», щодо вивчення показника «мікробіологічна чистота». Встановлено, що оптимальним є метод прямого висівання для визначення загального числа життєздатних аеробних бактерій та грибів.

2. Встановлено, що в лікарському засобі «Мікодар» загальне число життєздатних аеробних бактерій не перевищує 100 в 1 г бактерій та грибів сумарно; не виявлено *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* та представників ентеробактерій та деяких інших грамнегативних бактерій, що відповідає вимогам ДФУ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство „Науково експертний фармакопейний центр.” – 1-е вид. Харків: ПІРЕГ, 2001.- с.101-138.

2. Доклинические исследования лекарственных препаратов: метод.рек./ под ред. чл.-кор. НАН Украины О.В. Стефанова.- К.: Авицена, 2001.- 526.

3. Breene W. Nutritional and medicinal value of special mushrooms / W. Breene // J. Food Prod. – 1990. – № 53. – P. 883-894.

Відомості про авторів: М. Л. Сятиня, д-р фармац. наук, завідувач кафедри аптечно та промислової технології ліків, Національний медичний університет м. О.О. Богомольця, м.Київ, 8-044-235-90-66; П.Д Пашнев, д-р фармац. наук, проф., Національний фармацевтичний університет, м. Харків, 8-0572-67-88-52; В.П Попович, канд. фармац. наук, доц., Н.О Федоритенко, асп. Національний медичний університет м. О.О. Богомольця, м.Київ, 8-044-235-90-66