

## БІОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ КРЕМУ З ЦЕФТРИАКСОНОМ І НІМЕСУЛІДОМ ЗА ПОКАЗНИКОМ «МІКРОБІОЛОГІЧНА ЧИСТОТА»

**Ключові слова:** мікробіологічна чистота, інактиватор, поживне середовище, мікроорганізм, тест-штам, мембранний фільтр, лікарський засіб, крем, німесулід, цефтриаксон

Процес виробництва лікарських засобів (ЛЗ) має виключати можливі причини мікробної контамінації. Тому необхідним є регулювання тих факторів, що заздалегідь впливають на якість ЛЗ. Мікробіологічна чистота, що регламентується Державною фармакопеею України (ДФУ), є важливим показником гарантії якості готової продукції.

Випробування мікробіологічної чистоти опрацьованого м'якого лікарського засобу (МЛЗ) проводиться з метою визначення кількості живих анаеробів (бактерій і грибів), а також наявності патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів:

*St. aureus*, *Ps. aeruginosa*, види роду *Clostridium*, родини *Enterobacteriaceae* [1, 3].

### Об'єкти та методи дослідження

Об'єктом дослідження є крем антибактеріальної та протизапальної дії із цефтриаксоном та німесулідом.

Дослідження показника «мікробіологічна чистота» проводили згідно з вимогами ДФУ [1, 2].

Визначення показника «мікробіологічна чистота» проводили як безпосередньо після виготовлення лікарської форми (ЛФ), так і в процесі її зберігання; в природних умовах (на момент дослідження ЛФ, витримано 3 роки зберігання) при двох температурних режимах: 2–8 °С; 18–25 °С. При вивченні показника «мікробіологічна чистота» ЛЗ антибактеріальної дії необхідною умовою є нейтралізація антибактеріальної дії препарату. Як нейтралізуючий агент використовували: твін-80, лецитин яєчний 0,3 %, гістидину гідрохлорид 0,1 %.

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

### Таблиця 1

Поживні середовища відносно тест-культур

Тест-мікроорганізм	Поживне середовище
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702	Поживне середовище № 1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8539	Поживне середовище № 1 (густе), № 3 (рідке), № 4 (густе)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Поживне середовище № 1 (густе), № 10 (рідке), № 8 (рідке)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Поживне середовище № 8 (рідке), № 9 (густе)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 144	Поживне середовище № 3 (рідке), № 5 (густе), № 12 (густе), № 13 (густе)
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	Поживне середовище № 2
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Поживне середовище № 2

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

розчин (ФБР) з пептоном та NaCl pH 7,0 – для одержання емульсії, та рідке поживне середовище № 15 – для виявлення індолу.

Перед випробуванням перевіряли ростові властивості поживних середовищ та контролювали їх стерильність.

Дослідження проводили методом прямого висівання на поживне середовище.

Обов'язковим етапом проведених досліджень була перевірка придатності методики визначення загального числа бактерій та грибів [1, 2].

Для цього ЛЗ розводили у співвідношенні 1:10 (5 зразків) у ФБР з pH 7,0, який містив 4 % твіну-80 з натрію хлоридом і пептоном. У кожний зразок додавали суспензії монокультур 100 КУО/мл.

Готували контрольні зразки досліджуваних препаратів у розведенні 1:10 підігрітим до температури 40–45 °С ФБР з твіном-80 (4 %) з pH 7,0. Із досліджуваних та контрольних зразків, які містили суспензії *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* ATCC 8539, *St. aureus* ATCC 6538, відбирали по 1 мл у чашки Петрі і заливали густим поживним середовищем № 1, яке розплавляли на водяній бані при температурі 42–45 °С.

Із досліджуваних та контрольних зразків, які містили суспензії грибів *Candida albicans* ATCC 885-653 та *Asp. niger* ATCC 16404, відбирали по 1 мл у чашки Петрі та заливали густим поживним середовищем № 2, попередньо розплавленим на водяній бані при температурі 42–45 °С.

### Результати досліджень та їх обговорення

Результати перевірки придатності методики визначення загального числа бактерій та грибів методом прямого висівання КУО представлено в табл. 2.

Т а б л и ц я 2

Придатність методики визначення загального числа бактерій та грибів методом прямого висівання

Назва зразка	Середнє число КУО в перерахунку на 10 мл зразка				
	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>E. coli</i> ATCC 8539	<i>St. aureus</i> ATCC 6538	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	<i>Asp. niger</i> ATCC 16404
Суспензія мікроорганізмів + досліджувані ЛЗ 1:10	0	0	0	33	59
Контрольна суспензія без препарату	96	78	48	38	60

Аналіз даних свідчить, що досліджувані ЛЗ у розведенні 1:10 мають антимікробну дію до *E. coli*, *B. cereus*, *St. aureus* на поживному середовищі № 1. До *Candida albicans* та *Asp. niger* на поживному середовищі № 2 – не проявляють антимікробної дії.

Для усунення антимікробної дії вивчено можливість використання методу розведення та комплексів різних інактиваторів: інактиватор № 1 – твін-80 – 4% + лецитин – 0,3% + гістидину гідрохлорид – 0,1%; інактиватор № 2 – твін-80 – 4% + лецитин – 0,3% + гістидину гідрохлорид – 0,1% + новокаїн – 0,1%; інактиватор № 3 – твін-80 – 4% + лецитин – 0,3% + гістидину гідрохлорид – 0,1% + сапонін – 3% + цистеїн – 0,1%; інактиватор № 4 – твін-80 – 4% + лецитин – 0,3% + гістидину гідрохлорид – 0,1% + сапонін – 3% + цистеїн – 0,1% + новокаїн – 0,1%.

Аналіз результатів, одержаних при застосуванні різних інактиваторів, свідчить, що досліджувані ЛЗ у розведеннях 1:10, 1:100, 1:200 зберігають антимікробну дію за наявності вивчених комплексів інактиваторів. Антимікробна дія препарату усувається лише при розведенні препарату 1:500. Проте зазначене розведення не може бути використане для мікробіологічного контролю, оскільки ЛЗ нормується за ДФУ (розділ 5.1.4 N) як препарат, що належить до категорії 2.

Вплив комплексу інактиваторів на антимікробну дію ЛЗ представлено в табл.3.

Т а б л и ц я 3

Вплив комплексу інактиваторів на антимікробну дію досліджуваних ЛЗ

Інактиватор	Розведення препарату	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>
№ 1	1:10	0	0	0
	1:100	0	0	0
	1:200	0	0	0
	1:500	98	70	30
Контрольна суспензія мікроорганізмів	1:10	99	66	59
	1:100	95	68	62
	1:200	89	71	32
	1:500	108	71	31
№ 2	"_"	0	0	0
	"_"	0	0	0
	"_"	0	0	0
	"_"	102	61	50
Контрольна суспензія мікроорганізмів	"_"	114	74	55
	"_"	114	74	55
	"_"	105	71	53
	"_"	109	66	56
№ 3	"_"	0	0	0
	"_"	0	0	0
	"_"	0	0	0
	"_"	91	81	31
Контрольна суспензія мікроорганізмів	"_"	112	72	54
	"_"	114	74	55
	"_"	103	86	36
	"_"	100	86	34
№ 4	"_"	0	0	0
	"_"	0	0	0
	"_"	0	0	0
	"_"	83	67	43
Контрольна суспензія мікроорганізмів	"_"	107	72	57
	"_"	109	74	57
	"_"	89	83	47
	"_"	89	83	51

Наведені результати зумовили необхідність вивчення можливості використання для визначення загального числа бактерій методом мембранного фільтрування (табл. 4).

Т а б л и ц я 4

Перевірка придатності методики випробування на мікробіологічну чистоту методом мембранного фільтрування

Поживне середовище	<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>St. aureus</i>	
	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль
№1	51	63	63	68	81	96

Аналіз цих даних свідчить, що при використанні зазначеної методики мембранно-

го фільтрування для визначення загального числа бактерій за наявності опрацьованих ЛЗ та за їх відсутності отримано ідентичні результати.

Наступним етапом досліджень було проведення перевірки придатності методики при випробуванні на окремі види мікроорганізмів [1, 2] з використанням різних комплексів інактиваторів та методу розведення (табл. 5).

Т а б л и ц я 5

*Придатність методики посіву на рідке поживне середовище № 3 з використанням інактиваторів*

Розведення препарату	Комплекс інактиваторів	Тест-штами	Наявність росту на середовищах		КУО
			Дослід	Контроль	
			крем		
1:10	№1	<i>E. coli</i>	-	+	76
		<i>S. typhimurium</i>	-	+	93
	№2	<i>E. coli</i>	-	+	76
		<i>S. typhimurium</i>	-	+	93
	№3	<i>E. coli</i>	-	+	76
		<i>S. typhimurium</i>	-	+	93
	№4	<i>E. coli</i>	-	+	76
		<i>S. typhimurium</i>	-	+	93
1:50	№1	<i>E. coli</i>	+	+	87
		<i>S. typhimurium</i>	+	+	96
	№2	<i>E. coli</i>	+	+	87
		<i>S. typhimurium</i>	+	+	96
	№3	<i>E. coli</i>	+	+	87
		<i>S. typhimurium</i>	+	+	96
	№4	<i>E. coli</i>	+	+	87
		<i>S. typhimurium</i>	+	+	96

Аналіз одержаних результатів свідчить, що при розведенні препарату 1:50 при використанні інактиваторів для розведення препарату та в складі поживного середовища № 3 усувається антимікробна дія випробовуваного препарату на поживному середовищі № 3. Про придатність методу свідчить той факт, що для кожного з тест-штамів мікроорганізмів наявності зразка були отримані позитивні результати ідентифікаційних тестів.

Подальшим етапом наших досліджень було проведення випробування опрацьованого ЛЗ згідно з розробленими методиками за показником «мікробіологічна чистота», який був витриманий в різних умовах зберігання (табл. 6).

Т а б л и ц я 6

*Результати дослідження ЛЗ за показником «мікробіологічна чистота»*

Умови та термін зберігання	Крем	
	№ зразка	Сумарна кількість бактерій і грибів
1. Безпосередньо після виготовлення	1	менше ніж 100
2. Зберігання 27 міс в природних умовах		
2.1. при температурі 18–25 °С	1а	менше ніж 100
2.2. при температурі 2–8 °С	1б	менше ніж 100

## В и с н о в к и

На основі експериментальних досліджень встановлено, що оптимальним є метод мембранного фільтрування для визначення загального числа життєздатних аеробних бактерій, а для грибів – метод прямого висівання.

У ході досліджень доведено, що в опрацьованому ЛЗ – кремі загальне число життєздатних аеробних бактерій не перевищує 100 в 1 г бактерій та грибів сумарно; не виявлено *St. aureus*, *Ps. aeruginosa* та представників ентеробактерій і деяких інших грамнегативних бактерій, що відповідає вимогам ДФУ.

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Х. : РІПЕГ, 2004. – Доп. 1. – 520с.

2. Державна фармакопея України / Держ. підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Х. : РІПЕГ, 2001. – 556 с.

3. *Косенко К.Н.* Микробные ассоциации пародонтального кармана у больных генерализованным парадонтитом / К.Н.Косенко, Ю.Г.Чумакова, Э.А.Городенко // Вісник стоматології. – 2000. – № 3. – С. 10–13.

*О. П. Шматенко, В. О. Тарасенко, Л. Л. Давтян, А. О. Дроздова, В. В. Шматенко*

#### БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ КРЕМА С ЦЕФТРИАКСОНОМ И НИМЕСУЛИДОМ ПО ПОКАЗАТЕЛЮ «МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА»

**Ключевые слова:** микробиологическая чистота, инактиватор, питательная среда, микроорганизм, тест-штам, мембранный фильтр, лекарственное средство, крем, нимесулид, цефтриаксон

Методом *in vitro* проведены биологические испытания исследуемого крема антибактериального и противовоспалительного действия с цефтриаксоном и нимесулидом, а также разработана методика испытаний (бактерии – методом мембранного фильтрования, грибы – методом прямого высевания) показателя «микробиологическая чистота».

*О. P. Shmatenko, V. O. Tarasenko, L. L. Davtyan, A. O. Drozdova, V. V. Shmatenko*

#### BIOLOGICAL TESTS OF CREAM WITH CEFTRIAXSON AND NIMESULID ON INDEX «MICROBIOLOGICAL CLEANNESS»

**Key words:** microbiological cleanness, inactivator, nourishing environment, microorganism, test-shtam, diaphragm filter, medicinal facility, cream, nimesulid, ceftriakson

The method by *in vitro* is conduct the biological tests of the probed cream of antibacterial and antiinflammation action with ceftriakson and nimesulid, and also the method of tests (bacteria - by the method of diaphragm filtration, mushrooms – by the method of direct sieving-out) of index is developed «microbiological cleanness».