

УДК 615.454.2:615.33]:57.083.1.

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СУППОЗИТОРИЕВ С ОФЛОКСАЦИНОМ

© 2004 г. Т.А. Панкрушева, Е.А. Рудько, О.А. Медведева, Л.А. Гулина,  
Е.И. Шашкова, М.С. Чекмарева, В.А. Каурова

*Курский государственный медицинский университет*

Для лечения урогенитальных инфекционных заболеваний разработаны суппозитории с офлоксацином. С использованием микробиологических методов обоснован выбор в них концентрации лекарственного вещества, изучена антимикробная активность и микробиологическая чистота суппозиториев.

### ВВЕДЕНИЕ

В связи с возросшими проблемами в терапии инфекционных урогенитальных заболеваний перспективным направлением является создание и внедрение в медицинскую практику новых терапевтически эффективных лекарственных препаратов, обладающих широким спектром антимикробного действия.

На кафедре фармацевтической технологии Курского государственного медицинского университета разработаны новые составы суппозиториев с антимикробным веществом группы фторхинолонов – офлоксацином [3,7]. Один из этапов их создания – обоснование и выбор оптимальной концентрации активного ингредиента. При этом, для противомикробных средств целесообразным является определение минимальной ингибирующей концентрации в отношении музейных штаммов микроорганизмов и клинических изолятов, выделенных у больных.

Кроме того, прежде чем рекомендовать разработанные суппозитории к клиническим испытаниям, необходимо провести исследования их антимикробной активности [2].

Известно также, что суппозитории относятся к лекарственным средствам, не стерилизуемым в процессе производства, и могут быть контаминированы разнообразными по количественному и видовому составу микроорганизмами. Согласно требованиям нормативной документации они должны быть испытаны на микробиологическую чистоту.

На основании вышеизложенного, целью настоящего исследования явилось определение минимальной ингибирующей концентрации лекарственного вещества в разрабатываемых суппозиториях, а также изучение их антимикробной активности и микробиологической чистоты в процессе хранения.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью подбора оптимальной дозировки офлок-

сацина в суппозиториях его минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) изучали методом серийных разведений в отношении музейных культур микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9207), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (ATCC 10702), *Proteus vulgaris* (ATCC 6896) и методом дисков в отношении клинических изолятов *Neisseria gonorrhoeae* [5,6].

При исследовании МИК методом последовательных серийных разведений брали ряд пробирок, в каждую из которых наливали мясо-пептонный бульон в объеме 1 мл. В первую пробирку вносили 1 мл раствора офлоксацина (0,2 мг/мл), перемешивали, затем 1 мл смеси из 1-ой пробирки переносили во 2-ую, перемешивали и то же количество смеси переносили из 2-ой в 3-ю и т.д. Контрольной являлась пробирка, не содержащая офлоксацин.

Из суточной культуры тест-штаммов микроорганизмов и клинических изолятов готовили взвесь. Стандартизацию проводили нефелометрическим методом. Используемая нами микробная нагрузка составляла 100 млн микробных клеток в 1 мл.

Во все пробирки, содержащие лекарственное вещество, и в контрольную пробирку вносили стандартизованную взвесь тест-культуры микроорганизмов. Штатив с пробирками встряхивали и ставили в термостат при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  на 18-20 ч.

Определению чувствительности методом дисков в отношении бактерий рода *Neisseria* предшествовала подготовительная работа, состоящая из следующих этапов:

- 1) выделение чистой культуры бактерий;
- 2) подготовка чашек Петри с питательной средой;
- 3) подготовка бумажных дисков: пропитывание раствором офлоксацина различной концентрации с последующей сушкой.

Выделенную чистую культуру бактерий рода

*Neisseria* суспендировали в изотоническом растворе натрия хлорида. Плотность суспензии сравнивали со стандартом мутности на 10 ЕД. 1 мл суспензии наливали на поверхность мясопептонного агара и стеклянным шпателем равномерно распределяли ее по поверхности среды. Избыток жидкости удаляли пипеткой, затем чашки выдерживали 15 мин при комнатной температуре для диффузии жидкости в агар.

Подготовленные диски в количестве 5 штук с помощью пинцета накладывали на поверхность засеянной питательной среды на одинаковом расстоянии один от другого и на расстоянии 2 см от края чашки. Каждую чашку инкубировали в течение 1-2 сут при температуре (36-37) °С. Оценку результатов производили путем определения диаметра зон задержки роста [5].

Определение антимикробной активности разрабатываемых суппозиторий с офлоксацином на основах гидрофильного и липофильного характера проводили методом диффузии в агар согласно указаниям ГФ XI изд. (1990 вып. 2) [2]. Чашки Петри (стеклянные), установленные на столиках со строго горизонтальной поверхностью, заливали расплавленной агаризованной средой, предварительно засеянной культурой микроорганизмов.

Микробную взвесь тест-штаммов микроорганизмов для посева на чашки Петри готовили по стандарту мутности. В качестве посевного материала использовали суточные культуры тест-штаммов микроорганизмов. На поверхность застывшей агаризованной среды помещали цилиндры, в каждый из которых добавляли расплавленную суппозиторную массу (0,1 г).

В качестве сравнения использовали водную суспензию стандартного образца офлоксацина, которую также помещали в цилиндр. После внесения образцов, чашки выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем инкубировали при температуре (36 ± 1) °С в течение 18 ч. Диаметры зон угнетения роста тест-микробов измеряли с точностью до 0,1 мм.

При определении микробиологической чистоты суппозиторий использовали метод мембранной фильтрации, изложенный в статье ГФ XI изд. 1990, вып. 2 и изменениями к ней от 28.12.95 [1,2]. Испытуемый образец, в количестве 6 г, растворяли в 60 мл соответствующего для каждой суппозиторной основы стерильного растворителя и фильтровали через мембраны с применением префильтра типа “Миллипор” АР-15. По окончании фильтрации и промывания, мембраны помещали на поверхности питательных сред №1 и №2 и инкубировали при соответствующих температурных режимах для определения общего микробного числа.

Кроме того, для идентификации микробов-контаминантов по окончании фильтрации мембраны помещали в жидкие питательные среды №3 и №8, инкубировали в течение 24-28 ч при температуре (30-35) °С, затем делали высевы из среды №3 на среду Эндо (для выявления кишечной палочки) и висмут сульфит агар (для выявления сальмонелл). Синегнойную палочку и стафилококк идентифицировали после инкубирования среды №8, осуществляя высев – на МПА и солевой агар, соответственно. Посевы помещали в термостат на 24 час при температуре (30-35) °С.

Таблица 1

**Минимальная ингибирующая концентрация офлоксацина в суппозиториях в отношении музейных культур микроорганизмов(мкг/мл)**

Штаммы микроорганизмов	Суппозитории на ПЭО-основе		Суппозитории на основе витепсол	
	МБсКК	МБцКК	МБсКК	МБцКК
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	1,5	3,1	1,5	3,1
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9207)	12	25	12	25
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	12	25	12	25
<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	12	25	12	25
<i>B. cereus</i> (ATCC 10702)	12	25	12	25
<i>Proteus v.</i> (ATCC 6896)	25	50	25	50

Примечание: МБсК – минимальная бактериостатическая концентрация; МБцК – минимальная бактерицидная концентрация.

**Минимальная ингибирующая концентрация офлоксацина в суппозиториях в отношении *Neisseria gonorrhoeae* (мкг/мл)**

№ опыта	Суппозитории на ПЭО-основе		Суппозитории на основе витепсол	
	МБсКК	МБцКК	МБсКК	МБцКК
1	50	100	50	100
2	100	200	100	200
3	50	100	50	100
4	12	25	12	25
5	25	50	25	50
6	12	25	12	25
7	50	100	50	100
8	6	12	6	12

Примечание: МБсК – минимальная бактериостатическая концентрация; МБцК – минимальная бактерицидная концентрация.

**Антимикробная активность суппозитория с офлоксацином**

Суппозитории на основе	Зоны задержки роста тест-штаммов, мм					
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>Ps. aeruginosa</i> (ATCC 9207)	<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	<i>B. cereus</i> (ATCC 0702)	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 6896)
Полиэтилен-оксидной	32-34	35-37	27-29	35-37	33-35	36-38
Витепсол	33-35	34-36	28-30	36-38	32-34	37-39
Контроль (водная суспензия офлоксацина)	34-36	35-37	29-31	36-39	33-35	37-40

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Данные, как среднее 6-ти параллельных опытов, полученные при изучении МИК офлоксацина в суппозиториях методом последовательных серийных разведений отражены в табл 1.

Как следует из результатов, представленных в табл 1, МИК офлоксацина в суппозиториях, приготовленных на полиэтиленоксидной основе и витепсале, не превышает 50 мкг/мл в отношении изученных тест-штаммов микроорганизмов.

В табл. 2 приведены результаты, полученные при изучении МИК методом дисков в отношении клинических изолятов *Neisseria gonorrhoeae*, выделенных от 9-ти больных.

Из представленных данных следует, что угнетение жизнедеятельности патогенных нейсерий наступает при концентрации офлоксацина 200 мкг/мл.

Таким образом, проведенные двумя методами исследования по определению МИК офлоксацина в суппозиториях, позволили установить его бактерицидную концентрацию в разрабатываемой лекарственной форме по отношению к исследуемым му-

зейным штаммам микроорганизмов и клиническим изолятам *Neisseria gonorrhoeae*. На основании этого, осуществлен выбор дозировки офлоксацина, которая составила 0,2 г на один суппозиторий. При этом вид суппозиторной основы не оказывает влияния на МИК офлоксацина.

Биоцидные свойства разработанных суппозиториях изучали методом диффузии в агар. Полученные результаты в отношении шести тест-штаммов микроорганизмов, как среднее 6-ти параллельных опытов, представлены в табл 3.

Из данных табл.3 следует, что суппозитории с офлоксацином, независимо от вида основы, проявляют высокую активность, которая сопоставима с контролем, в отношении всех исследуемых микроорганизмов. Зона задержки роста, в зависимости от их вида, находилась в пределах от 27 до 39 мм.

Учитывая современные требования нормативной документации к микробиологической чистоте лекарственных препаратов, была изучена необходимость введения в состав суппозиторной массы консервантов. В качестве последних использовали смесь нипагина и нипазола в соотношении 3:1. Результаты, полученные

Микробиологическая чистота суппозиторий с офлоксацином

Вид микроорганизмов	Наличие консервантов в суппозиториях	Количество колоний микроорганизмов					
		Свежеприготовленные		1 год хранения		2 года хранения	
		На основе ПЭО	На основе витепсол	На основе ПЭО	На основе витепсол	На основе ПЭО	На основе витепсол
бактерии	-	24	25	36	37	58	56
	+	24	24	29	25	30	31
грибы	-	11	12	53	54	120	125
	+	12	14	13	14	16	15
E.coli	-	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0
Salmonella	-	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0
Staphylococcus	-	0	0	0	0	2	1
	+	0	0	0	0	0	0
Pseudomonas	-	0	0	0	0	1	3
	+	0	0	0	0	0	0

Примечание: (-) – суппозитории без консервантов; (+) – суппозитории с консервантами.

при исследовании микробиологической чистоты суппозиторий, представлены в табл 4.

Из них следует, что наличие консервантов обеспечивает микробиологическую стабильность лекарственной формы в течении 2-х лет хранения (срок наблюдения). Не отмечается (в сравнении с суппозиториями, не содержащими консерванты) увеличения общего микробного числа и появления микробов-контаминантов.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что дозировка офлоксацина в количестве 0,2 г на один суппозиторий является оптимальной и обеспечивает необходимое антибактериальное действие лекарственной формы. Введенные в состав суппозиторий консерванты, обеспечивает их микробиологическую чистоту в течение 24 мес хранения (срок наблюдения). Разработанные суппозитории могут быть рекомендованы для их клинического изучения в терапии инфекционных урогенитальных заболеваний.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Временная фармакопейная статья. Офлоксацин, стандартный образец. ВФС 42-3555-99
2. Государственная фармакопея СССР: 11-е изд.: Вып.2 / МЗ СССР. - М.: Медицина, 1990.
3. *Машковский, М.Д.* Лекарственные средства / М.Д. Машковский. - М.: ООО "Новая волна". 2001. - 412.
5. Об унификации лабораторных методов исследования в диагностике гонореи и трихомониаза. Утверждено приказом министерства здравоохранения СССР от 12 июля 1985 года № 693. - М.: МЗ СССР. - Мин-во здравоохранения СССР.
6. Об унификации методов определения чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам. Утверждено приказом министерства здравоохранения СССР от 12 марта 1975 года № 250. - М.: МЗ СССР. - Мин-во здравоохранения СССР.
7. *Падейская, Е.Н.* Таривид – высокоэффективный антимикробный препарат широкого спектра действия / Е.Н. Падейская // ТОП-медицина. - 1997. - №2. С.22-25.