Тухбатуллина Р.Г.¹, Шулаева М.П.²

Изучение бактерицидной (дезинфицирующей) активности фармацевтической композиции для аппретированной лекарственной формы

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет Минздрава России»

²Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (Россия, Казань)

doi: 10.18411/lj-04-2019-210

idsp: lj-04-2019-210

Аннотация

В статье рассматривается проведение оценки бактерицидной активности разработанной фармацевтической композиции для аппретированной системы, после экспозиции антибактериального (дезинфицирующего) средства с микроорганизмами на поверхности без белкового загрязнения и с белковым загрязнением (имитация кожных покровов), в тесте на металлической поверхности. Доказана антибактериальная эффективность созданных фармацевтических композиций в отношении условно-патогенной микрофлоры: *S. aureus* и *E. coli*.

Ключевые слова: фармацевтическая композиция, аппретированная система, влажные салфетки, белковая нагрузка, антимикробная активность, бактерицидная активность.

В современных условиях разработка лекарственных форм, отличающихся удобством применения, благоприятными свойствами в отношении фармакотерапевтической активности, доступностью в стоимостном отношении является одной из актуальных задач медицины.

Однако опасность инфицирования приводит к тому, что в медицинской практике шире используются текстильные материалы одноразового пользования. К таким эффективным лекарственным формам относятся пропитки медицинские или аппреты, сочетающие действие препаратов, полученных из растительного и синтетического сырья. К этой группе можно отнести и влажные салфетки. Для пропитки часто применяют антимикробные средства, противогрибковые компоненты, в том числе фитопрепараты такой же направленности действия [1, с.1].

Создание аппретированных систем и их микробиологическая оценка проходила в несколько этапов:

На 1 этапе в лаборатории Института фармации Казанского государственного медицинского университета были получены спиртовые экстракты на 95 % спирте следующих растений: травы розмарина, цветков бессмертника, шишек хмеля. Для контроля использовали спиртовой 1% раствор хлорофиллипта и спирт 70%.

Для проведения исследования по изучению антимикробной и антимикотической активности полученных экстрактов суточные культуры тест-микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus cereus* (ATCC 19637) и *Candida albicans* (ATCC 885-653), выращенные на питательном агаре смывали физиологическим раствором, отстандартизовывали по стандарту мутности 10 ЕД (1млр. взвесь или 10⁹ КОЕ-колониеобразующих единиц в 1 мл). Затем взвесь разводили в два раза, получая микробную нагрузку 500 млн. в 1мл. Поверхность питательных сред заражали отстандартизованной культурой в объеме 2 мл, излишки сливали в дезинфицирующий раствор. В качестве питательных сред использовали среду Сабуро для дрожжеподобных грибов рода *Candida* и среду Мюллера-Хинтона агар, для условно-патогенной микрофлоры. Через 15 минут на инокулированных средах просекали лунки, в которые вносили исследуемые композиции и контроли. Чашки инкубировали при 35°C в течение

24-48 часов. По истечении времени, измеряли зоны задержки роста микроорганизмов с точностью до 0,1 мм (табл. 1).

Таблица 1.

Антимикробная и антимикотическая активность экстрактов трав

№п/п	Соединение	Зоны задержки роста (мм) через 24 и 48 часов				
		Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa	Bacillus cereus	Candida albicans
1	Экстракт травы розмарина	19	-	10	17	12
2	Экстракт цветков бессмертника	16	12	17	17	16
3	Экстракт шишек хмеля	24	14	-	30	18
4	Хлорофиллипт	20	10	10	25	16
5	спирт	-	-	-	-	-

Анализ первого этапа показал, что наибольшей антимикробной и антимикотической активностью обладал экстракт шишек хмеля. Более выраженную активность он проявлял в отношении грамположительной микрофлоры, так зона задержки роста *S. aureus* составила 24 мм, тогда как контроль хлорфиллипт - 20мм; *B. cereus* - 30 мм, контроль - 25 мм; *C. albicans* -18 мм, контроль - 16мм.

По результатам первого этапа исследования были разработаны 2 фармацевтические композиции, каждая из которых содержала экстракт шишек хмеля, следующего состава:

Композиция 3 (К-3), состоящая из экстракта шишек хмеля 40 мл, хлоргексидина водного 0,05% -10 мл, настойки календулы 10 мл, эфирного масла розмарина 5 капель.

Композиция 4 (К-4): спиртовой 1% раствор салициловой кислоты 25 мл, экстракт шишек хмеля 25 мл, эфирное масло розмарина 5 капель.

При проведении второго этапа исследования учитывалось то, что инфекции кожи в большинстве случаев вызываются кожными патогенными бактериями или грибами. В 70% случаев причиной бактериальных инфекций кожи являются стафилококки. Из грамотрицательных бактерий основными патогенами являются микроорганизмы рода *Proteus* spp., реже другие представители семейства *Enterobacteriaceae*. В связи, с чем в работу были отобраны представители как грамположительной, так и грамотрицательной микрофлоры.

На втором этапе исследования, была проведена оценка композиций в отношении тест-культур *S. aureus* (ATCC 209p) и *E. coli* (CDCF-50), использованных из фондов Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского федерального университета фармацевтики.

С целью определения времени экспозиции фармацевтических композиций была применена методика определения антибактериальной (дезинфицирующей) активности композиций, в тесте на металлической поверхности [2, с.16]. Также при проведении эксперимента были использованы руководства [3, с. 944, 4, с.615]

Для приготовления бактериальной суспензии культуры микроорганизмов, выращенные на плотной питательной среде в течение 18 – 24 часов, смывали стерильным изотоническим раствором хлорида натрия. Бактериальную суспензию каждого микроорганизма доводили до мутности, соответствующей концентрации 1×10^9 клеток/мл, что соответствует 3 единицам Мак-Фарланда. Для опытов с белковой нагрузкой к бактериальной суспензии добавляли раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) до конечной концентрации 0,2 %.

Поверхность металлического стола расчерчивали на квадраты. На площадь поверхности 5 х 5 см наносили микробную взвесь в объеме 0,1 мл и распределяли стерильным шпателем по всей площади квадрата. После высыхания микробной взвеси на поверхность равномерно наносили по 0,4 мл растворов:

1. К-3 (опыт),
2. К-4 (опыт),
3. экстракт из коммерческих антибактериальных салфеток в 70 % спирте.

Растворы распределяли по поверхности квадрата стерильным шпателем и выдерживали в течение 1, 5 и 15 минут.

После окончания экспозиции стерильной марлевой салфеткой (размером 5х5см), смоченной в растворе нейтрализатора, тщательно протирали загрязненную поверхность и погружали салфетку в раствор нейтрализатора во флаконе, который встряхивали в течение 10 минут. Нейтрализатор состоял из твина -80 в объеме 3 мл, сапонина -3,0 и гистидина 0,1 г, цистеина -0,1 г, 0,5-1% тиосульфата натрия в 100 мл фосфатно-солевого буфера. Объем нейтрализатора подбирали таким образом, чтобы конечная концентрация спирта в ней составляла 3% (не действующая концентрация спирта). После чего проводили посев отмытой жидкости на плотную питательную среду (агар Мюллера-Хинтона) по 0,1 мл смеси, и инкубировали посеvy 24-48 часов при 37°C.

По истечении времени, необходимого для культивирования микроорганизмов, проводили учет результатов по количеству выросших колоний. Эксперимент в одинаковых условиях проводили дважды. Опыт сопровождался контролями для каждого вида микроорганизмов:

- контролем стерильности поверхности;
- контролем жизнеспособности микроорганизмов;
- контролем контаминации поверхности взвесью микроорганизмов;
- контроль чистоты БСА.

По окончании эксперимента и после учета контролей рассчитывали плотность контаминации 25 см² поверхности и процент обеззараживания, принимая количество колоний, снятых с контрольных поверхностей, за 100 %. Критерием эффективности действия обеззараживания поверхностей считали показатель гибели тест-микроорганизмов не менее чем на 99,99 %. При гибели тест-микроорганизмов менее 99,9%, антибактериальную активность считали не эффективной.

В результате исследования дезинфицирующей способности композиции К-3 и К-4 в тесте на поверхности наблюдалась 100 % гибель *S.aureus* через 15 минут экспозиции в экспериментах без белковой нагрузки, а для К-4 и с белковой нагрузкой (табл. 2).

Таблица 2

Чувствительность S.aureus к К-3, К-4 и объектам сравнения на металлической поверхности при варьировании времени экспозиции, n=2

Препарат	Процент ингибирования роста бактерий					
	Время экспозиции, мин					
	1		5		15	
	-БСА	+БСА	-БСА	+БСА	-БСА	+БСА
К-3	99,87±0,17	99,48±0,68	100	99,61±0,5	100	99,93±0,09
К-4	99,9±0,04	99,81±0,26	100	99,75±0,35	100	100
Коммерческий препарат	99,93±0,09	99,39±0,5	100	99,75±0,35	100	100

- БСА – без добавления бычьего сывороточного альбумина

+ БСА – с добавлением бычьего сывороточного альбумина

В результате исследования дезинфицирующей способности К-3 и К-4 наблюдалась гибель 100% и 99,99% *E.coli*, уже через 1 минуту в экспериментах с белковой нагрузкой. Через 5 минут экспозиции К-3 и К-4 оказывали дезинфицирующую активность в тесте на поверхности в отношении *E.coli* (табл. 3).

Таблица 3

Чувствительность E.coli к К-3, К-4 и объектам сравнения на металлической поверхности при варьировании времени экспозиции, n=2

Препарат	Процент ингибирования роста бактерий					
	Время экспозиции, мин					
	1		5		15	
	–БСА	+БСА	–БСА	+БСА	–БСА	+БСА
К-3	100	100	100	100	100	100
К-4	100	99,99	100	100	100	100
Коммерческий препарат	100	99,99±0,05	100	100	100	100

Созданные композиции показали хорошую антимикробную активность, которая была сопоставима с коммерческим препаратом, и поэтому в дальнейшем они могут быть аппретированы на нетканый материал и использоваться, с целью лечебного действия при молодежном акне, розацеа, для асептического ухода при порезах, ранах, ожогах, обработки рук для предотвращения микробного заражения. Обе композиции по результатам исследования являются востребованными.

Полученные в ходе исследования результаты позволяют признать перспективной дальнейшую разработку композиций с последующим проведением доклинических исследований фармацевтической активности.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи и выражают благодарность за оказанную помощь в проведении исследования сотрудникам Исследовательского центра и Научно-образовательного центра фармации Казанского федерального университета: руководителю НИР, ст. науч. сотр., зав. отд. доклинических исследований, канд. биол. наук А.Г. Иксановой, ст. науч. сотр., канд. хим. наук Н.В. Штырлину, мл. науч. сотр., А.П. Любиной, гл. инж. проекта, канд. хим. наук М.Н. Агафоновой, науч. сотр., канд. биол. наук службы обеспечения качества Р.Р. Казаковой.

Выражаем благодарность доценту, канд.биол. наук Института Фармации Хазиеву Р.Ш. за оказанную помощь в получении экстрактов.

1. Дьяченко Н.В. Разработка, технологические исследования и стандартизация антимикробных лекарственных форм, аппретированных на тканях и нетканых материалах. Автореферат дисс. на степень канд. фарм.наук.-2002.-Пятигорск.
2. МУ 3.5.1.3439—17 Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих микроорганизмов в медицинских организациях. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017. – 16 с.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств /ред. А.Н. Миронов, Н.Д.Бунятян, А.Н. Васильев, О.Л. Верстакова, М.В. Журавлева, В.К. Лепахин, Н.В. Коробов, В.А. Меркулов, С.Н. Орехов, И.В. Сакаева, Д.Б. Утешев, А.Н. Яворский. – Гриф и К, Москва, 2012. – 944 с.
4. Р 4.2.2643—10 Методы лабораторных исследований и испытаний медико-профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. — 615 с.