Формулы Фармации. 2024. Т. 6, № 3. С. 10–16
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ
Научная статья
УДК 615.33.073:535.43.07
DOI: https://doi.org/10.17816/phf634932

Разработка рецептуры, выбор и гармонизация питательной среды для определения активности аминогликозидных антибиотиков

И. А. Цветкова[1] , Т. Ф. Черных[1], М. В. Жариков[1]

[1]Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Ирина Андреевна Цветкова, irina.cvetkova@pharminnotech.com

АННОТАЦИЯ. Работа посвящена исследованиям выбора пептона по оптимизации питательной среды для антимикробной активности методом диффузии в агар неомицина (фрамицетина), со схожей химической структурой. В работе обоснована важность разработки рецептуры, выбора оптимального состава, количественное соотношение ингредиентов, pH среды, соответствие предлагаемых питательных сред Государственной Фармакопее РФ и Европейской Фармакопее для стандартизации антибиотиков. Целью работы явилось изучение компонентов питательной среды в сравнении с фармакопейными стандартами, рекомендованными для определения эффективности антибиотиков. Показано, для проведения микробиологических испытаний при стандартизации лекарственных препаратов противомикробного действия питательная среда является основной, от их качества зависит правильность и точность интерпретации результатов исследований. В эксперименте были изучены четыре марки пептона сухого и бульона разных производителей по 2 вида – ООО НИЦФ и ФБУН ГНЦ ПМБ (г. Оболенск) при работе с тест- штаммом споровой культуры *Bacillus subtilis* АТСС 6633. Предложена оптимальная питательная среда, подобран состав и условия ее приготовления. Для определения антимикробной активности фрамицетина методом диффузии в агар предложена разработанная среда для определения эффективности неомицина при работе со спороносной формой тест-штамма *Baccillus subtillis* АТСС 6633.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: активность; дискодиффузионный метод; зона угнетения роста микроорганизмов; неомицин; питательная среда; противомикробная; фрамицетин

ВВЕДЕНИЕ

Важной составляющей проведения микробиологических испытаний при стандартизации противомикробных агентов (антибиотики, антисептики, дезинфицирующие средства и др.) является выбор оптимальной питательной среды для получения достоверных результатов при стандартизации образца [1].

Питательные среды (ПС) – однокомпонентные или многокомпонентные субстраты, широко применяемые в различных отраслях науки и производства для культивирования и изучения микроорганизмов или культур клеток высших организмов. Их используют в санитарной и клинической микробиологии для диагностики заболеваний и изучения объектов окружающей среды, в пищевой и фармацевтической промышленности при производстве и контроле качества продукции, в криминалистике.

В последние годы в связи с расширением спектра производств сложных биологических лекарственных препаратов (БЛП), к которым относятся иммунобиологические, биотехнологические и генотерапевтические лекарственные препараты, значимость (ПС) существенно возросла [2].

В настоящее время в Российской Федерации в связи с определенными трудностями в приобретении аккредитованных лабораториях импортных вспомогательных веществ и материалов остро стоит вопрос подбора и использования оптимальных питательных сред [3, 4]. Предлагаемые варианты сред для проведения испытаний в Государственной Фармакопее РФ (ГФ РФ) представлены не для всех противомикробных средств, а только для ограниченного наименования антибиотиков. Следовательно, для микробиологов приходится проводить собственные экспериментальные исследования и доказывать их эффективность [5]. Так, например, в ГФ РФ предложен вариант рецептуры среды для неомицина, но отсутствует рецептура среды для определения назального спрея фрамицетина [6], который в последнее время очень широко применяется в медицине [7]. В Европейской Фармакопее (ЕФ) описан состав среды (среда Е) для определения антимикробной активности методом диффузии в агар Фрамицетина, которая не всегда доступна в России [8].

Цель исследования – разработка рецептуры, выбор и гармонизация питательной среды для определения активности антибиотика фрамицетина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение антимикробной активности фрамицетина проводили методом диффузии в агар на плотной питательной среде. Исследования осуществляли путем сравнения размеров зон угнетения роста тест-штаммов микроорганизмов, образующихся при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата фрамицетина.

Использованы пептоны для приготовления питательных сред: ООО НИЦФ (среда Е, № 1); пептон основной сухой ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск (среда Е, № 2); пептон бактериологический сухой ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск (среда Е, № 3) и среда № 4 для определения активности неомицина. Среды готовили согласно требованиям ГФ РФ.

Метод основан на логарифмической зависимости размеров зон угнетения роста тест-микроорганизмов от концентрации антибиотика, которая должны быть линейной [9].

Для определения эффективности антибиотиков используют стандартные образцы, активность которых, как правило, устанавливают в соответствии с международными биологическими стандартами [10]. Основные растворы стандартных и испытуемых образцов готовят в стерильных растворителях с концентрацией 1 мг/мл.

В ЕФ для определения антимикробной активности антибиотика используют среду следующего состава: 5,0 г пептона, 3,0 г мясного экстракта и 10 г агар-агара с pH среды до 7,8–8,0. Дополнительным компонентом является 53,8%-й раствор динатрия гидрофосфата.

Испытания всех вариантах сред при одинаковых условиях проводили в соответствии с методикой, предложенной ГФ РФ и ЕФ. В расплавленную среду Е (варианты 1, 2 и 3) вносили приготовленный и простерилизованный при 121 °С в течение 20 минут 53,8%-й раствор динатрия гидросфосфата из расчета 8 мл раствора на 160 мл среды. В среде № 3 раствор динатрия гидрофосфата отсутствовал.

При определении активности образца фрамицетина во все среды вносили взвесь споровой культуры *Bacillus subtilis* ATCC6633 в количестве 2×10^7 КОЕ/мл из расчета 1 мл на каждые 20 мл.

Инокулированную среду разливали по 20 мл в пластмассовые чашки Петри размером 20 × 90 мм, установленные на столиках со строго горизонтальной поверхностью. После полного застывания агара в чашках при помощи стерильного сверла с внутренним диаметром 6 мм наносили по 6 лунок. В лунки помещали равные объемы рабочих растворов стандартного и испытуемого образцов в концентрациях 10 МЕ/мл, 20 МЕ/мл и 40 МЕ/мл. По истечении времени инкубирования при температуре 36 ± 1 °С учитывали результаты, измеряя диаметры зон угнетения роста тест-микроорганизма при помощи соответствующих приборов с точностью до 0,1 мм в соответствии со статьей ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор компонентов питательной среды, в особенности качество используемого пептона, является критически важным фактором для успешного проведения микробиологических исследований, таких как определение активности антибиотиков методом диффузии в агар [11].

В ходе исследования были приготовлены 4 варианта питательных сред, различающиеся по производителю используемого пептона (табл. 1). Результаты анализа активности неомицина на этих средах показали существенные различия.

Как видно из табл. 1, среда 4 отличается по составу от предложенной в ЕФ среды Е. Следует отметить, что в состав среды № 4 (для определения активности неомицина) не входит такой компонент как мясной экстракт, поскольку на отечественном рынке он практически отсутствует.

Установлено, что при учете результатов диаметры зоны задержки роста на чашках с питательной средой, зоны имели разную конфигурацию и вид (рис. 1, 2). В чашках с посевами на среде № 4 (табл. 2) получали результаты активности фрамицетина 8185 ЕД. При просмотре зоны задержки роста (рис. 2) обнаружили более четкие контуры колонии, диаметр которой составил 17,21–20,33 мм. На среде № 2 рост тест-штамма микроорганизма *Bacillus subtillis* АТСС 6633 отсутствовал.

Табл. 1.

Составы питательных сред для определения методом диффузии в агар

Table 1.

Compositions of nutrient media for determination by diffusion into agar

Питательная среда, №	Компоненты питательной среды			pH среды
	1	2	Агар-агар	
Среда Е, № 1	Пептон для бактериологических питательных сред, ООО НИЦФ	Мясной экстракт, производитель «Sigma» кат. № B4888	Агар-агар микробиологический, производитель «Laboratorios Conda», Испания	pH = 6,36
Среда Е, № 2	Пептон основной сухой, ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск)	Мясной экстракт, производитель «Sigma» кат. № B4888	Агар-агар микробиологический, производитель «Laboratorios Conda», Испания	pH = 7,44
Среда Е, № 3	Пептон бактериологический сухой, ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск	Мясной экстракт, производитель «Sigma» кат. № B4888	Агар-агар микробиологический, производитель «Laboratorios Conda», Испания	pH = 6,45
Среда для неомицина, № 4	ГМФ-бульон, ООО НИЦФ	Натрия фосфат двузамещенный	Агар-агар микробиологический, производитель «Laboratorios Conda», Испания	pH = 7,21

Табл. 2.

Диаметры зон задержки роста фрамицетина на питательных средах

Table 2.

Diameters of framycetin growth retardation zones on nutrient media

№ эксперимента	Ожидаемая активность фрамицетина, ЕД (уровень, %)	Диаметр зон задержки роста, мм						Активность фрамицетина, ЕД
		Контрольный раствор			Испытуемый раствор			
		S_1	S_2	S_3	U_1	U_2	U_3	
1	8000	23,00	24,40	26,00	23,00	24,40	25,90	8084
		23,00	24,50	25,90	23,10	24,50	25,90	
		23,10	24,80	26,10	23,20	24,70	26,00	
		23,00	24,50	26,00	23,10	24,50	26,00	
		23,00	24,50	25,90	23,00	24,40	26,10	
		23,10	24,60	26,00	23,10	24,70	26,20	
3	8000	25,00	27,20	29,60	24,90	27,10	29,50	8122
		25,10	27,40	30,20	25,20	27,40	30,10	
		25,10	27,60	31,00	25,30	27,50	31,00	
		24,90	27,40	29,40	25,10	27,30	29,80	
		25,10	27,30	30,80	25,10	27,30	31,00	
		25,20	27,40	29,90	25,40	27,60	30,00	
4	8000	17,20	18,70	20,20	17,30	18,90	20,30	8185
		17,20	18,70	20,20	17,20	18,80	20,30	
		17,30	18,90	20,20	17,40	18,80	20,40	
		17,10	18,60	20,30	17,20	18,70	20,40	
		17,20	18.70	20,20	17,20	18,60	20,40	
		17,30	18,80	20,30	17,30	18,80	20,20	

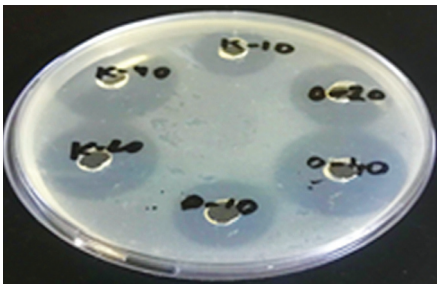

Рис. 1. Диаметр задержки зон фрамицетина (мм) на среде Е № 1. ***Примечание:*** **О-10 – испытуемый образец фрамицетина, концентрация 10 ЕД/мл; О-20 – испытуемый образец фрамицетина, концентрация 20 ЕД/мл; К-10 – стандартный образец фрамицетина, концентрация 10 ЕД/мл; К-20 – стандартный образец фрамицетина, концентрация 20 ЕД/мл; К-40 – стандартный образец фрамицетина 10 ЕД/мл**

Fig. 1. Diameter of the delay zones of framycetin (mm) on medium E No. 1. ***Note:*** **O-10 – test sample of framycetin, concentration 10 U/ml; O-20 – test sample of framycetin, concentration 20 U/ml; K-10 – standard sample of framycetin, concentration 10 U/ml; K-20 – standard sample of framycetin, concentration 20 U/ml; K-40 – standard sample of framycetin 10 U/ml**

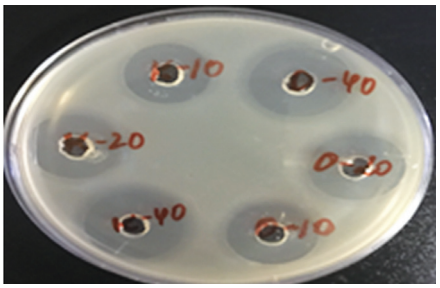

Рис. 2. Диаметр задержки зон (мм) на среде № 3 фрамицетина. ***Примечание:*** **О-10 – испытуемый образец фрамицетина, концентрация 10 ЕД/мл; О-20 – испытуемый образец фрамицетина, концентрация 20 ЕД/мл; К-10 – стандартный образец фрамицетина, концентрация 10 ЕД/мл; К-20 – стандартный образец фрамицетина, концентрация 20 ЕД/мл; К-40 – стандартный образец фрамицетина 10 ЕД/мл**

Fig. 2. The diameter of the delay zones (mm) on the medium No. 3 of framycetin. ***Note:*** **O-10 – test sample of framycetin, concentration 10 U/ml; O-20 – test sample of framycetin, concentration 20 U/ml; K-10 – standard sample of framycetin, concentration 10 U/ml; K-20 – standard sample of framycetin, concentration 20 U/ml; K-40 – standard sample of framycetin 10 U/ml**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования антимикробной активности с тест-штаммом микроорганизма *Bacillus subtillis* АТСС 6633 показали, что унифицированная питательная среда № 4 для определения антимикробной активности неомицина методом диффузии в агар может быть использована для определения антимикробной активности назального спрея «Фрамицетин».

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Суханова С. М. Стандартизация требований к питательным средам, используемым для оценки качества лекарственных средств (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2023;12(1):123–130. doi: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-123-130

2. Суханова С. М. Питательные среды в фармакопейном анализе: применение, действующие требования, вопросы стандартизации / С. М. Суханова, Н. Е. Захарова // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2019. – Т. 19, № 3. – С. 136–144. – doi: 10.30895/2221-996X-2019-19-3-136-144.

3. Домнина Ю. М. Оценка микробиологической чистоты назального спрея, содержащего налтрексона гидрохлорид / Ю. М. Домнина, В. В. Суслов, Н. Э. Грамматикова, С. С. Кедик // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9, № 4. – С. 116–120. – doi: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-116-120.

4. Кулешова С. И. Стабильность готовых и приготовленных в лаборатории питательных сред / С. И. Кулешова, С. А. Процак, С. А. Лисунова, Г. Ю. Романюк // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2021. – Т. 11, № 2. – С. 130–134. – doi: 10.30895/1991-2919-2021-11-2-130-134.

5. Олефир Ю. В. Экспериментальная оценка методов определения антимикробной активности препаратов хлорофиллипта / Ю. В. Олефир, А. И. Лутцева, О. В. Гунар [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2015. – № 4. – С. 47–50.

6. Патент № 2720691 C1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/02, G01N21/17, C12R1/445. Жидкая питательная среда для культивирования микроорганизмов при определении гентамицина и стрептомицина в лекарственных средствах и способ их определения турбидиметрическим методом: № 2019124515: заявл. 02.08.2019: опубл. 12.05.2020 / Е. Н. Семенова, Е. И. Саканян, С. И. Кулешова, Т. И. Краснопевцева; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России).

7. Еремин С. А. Особенности применения топических препаратов фрамицетина сульфата в лечении риносинусита / С. А. Еремин, И. М. Дьяков, С. С. Павлова // Медицинский совет. – 2021. – № 18. – С. 158–164. – doi: 10.21518/2079-701X-2021-18-158-164.

8. European Pharmacopoeia. 10th Edition. Council of Europe, 2020.

9. ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» / Государственная Фармакопея РФ ГФ XIV. Т. 2, М., 2018 г. С. 1128.

10. ОФС.1.2.4.0010.15 Взамен ст. ГФ XI, вып. 2 Взамен ст. ГФ XII, ч. 1, «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».

11. Кулешова С. И. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар / С. И. Кулешова // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2015. – № 3. – С. 13–17.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Цветкова Ирина Андреевна – микробиолог Испытательной лаборатории (Центр контроля качества лекарственных средств Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, Санкт-Петербург, Россия, irina.cvetkova@pharminnotech.com

Черных Татьяна Федоровна – д-р фармацевт. наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, Санкт-Петербург, Россия, ode9gova.t@yandex.ru

Михаил Владимирович Жариков – ст. лаб. кафедры промышленной экологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия, zharikov.mihail@pharminnotech.com

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 07.08.2024 г., одобрена после рецензирования 28.09.2024 г., принята к публикации 30.09.2024 г.

Статья доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0 International © Эко-Вектор, 2024

Pharmacy Formulas. 2024. Vol. 6, no. 3. P. 10–16
PHARMACEUTICAL SCIENCES
Scientific article

The development of a formulation, the selection and harmonization of the nutrient medium for determining the activity of aminoglycoside antibiotics

Irina A. Tsvetkova[1], Tatiana F. Chernykh[1], Mikhail V. Zharikov[1]

[1]Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia
Corresponding author: Irina A. Tsvetkova, irina.cvetkova@pharminnotech.com

ABSTRACT. The work is devoted to research on the selection of peptone for the optimization of the nutrient medium for the antimicrobial activity by the agar diffusion method of neomycin (framycetin), which have a similar chemical structure. The paper substantiates the relevance and importance of developing a formulation, selecting the optimal composition (ingredients), the quantitative ratio of ingredients, the pH of the medium, compliance of the proposed nutrient media with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation and the European Pharmacopoeia for the standardization of antibiotics. The aim of the work was to study the components of the nutrient medium in comparison with the pharmacopoeial standards recommended for determining the effectiveness of antibiotics. It is shown that for carrying out microbiological tests in the standardization of antimicrobial drugs, the nutrient medium is the main one, and the correctness and accuracy of the interpretation of the research results depend on their quality. The experiment studied four brands of dry peptone and broth from different manufacturers – LLC NITSF and FBUN GNTs PMB (Obolensk) when working with the test strain of the spore culture *Bacillus subtilis* ATCC 6633. An optimal nutrient medium is proposed, the composition and conditions of its preparation are selected. To determine the antimicrobial activity of framycetin by the agar diffusion method, a developed medium for determining the effectiveness of neomycin when working with the spore-forming form of the test strain *Baccillus subtillis* ATCC 6633 is proposed.

KEYWORDS: activity; discodiffusion method; zone of inhibition of microbial growth; neomycin; nutrient medium; antimicrobial; framycetin

REFERENCES

1. Sukhanova S. M. Nutrient media in pharmacopoeial analysis: application, current requirements, standardization issues / S. M. Sukhanova, N. E. Zakharova // Biopreparations. Prevention, diagnostics, treatment. – 2019. – Vol. 19, No. 3. – Pp. 136–144. doi: 10.30895/2221-996X-2019-19-3-136-144. (In Russ.).

2. Sukhanova S.M. Standardization of Requirements for Culture Media Used to Assess the Quality of Drugs (Review). Drug development & registration. 2023;12(1):123–130. doi: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-123-130. (In Russ.).

3. Evaluation of the microbiological purity of a nasal spray containing naltrexone hydrochloride / Yu. M. Domnina, V. V. Suslov, N. E. Grammatikova, S. S. Kedik // Development and registration of medicines. – 2020. – Vol. 9, No. 4. – P. 116–120. doi: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-116-120. (In Russ.).

4. Kuleshova S. I. Stability of ready-made and laboratory-prepared nutrient media / S. I. Kuleshova S. A. Protsak, S. A. Lisunova, G. Yu. Romanyuk // Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical Products. Regulatory studies and expertise of medicines. – 2021. – Vol. 11, No. 2. – Pp. 130–134. doi: 10.30895/1991-2919-2021-11-2-130-134. (In Russ.).

5. Olefir Yu. V. Experimental evaluation of methods for determining the antimicrobial activity of chlorophyllipt preparations / Yu. V. Olefir, A. I. Lutseva, O. V. Gunar [et al.] // Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical Products. Regulatory studies and expertise of medicines. – 2015. – No. 4. – P. 47–50. (In Russ.).

6. Patent No. 2720691 C1 Rossiiskaya Federatsiya, MPK C12Q 1/02, G01N21/17, C12R1/445. Zhidkaya pitatel'naya sreda dlya kul'tivirovaniya mikroorganizmov pri opredelenii gentamitsina i streptomitsina v lekarstvennykh sredstvakh i sposob ikh opredeleniya turbidimetricheskim metodom: № 2019124515: zayavl. 02.08.2019: opubl. 12.05.2020 / E. N. Semenova, E. I. Sakanyan, S. I. Kuleshova, T. I. Krasnopevtseva; zayavitel' Federal'noe gosudarstven-

noe byudzhetnoe uchrezhdenie "Nauchnyi tsentr ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya" Ministerstva zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii (FGBU NTsESMP Minzdrava Rossii). (In Russ.).

7. Eremin S. A. Features of the use of topical preparations of framycetin sulfate in the treatment of rhinosinusitis / S. A. Eremin, I. M. Dyakov, S. S. Pavlova // Medical Council. – 2021. – No. 18. – P. 158–164. doi: 10.21518/2079-701X-2021-18-158-164. (In Russ.).

8. European Pharmacopoeia. 10th Edition. Council of Europe, 2020.

9. OFS.1.2.4.0002.18 "Mikrobiologicheskaya chistota" / Gosudarstvennaya Farmakopeya RF GF XIV. T. 2, M., 2018 g. C. 1128. (In Russ.).

10. OFS.1.2.4.0010.15 Vzamen st. GF XI, vyp. 2 Vzamen st. GF XII, ch. 1, "Opredelenie antimikrobnoi aktivnosti antibiotikov metodom diffuzii v agar". (In Russ.).

11. Kuleshova S. I. Determination of antibiotic activity by diffusion in agar / S. I. Kuleshova // Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical Products. Regulatory studies and expertise of medicines. – 2015. – No. 3. – P. 13–17. (In Russ.).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina A. Tsvetkova – Microbiologist of the Testing Laboratory (Center for Quality Control of Medicines, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia, irina.cvetkova@pharminnotech.com

Tatiana F. Chernykh – D.Sc. in Pharmaceutical Sciences, Professor, Professor of the Department of Microbiology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia, ode9gova.t@yandex.ru

Mikhail V. Zharikov – Senior laboratory Assistant at the Department of Industrial Ecology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia, zharikov.mihail@pharminnotech.com

The authors declare no conflicts of interests.

The article was submitted August 07, 2024; approved after reviewing September 28, 2024;
accepted for publication September 30, 2024.

The article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 license © Eco-Vector, 2024