

УДК 636.09:615.33

АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ ІСНУЮЧИХ ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ НА РИНКАХ УКРАЇНИ

А. М. Головко, Н. Г. Пінчук, Г. В. Дмитрисва
admin@biocontrol.kiev.ua

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна

У статті викладені результати досліджень чутливості підібраних тест-штамів до широкого спектру протимікробних препаратів із метою визначення їх активності. Проведено аналіз активності антибіотиків, які використовуються у ветеринарній медицині, відповідно до стандартних зразків із метою визначення фальсифікованих препаратів. Наведено результати активності бензилпеніциліну різних виробників з метою порівняння отриманих даних не нище допустимих мінімальних показників активності.

Аналіз міжнародних і вітчизняних баз даних колекцій тест-штамів дав можливість відібрати високочутливі мікроорганізми для визначення активності протимікробних препаратів; здійснити підбір, попередньо вивчаючи характерні властивості культур та їх чутливості до широкого спектру антибіотиків.

За допомогою диско-дифузійного методу та дифузії в агарі отримано результати досліджень щодо вивчення чутливості тест-штамів мікроорганізмів до різних протимікробних речовин та сформовано набір тест-культур для визначення активності антибіотиків мікробіологічним методом. Отримані результати наведені в таблиці чутливості тест-штамів до мінімальних концентрацій стандартних зразків антибіотиків різних груп, розділивши на кожний штам, що дає можливість порівнювати отримані результати досліджуваних препаратів на відповідність їх активності вказаної в інструкції застосування.

На сьогодні сучасні методи визначення активності антибіотиків є практично недоступними для державних лабораторій ветеринарної медицини України, оскільки потребують дорогого обладнання та висококваліфікованих фахівців для проведення досліджень на ньому.

Достатньо простими та швидкими у застосуванні, відносно не дорогими, високочутливими та доступними для державних лабораторій ветеринарної медицини є біологічні методи контролю якості лікувальних препаратів.

Ключові слова: АКТИВНІСТЬ, ПРОТИМІКРОБНІ ПРЕПАРАТИ, ТЕСТ-ШТАМИ, АНТИБІОТИКИ

ANALYSIS OF ACTIVITY OF EXISTENT ANTIMICROBIAL PREPARATIONS ON MARKETS OF UKRAINE

A. Golovko, G. Dmytryyeva, N. Pinchuk
admin@biocontrol.kiev.ua

State Scientific Control Institute of Biotechnology and strains of microorganisms,
st. Donetsk, 30, Kyiv, 03151, Ukraine

In the article are expounded results of researches of sensitiveness of neat cultures of tests are to the wide spectrum of antimicrobial preparations, with the purpose of determination of their activity. The analysis of activity of antibiotics which are used in veterinary medicine is conducted, in accordance with standard standards, with the purpose of determination of the falsified preparations. The results of activity of benzilpenicilinu of different producers are resulted with the purpose of comparison of findings of not below of possible minimum indexes of activity. Analysis of international and domestic bases of these collections of

cultures of tests, enabled to take away highly sensitive microorganisms for determination of activity of antimicrobial preparations. To carry out a selection, preliminary studying characteristic properties of cultures and their sensitiveness to the wide spectrum of antibiotics. By a disko-diffusion method and diffusion in an agar the results of researches are got in relation to the study of sensitiveness of cultures of tests of microorganisms to the different antimicrobial matters and the set of cultures of tests is formed for determination of activity of antibiotics by a microbiological method. From the results of researches the table of sensitiveness of cultures of tests is resulted to the minimum concentrations of basic standards of antibiotics of different groups, dividing into every culture which enables to compare the got results of the probed preparations on accordance of their activity of indicated in instruction of application.

For today modern methods of determination of activity of antibiotics are practically inaccessible for the state laboratories of veterinary medicine of Ukraine, as need dear equipment and highly skilled specialists for the leadthrough of researches on him. Simple enough and by fasts in application, relatively inexpensive, highly sensitive and accessible for the state laboratories of veterinary medicine there are biological methods of control of quality of medical preparations.

Keywords: ACTIVITY, ANTIMICROBIAL PREPARATIONS, CULTURES of TESTS, ANTIBIOTICS

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ СУЩЕСТВУЮЩИХ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА РЫНКАХ УКРАИНЫ

А. Н. Головка, А. В. Дмитриева, Н. Г. Пинчук
admin@biocontrol.kiev.ua

Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов, ул. Донецкая, 30, г. Киев, 03151, Украина

В статье изложены результаты исследований чувствительности подобранных тестовых штаммов к широкому спектру противомикробных препаратов с целью определения их активности. Проведен анализ активности антибиотиков, которые используются в ветеринарной медицине, в соответствии со стандартными образцами, с целью определения фальсифицированных препаратов. Приведены результаты активности бензилпеницилину разных производителей с целью сравнения полученных данных не ниже допустимых минимальных показателей активности. Анализ международных и отечественных баз данных коллекций тестовых штаммов дал возможность отобрать высокочувствительные микроорганизмы для определения активности противомикробных препаратов; осуществить подбор, предварительно изучая характерные свойства культур и их чувствительности к широкому спектру антибиотиков. С помощью диско-диффузионного метода и диффузии в агаре получены результаты исследований относительно изучения чувствительности тестовых штаммов микроорганизмов к разным противомикробным веществам и сформирован набор тестовых культур. Из результатов исследований приведена таблица чувствительности тестовых штаммов к минимальным концентрациям стандартных образцов антибиотиков разных групп, разделив на каждый штамм, который дает возможность сравнивать полученные результаты исследуемых препаратов на соответствие их активности указанной в инструкции применения.

На сегодня современные методы определения активности антибиотиков являются практически недоступными для государственных лабораторий ветеринарной медицины Украины, поскольку нуждаются в дорогом оборудовании и высококвалифицированных специалистах для проведения исследований на нем. Достаточно простыми и быстрыми в применении, относительно недорогими, высокочувствительными и доступными для государственных лабораторий ветеринарной медицины являются биологические методы контроля качества лечебных препаратов.

Ключевые слова: АКТИВНОСТЬ, ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ ПРЕПАРАТЫ, ТЕСТОВЫЕ ШТАММЫ, АНТИБИОТИКИ

На сьогодні в Україні й світі розробки нових протимікробних засобів з антибактеріальною активністю відносно грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів не дають очікуваних результатів, оскільки на ринку займають місце фальсифіковані ліки [1].

Кількість фальсифікованих ліків в Україні збільшується — в деяких сегментах кількість підробок доходить до 40 %. Більшість фальсифікату — це імпорتنі ліки. У країну вони поступають переважно з Росії, Китаю та Індії.

Згідно з даними результату моніторингу якості лікарських засобів за 1 півріччя 2013 року, опублікованого РФ, були виявлені і вилучені 191 серія 122 торгових найменувань недоброякісних лікарських засобів.

З перевіреного об'єму недоброякісних лікарських засобів вітчизняного виробництва виявилось 66 % (кількісно — 126 серій), зарубіжного 34 % (кількісно — 65 серій). При цьому вітчизняних виробників припадає на частку 86 торгових назв, на зарубіжних — 36 [2–4]. Використання таких препаратів може спричинити серйозний вплив та негативні наслідки на здоров'я людини, оскільки фальсифікована продукція не проходить передбачений для легальної продукції контроль при її виробництві та реалізації.

Згідно з даними Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів МЗ України доля фальсифікованих ліків (ФЛ) на ринку України на сьогодні складає менше 0,3 %, а кількість субстандартних (що втратили лікувальні властивості в результаті неправильного зберігання) ліків — 3,2 % [5, 6].

Найбільше число підробок припадає на препарати, що мають значний попит: антибіотики (до 42 %), гормональні (до 20 %), антигіпертензивні [6, 7].

Метою нашої роботи був аналіз активності існуючих протимікробних препаратів на ринках України.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були: живильне середовище, тест-мікроорганізми (у дослідженні використали такі тест-штами: *Bacillus cereus* var. *mycoides* 537, *Bacillus subtilis* var. L2, *Bacillus cereus* var. *mycoides* НВ, *Staphylococcus aureus* 209 Р, *Bacillus cereus* 11778, *Bacillus subtilis* 6633, *Streptococcus thermophilus*, *Micrococcus luteus* 9341, *Micrococcus luteus* 10240 та *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* С-953), буферний розчин з відомим рН, розчини стандартного зразка з відомими концентраціями (Sigma, Німеччина та РФ ВГНКИ) і розчини випробуваного зразка, передбачувані концентрації яких не мають істотних відмінностей від відповідних концентрацій стандартного зразка. Методи: метод дифузії в агарі. *Метод дифузії в агар* визначає антимікробну активність антибіотиків і базується на їх здатності пригнічувати ріст мікроорганізмів. Застосовують метод дифузії в агар на щільному поживному середовищі, порівнюючи розміри зон пригнічення росту тест-мікробів досліджуваного препарату.

Результати й обговорення

Визначення активності протимікробних препаратів (ПМП) проведено шляхом порівняння ступеня пригнічення росту чутливих мікроорганізмів випробуваного і стандартного зразків у певних концентраціях. Як стандартні зразки використали речовини, активність яких точно встановлена відповідно до міжнародного стандарту.

Визначення активності ПМП (Бензилпеніцилін)

Концентрація (ОД)	V. subtilis L2 (зони затримки росту, мм)		
	Пеніцилін G (стандартний зразок)	Бензилпеніцилін натрієва сіль (субстанція)	Пеніцилін (комерційний)
1	28,0	25,5	26,3
0,5	24,0	22,0	22,2
0,1	18,1	16,0	16,0
0,05	15,0	12,6	14,2

На основі отриманих результатів дослідження діаметра зони затримки росту тест-культури до різних концентрацій ПМП побудовано калібрувальну криву. Абсцис

значення концентрацій робочих розчинів досліджуваного антибіотика, ординат — діаметр зони затримки росту тест-культури (рис. 1).

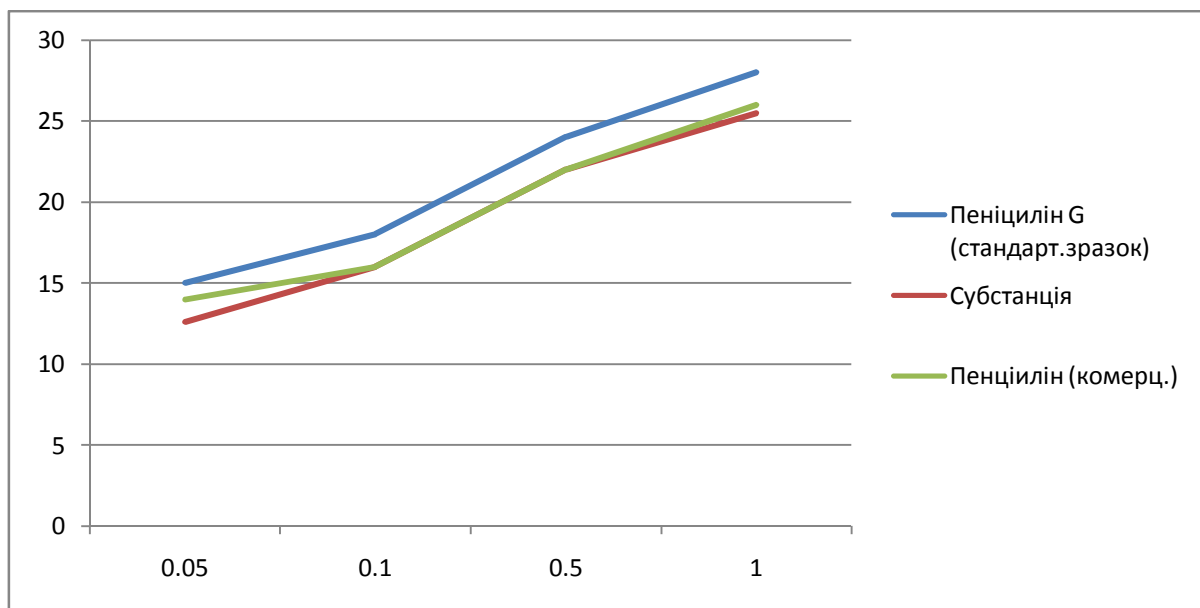


Рис. 1. Калібрувальна крива росту досліджуваного штаму в присутності різних концентрацій антибіотика різних виробників

Активність випробуваних зразків не нижче допустимої мінімальної активності (різниця не більше 2 мм).

Сучасні мікробіологічні методи дозволяють контролювати якість протимікробних препаратів, до яких підібрані найбільш чутливі тест-культури, які здатні реагувати на мінімальну кількість антибіотика в субстраті та давати чіткі зони інгібіції, які відповідають заданій концентрації. У наших дослідженнях вивчили чутливість мікроорганізмів до основних груп антибіотиків, які використовуються у ветеринарії, з метою

підібрати тест-культури до найбільш широкого спектру антибіотиків.

Критеріями чутливості мікроорганізмів до антибіотика була розрахована на 1 мл поживного середовища мінімальна концентрація, яка інгібує ріст збудника при стандартних умовах постановки досліду.

Визначали активність таких антибіотиків: бензилпеніцилін, ампіцилін, амоксицилін, тетрациклін, еритроміцин, стрептоміцин, канаміцин, неоміцин, гентаміцин, хлорамфенікол, бацитрацин, нітрофурантоїн, фуразолідон, триметоприм,

сульфадиметоксин, цефтріаксон, цефазолін. Це представники основних груп протимікробних препаратів, які найчастіше використовуються у ветеринарії.

Тест чутливості наших досліджуваних мікроорганізмів відносно до стандартних зразків антибіотиків (концентрація 0,1 мкг/мл) дає можливість визначити невідповідність активності

існуючих ПМП, тобто виявити фальсифіковані препарати (табл. 2).

Згідно з методикою Навашина С. М., Фоміної І. П. (1982) [8], при зоні затримки росту діаметром до 10 мм штам рахують як малочутливий. Зони діаметром більше 10 мм вказують на чутливість штаму до визначеної концентрації протимікробного препарату.

Таблиця 2

Чутливість тест-штамів до протимікробних препаратів

Антибіотик, 0,1 мкг/мл	Концентрація антибіотика в поживному середовищі, ОД/мл, мкг/мл									
	Діаметр зони затримки росту, мм (± 1 мм)									
	L2	537	НВ	6633	9341	10240	11778	209 P	C-953	Ther.
Пеніцилін	15,0	-	19,5	-	18,0	10,1	9,0	18,1	28,0	24,1
Ампіцилін	12,3	-	20,3	-	20,2	9,7	-	16,0	30,0	25,0
Амоксицилін	-	-	-	-	-	25,2	-	-	14,0	16,7
Стрептоміцин	15,0	12,0	-	-	-	-	-	14,2	-	12,1
Еритроміцин	-	-	14,0	16,3	15,0	-	-	17,8	-	-
Бацитрацин	13,5	-	-	-	16,0	13,3	-	-	14,8	17,1
Канаміцин	18,0	17,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Гентаміцин	18,5	-	-	-	12,0	-	-	-	-	-
Неоміцин	20,0	12,3	-	-	-	-	-	11,0	-	-
Хлорамфенікол	12,5	-	-	-	19,0	20,0	-	18,1	23,0	10,0
Тетрациклін	14,6	19,5	-	10,0	12,6	13,2	28,0	12,4	-	-
Триметоприм	25,0	-	-	-	13,33	16,7	-	-	-	-
Нітрофурантоїн	-	-	-	-	-	8,0	-	-	-	16,0
Фуразолідон	-	-	-	-	-	-	-	-	16,5	-
Сульфадиметок.	14,0	-	-	-	13,7	15,3	-	-	19,1	-
Цефазолін	-	-	15,0	-	16,0	20,1	-	-	14,5	16,5
Цефтріаксон	-	-	10,5	-	13,5	18,2	-	-	21,0	16,3

Примітка: «-» — відсутня зона затримки росту культури при концентрації 0,1 мкг/мл антибіотика

Bacillus subtilis var. L2 чутливий до стрептоміцину (діаметр зони 15 мм) та високочутливий до триметоприму (25 мм), неоміцину (20 мм); *Micrococcus luteus* 10240 малочутливий до ампіциліну (9,7 мм) та нітрофурантоїну (8 мм) та високочутливий до амоксициліну (25,2 мм), хлорамфеніколу (20 мм), цефазоліну (20,1 мм); *Bacillus cereus* 11778 високочутливий до тетрацикліну (28 мм); *Bacillus stearothermophilus calidolactis* C-953 проявив високу чутливість до пеніциліну (28 мм), ампіциліну (30 мм), хлорамфеніколу (23 мм), цефтріаксону (21 мм), фуразолідону (16,5 мм); *Streptococcus thermophilus* високочутливий до пеніциліну (24 мм), ампіциліну (25 мм), бацитрацину (17 мм); *Bacillus subtilis* 6633 досить

чутливий до еритроміцину (16,3 мм); *Micrococcus luteus* 9341 високочутливий до пеніциліну (18 мм), ампіциліну (20 мм), хлорамфеніколу (19 мм); *Bacillus cereus* var. *mycoides* НВ виявився чутливим до цефазоліну (15 мм), високочутливим до пеніциліну (19,5 мм), ампіциліну (20,3 мм); *Bacillus cereus* var. *mycoides* 537 високочутливий до тетрацикліну (19,5), канаміцину (17,5); *Staphylococcus aureus* 209 P високочутливий до еритроміцину (17,8 мм), пеніциліну (18,1 мм), хлорамфеніколу (18,1 мм).

З результатів досліджень можна зробити набір тест-штамів відносно чутливості до різних груп ПМП, із подальшою метою визначення їх активності та розділити на мінігрупи:

1) *Bacillus subtilis* var. *L2* чутливий до нітрофуранів (фуразолідон, нітрофурантоїн), пеніцилінів (бензилпеніцилін, ампіцилін), тетрациклінів, аміноглікозидів (гентаміцин, неоміцин, канаміцин), карбапенемів (триметоприму).

2) *Bacillus cereus* var. *mycoides* 537 чутливий до аміноглікозидів (стрептоміцин), пеніцилінів (бензилпеніцилін, ампіцилін), аміноглікозидів (канаміцин).

3) *Bacillus cereus* *HB* чутливий до макролідів (еритроміцин), пеніцилінів, цефалоспоринів (цефазолін).

4) *Bacillus subtilis* 6633 чутливий до макролідів (еритроміцин).

5) *Micrococcus luteus* 9341 чутливий до пеніцилінів, хлорамфеніколу, макролідів, сульфаніламідів (сульфадиметоксин).

6) *Micrococcus luteus* 10240 чутливий до пеніцилінів, тетрациклінів, хлорамфеніколу, бацитрацину, цефалоспоринів (цефазолін).

7) *Bacillus cereus* 11778 чутливий до антибіотиків тетрациклінового ряду.

8) *Staphylococcus aureus* 209 *P* чутливий до макролідів (еритроміцин), пеніцилінів, хлорамфеніколу.

9) *Bacillus calidolactis* C-953 чутливий до нітрофуранів (фуразолідон, нітрофурантоїн), цефалоспоринів (цефтріаксон), пеніцилінів, хлорамфеніколу, сульфаніламідів (сульфадиметоксину).

10) *Streptococcus thermophilus* чутливий до нітрофуранів, пеніцилінів, аміноглікозидів (стрептоміцин), бацитрацину.

Висновки

1. Оптимізувано мікробіологічний метод визначення залишкової кількості антибіотиків у продуктах тваринного походження, який базується на виявленні антибіотиків у біологічних субстратах мікробіологічним методом, при якому до кожного антибіотика підбирається чутлива бактеріальна культура.

2. Визначено чутливість еталонних тест-штамів методом дифузії в агар та за отриманими результатами розроблено набір тест-культур для визначення активності антибіотиків та їх залишкової

кількості в сировині та продуктах тваринного походження.

Перспективи подальших досліджень. Сформовано новий перелік ПМП для визначення активності різних груп біологічним методом з урахуванням міжнародної нормативно-законодавчої бази. Передбачається доцільне та ефективне застосування підібраних тест-штамів мікроорганізмів для визначення активності широкого спектру антибіотиків із метою виявлення фальсифікатів, які використовуються у ветеринарній медицині.

1. Martinez J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants : Review. *Environmental Pollution*, 2009, vol. 157, pp. 2893–2902.

2. Choraine P. Antibiotic resistance and prudent use of antibiotics in veterinary medicine. *Equine Veterinary Education*, 2000, vol. 12, no 2, pp. 108–112.

3. Panin A. N., Kirillov L. V., Garbuzov A. V., Smolenskiy V. I., Ulasov V. I., Kovadlo A. M. Problemu obespecheniya kachestva lekarstvennuch sredstv [Problems of providing of quality of medications]. *Veterinarya — Veterinary*, 2007, no 9, pp. 3–5 (in Russian).

4. Sarmah A. K., Meyer M. T., Boxall A. B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics in the environment. *Chemosphere*, 2006, no 65, pp. 725–759.

5. WHO Scientific Working Group on Microbial Resistance. Control of antimicrobial resistance bacteria: Memorandum from a WHO meeting, 1983, no 61, pp. 423–433.

6. Sharaeva M. Problemu kontrolya za bezopasnostyu lekarstvennuch sredstv [Problems of control after safety of medications]. *Visnik farmakologii ta farmacii — Announcer of pharmacology and farmacii*, 2004, no 11, pp. 12–13.

7. Ushkalova E. A. Problemi falsifikacii antibiotikov [Problems of falsification of antibiotics]. *Klinicheskaya mikrobiologicheskaya antimikrobnaya himioterapiya — Clinical microbiological antimicrobial chemotherapy*, 2005, vol. 7, no 2, pp. 167–173 (in Russian).

8. Navashin S. M., Fomina I. P. *Racionalnaya antibiotikoterapiya* [Rational antibioticoterapiya]. Moscow, Medicina, 1982. 495 p. (In Russian).