

О. В. Гунар, Н. И. Каламова, Н. С. Евтушенко

ОСОБЕННОСТИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ДЕЙСТВИЕМ, ПО ПОКАЗАТЕЛЮ “МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА”

Институт Государственного контроля лекарственных средств

Микозы (грибковые заболевания людей) и микогенная аллергия являются актуальной медико-социальной проблемой для многих стран мира. За последние годы по данным клиницистов наблюдается рост заболеваемости микозами — вторичной инфекцией, связанной с грибами, возникающей при снижении резистентности организма. На это повлияло множество различных факторов, а именно: применение антибиотиков широкого спектра действия, иммуносупрессивные препараты, инвазивные методы диагностики, пересадка органов и др. Исследования, проведенные среди жителей умеренных климатических зон, показали, что хроническими грибковыми заболеваниями страдает 10–20 % населения [1].

В настоящее время известно около 80 тыс. видов грибов, из которых 150 являются первично патогенными для человека и животных, 500 — условно патогенными [2]. Хронические и рецидивирующие микозы являются, зачастую игнорированной, эпидемиологической и терапевтической проблемой, на которую в связи с ее актуальностью обращают все больше и больше внимания клиницисты, разработчики новых лекарственных средств, производители последних и структуры, гарантирующие качество препаратов.

Для выпускающих организаций и служб, контролирующих качество лекарственных средств в частности по показателю “Микробиологическая чистота”, чрезвычайно актуальными являются методики испытания конкретных препаратов с учетом их предварительной подготовки перед анализом. Именно такого рода вопросам посвящено настоящее исследование.

Материалы и методы

1. Лекарственные средства, обладающие противогрибковым действием и субстанции для их производства:

- Тербинафина гидрохлорид, субстанция
- Микотербин, субстанция
- Фунготербин мазь 1 %
- Тербинафин мазь 1 %
- Экзифин (Тербинафин) 1 % крем
- Гризеофульвин табл. 0,125 г

2. Тест-микрорганизмы

Bacillus cereus ATCC¹ 19702 (NCTC² 8035), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ВКМ 453, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (FDA³ 209), *Candida albicans* ВКПМ⁵ 401/-885-653 (ATCC 885-653), *Aspergillus niger* ATCC 9642 (аналогичен ВКМ⁴ 1119).

ATCC¹ — Американская коллекция типовых культур

NCTC² — Национальная коллекция типовых культур Великобритании

FDA³ — Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США

ВКМ⁴ — Всероссийская коллекция микроорганизмов РАН

ВКПМ⁵ — Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

Тест-штаммы *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л. А. Тарасевича (Москва). Штамм *C. albicans* получен из Всероссийского микологического Центра (Санкт-Петербург), штамм *A. niger* — из Всероссийской коллекции микроорганизмов РАН (Москва). Кроме того тест-штаммы можно получить из ВКПМ — Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (Москва).

Используемые тест-штаммы были типичными по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам. Тест-штаммы бактерий хранили при температуре (5 ± 1) °С под слоем стерильного вазелинового масла на среде Романова. Тест-культуру *C. albicans* хранили на среде N2 (агар Сабуро), в которой количество агара уменьшено до 1 %. Тест-культуру *A. niger* хранили на среде N2 (2), делая пересевы через каждые 3 мес.

Тест-культуру со среды хранения переносили в пробирки с питательным бульоном: среда N8 для бактерий, жидкая среда Сабуро — для *C. albicans*. Посевы на среде N8 инкубировали при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 18–24 ч, посевы на жидкой среде Сабуро — при температуре (22,5 ± 2,5) °С в течение 48 ч — для *C. albicans*. Посевы *A. niger* на среде N2 инкубировали при температуре (32,5 ± 2,5) °С до появления черных или темно-коричневых экзогенных спор (конидий) в течение 5–7 суток.

Перед определением антимикробного действия нестерильных лекарственных средств культуры тест-штаммов бактерий пересевали на среду N8 и инкубировали при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 18–24 ч. Культуры грибов выращивали заранее: *C. albicans* — на жидкой среде Сабуро 48 ч, а *A. niger* — на среде N2 за 5–7 суток до начала испытания.

3. Питательные среды

Для определения антимикробного действия лекарственных средств (ЛС) использовали валидированные питательные среды производства ГНЦПМ отд. “Питательные среды”, Оболенск, Московская обл.:

Среды N1^{ГРМ}, N8^{ГРМ} — для выращивания бактерий

Среда N2^{ГРМ}, жидкая среда Сабуро — для выращивания грибов

Среды N3^{ГРМ}, N4^{ГРМ} — для идентификации бактерий сем. *Enterobacteriaceae*

Среда N9^{ГРМ} — для идентификации *Pseudomonas aeruginosa*

Среда N10^{ГРМ} — для идентификации *Staphylococcus aureus*

Фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном, рН 7,0

Контроль качества лекарственных средств по показателю “Микробиологическая чистота” с 1 января 2002 года проводят, как правило, по методам и в соответствии с нормами, представленными в [3], которые должны быть включены в разделы ФСП (НД) с указанием подробной информации о пробоподготовке, антимикробном действии, испытании лекарственного средства и учете результатов контроля.

В действительности не во всех ФСП ссылаются на действующее Изменение № 2, а зарубежные НД вообще не содержали каких-либо методик, а только ссылки на другие фармакопеи.

Из исследуемых лекарственных средств подробная методика испытания по показателю “Микробиологическая чистота” с указанием антимикробного действия представлена в ФСП 42–0079198101 на Фунготербин^{ТМ} крем для наружного применения 1%: “... Препарат в условиях испытания (разведение 1:10) обладает антимикробным действием преимущественно в отношении грамположительных тест-микроорганизмов (бактерицидно на *B. subtilis* и бактериостатически на *S. aureus*). Для снятия антимикробного действия используют следующие разведения при посевах на питательные среды: N1 – 1:10 и 1:100, N2, 3 и 8 – 1:10...”. Однако, Фунготербин^{ТМ} 1% крем согласно приложенной инструкции по применению является противогрибковым средством, и фраза ФСП “...действует бактерицидно на *B. subtilis* и бактериостатически на *S. aureus*” звучит по меньшей мере не корректно. Результаты выполненных в лаборатории микробиологии ИГКЛС экспериментальных исследований пока-

зывают несколько другие разведения для снятия антимикробного действия Фунготербина^{ТМ} крема 1%.

В НД (ФСП) на другие препараты указаны лишь ссылки на ГФ XI изд. и ЕР 97 (Тербинафина г/хл субст.), на Изм. № 1 к ГФ XI изд. кат. 2 (Микотербин мазь 1%), кат. 1.2 (Микотербин субст.).

В ФС 42-1877–98 на таблетки Гризеофульвина 0,125 г в разделе “Испытание на микробиологическую чистоту” контроль “...проводят с использованием метода мембранной фильтрации по [4] и [5] (препарат обладает антимикробным действием)...”. Далее приводится конкретная методика. Однако выполнять исследование методом мембранной фильтрации при условии нерастворимости образца в воде нецелесообразно. Проведенное нами исследование антимикробного действия доказывает возможность проводить контроль качества таблетки Гризеофульвина 0,125 г по показателю “Микробиологическая чистота” прямым посевом на питательные среды.

В табл. 1 обобщена информация о производителях и требованиях, предъявляемых к качеству исследуемых лекарственных средств по показателю “Микробиологическая чистота” в нормативных документах (ФСП).

Для определения антимикробного действия лекарственных средств готовили разведения препарата 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 и т.д., используя фосфатный буферный раствор (для приготовления эмульсий в раствор добавляли не более 5% твина-80).

Суточные бульонные культуры бактерий и *S. albicans* разводили физиологическим раствором не менее, чем 1:1000. Культуру *A. niger* смывали со скошенного агара фосфатным буферным раствором с 0,05% Твина-80. Определяли количество конидий в 1 мл смыва, используя камеру Горяева или чашечный агаровый метод, и разводили до концентрации 10³ – 10⁴ КОЕ/мл.

Испытание проводили модифицированным методом определения антимикробного действия, утвержденным в [3]. Каждое разведение препарата вносили по 1 мл в чашки Петри диаметром 90 мм, в одни из которых добавляли по 0,2 мл взвеси культуры *B. cereus*, а

Таблица 1

Требования к качеству исследуемых лекарственных средств по показателю “Микробиологическая чистота”

| Наименование | Производитель | № документа | Требования в 1 г | Методы анализа |
|--|-----------------|-------------------|---|----------------------------|
| 1. Тербинафина гидрохлорид, субстанция | Испания | НД 42-11219-00 | < 1000 бактерий, < 100 грибов в отсутствие бактерий семейства <i>Enter., P. aer., S. aureus</i> | Изм. № 1 к ГФ XI или ЕР 97 |
| 2. Микотербин, субстанция | ЗАО “Ас. АЗТ” | ФСП 42-0081077601 | < 100 бактерий и грибов в отсутствие бактерий семейства <i>Enter., P. aer., S. aureus</i> | Изм. № 1 к ГФ XI, кат. 1.2 |
| 3. Фунготербин ^{ТМ} мазь 1% | “Нижфарм” | ФСП 42-0079198101 | < 100 бактерий и грибов в отсутствие бактерий семейства <i>Enter., P. aer., S. aureus</i> | Изм. № 1 к ГФ XI, кат. 2 |
| 4. Микотербин мазь 1% | ЗАО “Ас. АЗТ” | ФСП 42-0081077701 | < 100 бактерий и грибов в отсутствие бактерий семейства <i>Enter., P. aer., S. aureus</i> | Изм. № 1 к ГФ XI, кат. 2 |
| 5. Эскифин 1% крем | Индия | НД 42-9795–99 | – | Изм. № 1 к ГФ XI, кат. 2 |
| 6. Гризеофульвин таблетки | ОАО “Биосинтез” | ФС 42–1877–98 | < 1000 бактерий, < 100 грибов в отсутствие бактерий семейства <i>Enter., P. aer., S. aureus</i> | Изм. № 1 к ГФ XI изд. |

Антимикробное действие исследуемых лекарственных средств

| Наименование препарата | Разведение ЛС для снятия антимикробного действия в отношении тест-микробов | | | | | |
|--|--|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| | <i>B. cereus</i> ATCC 10702 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S. aureus</i> ATCC 6538-P | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 | <i>C. albicans</i> ATCC 885 – 653 | <i>A. niger</i> ATCC 9642 |
| 1. Тербинафина гидрохлорид, субстанция | 1 : 50 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10000 | более 1 : 10 ⁶ |
| 2. Микотербин, субстанция | 1 : 50 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10000 | более 1 : 10 ⁶ |
| 3. Фунготербин мазь 1 % | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 10 ⁴ |
| 4. Тербинафин мазь 1 % | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 10 ⁴ |
| 5. Экзифин | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 ⁴ |
| 6. Гризеофульвин таблетки | 1 : 50 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 |

в оставшиеся — по 0,2 мл культур *C. albicans* и *A. niger*. Чашки с бактериями заливали 7–10 мл расплавленной и охлажденной до 45°C средой N1, чашки с культурами грибов — тем же количеством среды N2. Каждое разведение препарата вносили по 1 мл в пробирки с 10 мл жидких сред N3 и N8, куда затем добавляли по 1 мл взвеси *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* соответственно средам, каждый микроорганизм отдельно. В контрольные чашки и пробирки вместо разведений препарата вносили такое же количество растворителя. Посевы на средах N1, 3, 8 инкубировали при температуре (32,5 ± 2,5) °C в течение 2 сут (среды N2, 8) и 5 сут (среда N1). Посевы на среде N2 инкубировали при температуре (22,5 ± 2,5) °C в течение 5 суток.

После окончания сроков инкубации, т.е. по появлению типичного роста тест-микробов в контрольных чашках без препарата, отмечали наличие или отсутствие роста тест-штаммов бактерий и грибов на средах, в которые вносили различные разведения препарата. В случае, если при внесении препарата в жидкие питательные среды (N3, N8) образуется помутнение, препятствующее учету результатов, делали пересев со среды N3 на среду N4 (агар Эндо), а со среды N8 — на среды N9 и N10. При росте типичных колоний *E. coli* (среда N4), *P. aeruginosa* (среда N9), *S. aureus* (среда N10) отмечали наличие роста тест-микробов. Результаты представлены в табл. 2.

По данным таблицы четко прослеживается наличие противогрибкового действия у субстанций Тербинафина гидрохлорид и Микотербина в отношении *C. albicans* и *A. niger*, у Фунготербин™ мази 1 %, Микотербин мази 1 %, Экзифина — в отношении *A. niger* и незначительное в отношении *C. albicans*.

Интересные данные получены в результате определения антимикробного действия таблеток Гризеофульвина 0,125 г. По классификации Машковского М. Д. этот препарат является противогрибковым антибиотиком. Однако, в условиях испытания лекарственного средства на “Микробиологическую чистоту” Гризеофульвин (табл. 2) обладает лишь бактериостатическим действием в отношении грамположительных аэробных бактерий *B. cereus*, которое снимается разведением образца 1 : 50. В отношении других тест-микробов, в том числе дрожжевых (*C. albicans*) и плесневых грибов (*A. niger*), антимикробное действие не выявлено.

Таким образом, прежде чем контролировать качество лекарственных средств по показателю “Микробиологическая чистота” целесообразно провести исследование антимикробного действия в условиях испытания микробиологической чистоты для того, чтобы исключить ложно отрицательные результаты.

По данным, полученным в результате исследования, можно сделать некоторые заключения:

1. При анализе образцов Гризеофульвина таблетки 0,125 г целесообразно использовать разведение 1 : 50 для посева на среду № 1 (количественное определение аэробных бактерий) и разведение 1 : 10 для посева на среду № 2 (количественное определение грибов) и № 11 (определение *E. coli*).

2. Субстанция Микотербина (Тербинафина гидрохлорид) обладала настолько сильным противогрибковым действием, что снять его разведением не представлялось возможным. Выполнять анализ качества субстанции методом мембранной фильтрации нецелесообразно, так как лекарственное средство не растворяется в воде или буферном растворе. Если в дальнейшей работе не будут обнаружены инактиваторы противогрибкового действия субстанции Микотербина, вероятно, следует исключить из раздела “Микробиологическая чистота” количественное определение дрожжевых и плесневых грибов.

3. Для мази, изготовленной на основе субстанции Микотербина, обладающей противогрибковым действием в отношении *A. niger*, которое не снимается корректным разведением, испытание количественного содержания грибов сохраняется и распространяется только на дрожжевые и дрожжеподобные грибы.

ЛИТЕРАТУРА

- Н. З. Ягвдик, Р. Н. Пилькевич, *Новости медицины и фармации*, № 3 – 4, 53 – 54 (1997).
- Л. Б. Борисов, *Медицинская микробиология, вирусология, иммунология*, ООО “Медицинское информационное агентство”, Москва (2001), с. 606.
- Изменение № 2 к ГФ XI изд. от 14.08.2001 г.
- Государственная фармакопея СССР XI изд.*, вып. 2, т. 2, Москва (1990), сс. 193 – 200.
- Изменение к ГФ XI изд.*, вып. 2 “Методы микробиологического контроля лекарственных средств” от 28 дек. 1995 г, Москва (1995).

Поступила 11.06.02