

М. В. Рощина, О. В. Гунар, Н. Г. Сахно

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.

В настоящее время за рубежом регламентировано использование стандартных и альтернативных методов определения стерильности лекарственных препаратов, наиболее важной характеристикой которых является предел обнаружения — наименьшее количество жизнеспособных микроорганизмов, которое может быть выявлено в исследуемом образце. Целью исследования явилось экспериментальное определение и сравнение пределов обнаружения микроорганизмов методом прямого посева и с помощью автоматического бактериологического анализатора BacT/ALERT 3D Microbial Detection System. Не выявлено статистически значимых различий между результатами, получаемыми разными методами.

Ключевые слова: лекарственные средства; анализ стерильности; предел обнаружения; чувствительность метода.

Оценка качества и безопасности лекарственных препаратов (ЛП), поступающих на потребительский рынок, является одной из основных задач фармацевтической отрасли. Одними из наиболее важных параметров, характеризующих качество ЛП, являются их стерильность [1] и микробиологическая чистота [2]. На сегодняшний день, стерильные лекарственные средства (ЛС) занимают значительную долю фармацевтического рынка Российской Федерации и играют важную роль в терапии различных заболеваний.

Наряду с методами прямого посева и мембранной фильтрации для испытания стерильности ЛС Американская и Европейская фармакопеи [3, 4] предусматривают использование альтернативных микробиологических методов, направленных на получение более быстрых, точных, чувствительных и воспроизводимых результатов. В 2006 г. Центром по оценке и исследованию биопрепаратов США (CDER) была опубликована статья с доказательствами того, что новые микробиологические методы имеют неоспоримые преимущества по скорости и точности при определении качества ЛС [5].

В данной работе проводили сравнение методов, наиболее подходящих для анализа качества нефилтрирующихся ЛП: прямого посева и альтернативного, основанного на колориметрическом определении диоксида углерода (CO_2) в среде культивирования.

Микроорганизмы (аэробные и анаэробные бактерии, дрожжевые и плесневые грибы), активно размножающиеся в соответствующей жидкой культуральной среде, утилизируют определенные питательные вещества и образуют продукты жизнедеятельности — углекислый газ и другие метаболиты. Количество продуцируемого диоксида углерода в закрытых флаконах может быть детектировано и использовано в качестве показателя присутствия растущих микроорганизмов.

Уровень углекислого газа, определяемый сенсором, зависит от начальной концентрации микроорганизмов,

т.е. более высокая начальная концентрация обеспечивает более быстрое обнаружение.

Описанный принцип реализован в таких приборах как BacT/ALERT (Biomerieux, Франция), BACTEC (Becton Dickinson, США), VersaTREK (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение стерильности является качественным методом, поэтому для установления несоответствия серии ЛП по показателю "Стерильность" необходимо и достаточно, чтобы в числе исследуемых образцов нестерильной была бы хоть 1 единица (ампула, флакон и др.) препарата. Цель испытания на стерильность — подтверждение полного отсутствия жизнеспособных микроорганизмов в анализируемом ЛС. Вероятность выявления контаминации, как правило, возрастает с увеличением количества микробных клеток в исследуемом образце и варьируется в зависимости от вида присутствующего микроорганизма [6].

Для объективной оценки возможностей альтернативного микробиологического метода необходимо выполнить сравнение характеристик быстрого и референсного метода, среди которых одной из наиболее важных является предел обнаружения (LOD – limit of detection). Предел обнаружения в микробиологии — это наименьшее количество микроорганизмов, которое может быть определено [7].

Цель настоящей работы — установление и сравнение пределов обнаружения различных микроорганизмов методом прямого посева на питательные среды [8] и с помощью автоматизированной системы BacT/ALERT 3D Microbial Detection System производства Biomerieux, Франция.

Трудность экспериментального установления предела обнаружения заключается в том, что все микробиологические методы обладают высокой вариабельностью. Для получения достоверных данных используют методику последовательных разведений с после-

Таблица 1

Тест-штаммы микроорганизмов

| Название микроорганизма | Номер штамма |
|--------------------------------|------------------------|
| Аэробные бактерии | |
| <i>Bacillus subtilis</i> | ATCC 19659, NCTC 10400 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 9027, NCTC 12924 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | NCTC 12696 |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> | ГКПМ 300205 |
| <i>Kocuria rhizophila</i> | ATCC 9341 |
| Анаэробные бактерии | |
| <i>Clostridium sporogenes</i> | ATCC 19404, NCTC 12935 |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | DSM 1897 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ВКМ В-602 |
| <i>Enterococcus hirae</i> | ВКМ В-2107 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | ВКМ В-578 |
| Дрожжеподобные грибы | |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC 10231, NCPF 3179 |

дующей инокуляцией питательных сред несколькими концентрациями микроорганизмов [9].

Экспериментальная биологическая часть

Для определения предела обнаружения использованы тест-штаммы аэробных и анаэробных бактерий, а также дрожжеподобных грибов (табл. 1).

При определении предела обнаружения микроорганизмов использованы питательные среды:

для прямого посева — жидкая тиогликолевая среда для выделения аэробных и анаэробных бактерий, триптиказо-соевый бульон (TSB) и жидкая среда Сабуро для выделения дрожжевых и плесневых грибов,

для автоматизированной системы ВаcT/ALERT 3D – SA (среда на основе триптиказо-соевого бульона) для выделения аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов), SN (среда на основе TSB) для выделения анаэробных микроорганизмов.

Приготовление инокулята. В работе использовали:

1. 24-часовые культуры микроорганизмов, выращенные на скошенной плотной питательной среде (*P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* ВКМ В-602, *E. hirae* ВКМ В-2107, *A. faecalis* ГКПМ 300205, *K. rhizophila* ATCC 9341, *C. sporogenes* ATCC 19404 — на триптиказо-соевом агаре; *L. plantarum* ВКМ В-578 — на лактобакагаре; *C. albicans* ATCC 10231 на агаре Сабуро с хлорамфениколом), которые смывали стерильным раствором хлорида натрия 0,9 %. Затем с помощью стандартного образца мутности ВОЗ (10 ЕД) готовили микробные взвеси с концентрацией клеток 10^9 КОЕ/мл для бактерий и 10^7 КОЕ/мл для *C. albicans*.

2. Эталонные образцы BioBall производства Biomeieux, Франция с количеством 10^4 КОЕ для *B. subtilis* NCTC 10400, *S. pyogenes* NCTC 12696, *P. acnes* DSM 1897, *P. aeruginosa* NCTC 12924, *C. albicans* NCPF 3179 и 550 КОЕ для *C. sporogenes* NCTC 12935, растворенные в специальной жидкости для регидратации.

Таблица 2

Предел обнаружения микроорганизмов (LOD₅₀) и доверительные интервалы (CI)

| Тест-штамм | Метод прямого посева, КОЕ/10 мл | ВаcT/ALERT 3D, КОЕ/10 мл |
|----------------------|---------------------------------|--------------------------|
| <i>B. subtilis</i> | 35,5 (21,6 – 58,2) | 3,5 (2,3 – 5,3) |
| <i>S. aureus</i> | 12,6 (10,5 – 15,1) | 5,2 (3,3 – 8,1) |
| <i>P. aeruginosa</i> | 1,32 (1,10 – 1,58) | 2,8 (2,0 – 3,8) |
| <i>S. pyogenes</i> | 91,6 (65,4 – 128,2) | 5,1 (3,6 – 7,4) |
| <i>K. rhizophila</i> | 28,2 (17,9 – 44,2) | 27,2 (15,3 – 48,4) |
| <i>L. plantarum</i> | 44,6 (26,0 – 76,7) | 15,3 (10,2 – 23,0) |
| <i>A. faecalis</i> | 14,1 (8,2 – 24,3) | 13,6 (8,6 – 21,4) |
| <i>C. albicans</i> | 12,8 (10,7 – 15,4) | 4,0 (2,8 – 5,8) |

3. Готовую суспензию спор *B. subtilis* ATCC 19659, производства Мерск, Германия концентрацией 10^7 КОЕ/мл.

Путем последовательных разведений получали взвеси тест-штаммов с теоретическим содержанием клеток 50, 10, 5, 1, 0,5 и 0,05 КОЕ/мл.

Для подтверждения правильности выполненных разведений (положительный контроль) и установления фактического содержания клеток в суспензиях, проводили посев 0,1 мл из разведения 10^2 КОЕ/мл поверхностным методом на агаризованные питательные среды. Через 24 – 48 ч проводили подсчет выросших колоний.

Инокуляция образцов. В асептических условиях во флаконы и пробирки вносили по 1 мл инокулята необходимой концентрации каждого микроорганизма в 10-кратной повторности. Пробирки инкубировали в термостатах при температурах ($32,5 \pm 2,5$) °C для бактерий и ($22,5 \pm 2,5$) °C для *C. albicans* в течение 14 сут. Зараженные флаконы помещали в инкубационный модуль прибора ВаcT/ALERT 3D и культивировали 7 сут при ($35,0 \pm 0,5$) °C.

Наблюдение и учет результатов проводили ежедневно, для определения роста микроорганизмов просматривали пробирки в проходящем свете, наличие роста отмечали при помутнении, образовании пленки или появлении осадка. Система ВаcT/ALERT 3D проводила автоматический мониторинг с детекцией контаминированных флаконов и построением кривых роста микроорганизмов.

Для статистической обработки данных использовали обобщенную формулу Спирмена — Кербера [10], с помощью которой проводили вычисление 50 % предела обнаружения (LOD₅₀). Указанный параметр характеризует количество клеток микроорганизмов, которое возможно выделить в 50 % случаев. Также был проведен расчет доверительных интервалов (CI) для вычисленных значений LOD₅₀.

Результаты и их обсуждение

Сравнения фармакопейных и альтернативных микробиологических методов по различным параметрам, таким как время, правильность, количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов и

Таблица 3

Предел обнаружения и доверительные интервалы для облигатных и факультативно анаэробных бактерий

| Тест-штамм | Метод прямого посева (жидкая тиогликолевая среда), КОЕ/10 мл | BacT/ALERT 3D | |
|----------------------|--|----------------------|----------------------|
| | | среда SA, КОЕ/10 мл | среда SN, КОЕ/10 мл |
| <i>C. sporogenes</i> | 7,1 | НР | < 1 |
| <i>P. acnes</i> | 73,2 (52,3 – 102,5) | НР | 7,8 (5,0 – 11,9) |
| <i>E. hirae</i> | 17,8 (11,3 – 27,9) | 15,5 (5,4 – 44,5) | 8,3 (4,7 – 14,8) |
| <i>E. faecalis</i> | 11,2 (6,0 – 21,1) | 9,8 (3,1 – 30,9) | 10,1 (4,9 – 20,8) |

др., неоднократно проводился за рубежом [11 – 14], однако эксперименты по установлению LOD₅₀ и их сравнение в литературе не описаны. Однако именно предел обнаружения в значительной степени определяет чувствительность метода. Результаты проведенного нами исследования представлены в табл. 2 и 3.

Как видно из приведенных данных, для большинства аэробных микроорганизмов возможно выделение единичных клеток как при прямом посеве, так и с помощью альтернативного метода колориметрического определения CO₂. Чувствительность автоматизированной системы BacT/ALERT 3D в ряде случаев до 18 раз выше, чем у фармакопейного метода. Следует отметить, что разница пределов обнаружения некоторых микроорганизмов (например, *K. rhizophila* и *A. faecalis*) обоими методами была незначительна. Напротив, максимальное различие наблюдалось в случае бактерий *S. pyogenes*. При выявлении клеток дрожжеподобных грибов *C. albicans* методом прямого посева жидкая среда Сабуро и TSB обладали равнозначной чувствительностью и также позволяли обнаружить единичные клетки. Однако предел обнаружения альтернативным методом в несколько раз меньше референсного.

Определенные методические сложности при испытании стерильности ЛС вызывало выделение анаэробных бактерий. В настоящем исследовании при определении пределов обнаружения микроорганизмов *C. sporogenes*, *P. acnes*, *E. hirae* и *E. faecalis*, использованы флаконы с SA и SN для выявления наиболее оптимальной питательной среды (табл. 3).

Из представленных данных видно, что для определения минимального количества *E. hirae* больше подходили анаэробные условия флаконов SN, в то время как для *E. faecalis* нет существенной разницы. Анаэробные бактерии *P. acnes* и *C. sporogenes* не образовывали роста на питательной среде SA, в то время как чувствительность специальной среды SN на порядок превышала значения, полученные методом прямого посева.

В результате проведенного исследования определена основная характеристика правильности — критерий Фишера (F), вычисленные значения которого не превышали табличные ($F_{\text{выч.мах}} = 18,09 < F_{\text{табл}} = 19,00$), что свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий между результатами, получаемыми разными методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. В. Супотницкий, А. А. Елапов, И. В. Борисевич и др., *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, **53**(1), 36 – 44 (2015); M. V. Supotnitskiy, A. A. Elapov, I. V. Borisevich, et al., *Biopreparations. Prevention, diagnosis, treatment*, **53**(1), 36 – 44 (2015).
2. О. В. Гунар, Н. Г. Сахно, М. В. Рощина и др., *Ведомости науч. центра экспертизы средств мед. применения*, № 4, 7 – 11 (2014); O. V. Gunar, N. G. Sakhno, M. V. Roshchina, et al., *Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin*, № 4, 7 – 11 (2014).
3. *Validation of alternative microbiological methods*, The United State Pharmacopeia, 38th ed., The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD (2015).
4. *Alternative methods for control of microbiological quality*, *European Pharmacopeia*, 9th ed., Council of Europe, Strasbourg (2017).
5. D. Hussong, *Am. Pharm. Rev.*, № 9, 62 – 69 (2006).
6. Ashutosh Kar, *Pharmaceutical microbiology*, New Age International (P) Ltd., Publishers, New Delhi (2008).
7. *Method validation of U. S. environmental protection agency microbiological methods of analysis*; [Электронный ресурс] // https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-01/documents/final_microbiology_method_guidance_110409.pdf.
8. *Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации*, XIII изд., Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва (2015), сс. 925 – 946.
9. G. P. H. T. Verdonk, M. J. Willemse, S. G. G. Hoefs, et al., *J. Microbiol. Methods*, **82**, 193 – 197 (2010).
10. *Final report and executive summaries from the AOAC International Presidential task force on best practices in microbiology methodology*, AOAC International, Gaithersburg, MD (2006).
11. S. Amer, A. El Hefnawy, M. Mahmoud, et al., *Egyptian J. Med. Microbiol.*, **25**(4), 105 – 111 (2016).
12. E. Plantamura, G. Huyghe, B. Panterne, et al., *Cell Tissue Bank*, **13**, 453 – 459 (2012).
13. A. Nutman, S. Fisher Even-Tsur, G. Shapiro, et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **35**, 1469 – 1473 (2016).
14. O. Altun, M. Almuhayawi, P. Luthje, et al., *J. Clin. Microbiol.*, **54**(4), 1148 – 1151 (2016).

Поступила 07.04.17

LIMIT OF DETECTION OF MICROORGANISMS IN STERILITY TESTING OF DRUGS

M. V. Roshchina, O. V. Gunar, and N. G. Sakhno

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russian Federation

The use of compendial and alternative methods for sterility testing of pharmaceutical products is currently regulated abroad. The most important characteristic of these methods is the limit of detection (LOD) – the minimum amount of microorganisms that can be detected by the given method in a sample. This study objective was aimed at experimental determination and comparison of the LOD of viable microorganisms by direct inoculation of the culture medium and using an automated bacteriological analyzer BacT/ALERT 3D Microbial Detection System. The results showed no significant differences between data obtained by different methods.

Keywords: pharmaceutical products; sterility testing; limit of detection; sensitivity of method.