

Н. Г. Сахно, О. В. Гунар, М. В. Рощина,
Л. В. Колосова, В. Э. Григорьева

ВЫДЕЛЕНИЕ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ АНАЛИЗЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2; e-mail: gunarov@inbox.ru

Рассмотрены особенности выделения анаэробных микроорганизмов. Установлены предел обнаружения, частота и время выделения некоторых анаэробных бактерий методом прямого посева на тиогликолевую среду и с помощью автоматизированной системы VacT/ALERT 3D. Показано, что использование тиогликолевой питательной среды при анализе стерильности лекарственных средств позволяет выделять единичные клетки анаэробных микроорганизмов с различной степенью толерантности к кислороду. Использование специальной питательной среды позволяет достоверно определять минимальное количество клеток в образце в более короткие сроки с помощью автоматизированной системы VacT/ALERT 3D.

Ключевые слова: лекарственные средства; анаэробные микроорганизмы; анализ стерильности.

В зависимости от типов реакций, которые микроорганизмы используют для получения энергии, их подразделяют на аэробные, анаэробные или факультативные. Кроме того, существуют микроорганизмы, которые растут при пониженном парциальном давлении кислорода, но не являются облигатными анаэробами. Их принято называть микроаэрофилами [1].

Анаэробные микроорганизмы широко распространены в природе, многие из них являются частью нормальной микрофлоры человека и животных. В то же время они играют большую роль в развитии различных заболеваний. Например, из всех случаев подтвержденной бактериемии анаэробная инфекция составляет до 10 %. Средняя смертность от анаэробной бактериемии составляет 14 – 30 %. Половину анаэробных микроорганизмов, выделенных из крови пациентов, составляют бактерии *Bacteroides fragilis*, четвертую часть – *Clostridium spp.* и *Fusobacterium spp.* [2].

Учитывая потенциальную опасность для здоровья человека, контаминация анаэробными микроорганизмами лекарственных средств (ЛС) крайне нежелательна. Особое значение имеет своевременное выделение анаэробных бактерий из стерильных лекарственных препаратов для парентерального введения или нанесения на открытые раны или ожоги. Особую группу анализируемых объектов составляют биомедицинские клеточные продукты [3]. По данным различных исследователей, микробная контаминация клеточных продуктов составляет 1,2 – 4,8 % [4 – 8] и зависит от типа и источника их получения. При этом видовой состав микроорганизмов-контаминантов весьма разнообразен. Так, например, для клеток, полученных из пуповинной крови, характерными контаминантами являются анаэробные и факультативно-анаэробные бактерии (*Bacteroides vulgatus*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.* (не *perfringens*), *Escherichia coli*,

Klebsiella pneumonia, *Peptostreptococcus spp.*, *Enterococcus spp.* (в том числе *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*), *Lactobacillus helveticus* и др.) [4, 9].

Согласно Государственной фармакопее, определение анаэробных микроорганизмов предусмотрено в рамках испытания стерильности ЛС [10]. В некоторых зарубежных фармакопеях представлены методики качественного и количественного определения бактерий *Clostridium spp.* и *C.perfringens* в частности [11 – 13]. Однако требования к нормированию указанных анаэробных микроорганизмов отсутствуют.

Выделение и идентификация анаэробных бактерий представляет собой сложную задачу в связи с тем, что в большинстве случаев они представляют собой прихотливые, медленнорастущие, трудно культивируемые микроорганизмы. Для их выращивания необходимо создать особые условия за счет использования оборудования, достоверно поддерживающего анаэробные условия, и специальные питательные среды.

Исторически одной из первых сред, предложенных для культивирования облигатно анаэробных бактерий, являлась среда Китт — Тароцци [14]. Она сохранила свое значение и до сегодняшнего дня, ее рекомендовано применять для выращивания тест-штамма *C. novyi* 198 ГКПМ 242484 [10]. Этот микроорганизм применяют для анализа питательной среды, используемой при испытании стерильности только иммунобиологических ЛС. В определенной степени вариантом среды Китт — Тароцци является бульон с рубленным мясом и глюкозой, нашедший достаточно широкое распространение. В частности, использование этой среды предусмотрено Китайской фармакопеей для выделения *Clostridium spp.* в рамках определения микробиологической чистоты нестерильных ЛС [11]. Однако некоторые исследователи показывают, что среды с рубленным мясом прекрасно подходят для долгосрочного хране-

ния анаэробных микроорганизмов на протяжении более 8 недель. Однако для культивирования большинства анаэробных микроорганизмов целесообразно использовать тиогликолевую питательную среду, которая в настоящее время применяется в мировой практике фармацевтического анализа при определении стерильности ЛС [15].

Наряду с методами прямого посева и мембранной фильтрации, для испытания стерильности ЛС Фармакопея США и Европейская фармакопея [12, 13] предусматривают использование альтернативных микробиологических методов, направленных на получение более быстрых, точных, чувствительных и воспроизводимых результатов. Наибольшее распространение для анализа стерильности нефилтрирующихся препаратов, какими являются биомедицинские клеточные продукты, в настоящее время получает метод, основанный на колориметрическом определении диоксида углерода (CO₂) в среде культивирования. Данный принцип реализован в таких приборах как VacT/ALERT (Biomerieux, Франция), VACTEC (Becton Dickinson, США), VersaTREK (Thermo Fisher Scientific, США).

Цель настоящей работы — установление и сравнение предела обнаружения, частоты и времени выделения некоторых анаэробных микроорганизмов методом прямого посева на тиогликолевую среду и с помощью автоматизированной системы VacT/ALERT 3D Microbial Detection System производства Biomerieux, Франция.

Экспериментальная биологическая часть

В работе были использованы различные тест-штаммы анаэробных бактерий: *Clostridium sporogenes* ATCC 19404; *Bacteroides fragilis* ATCC 25285; *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482; *Enterococcus faecalis* ВКПМ В-602; *Enterococcus hirae* ВКПМ В-12152; *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-11007; *Propionibacterium acnes* DSM 1897.

Для установления предела обнаружения и времени определения использовали пробирки с готовой к применению жидкой тиогликолевой средой с резазурином, а также флаконы для системы VacT/ALERT 3D со средой на основе триптиказо-соевого бульона для вы-

деления анаэробных микроорганизмов (SN) и для выделения аэробных микроорганизмов (SA).

В работе использовали:

1. 24-часовые культуры микроорганизмов, выращенные на скошенной плотной питательной среде (*E. faecalis* ВКМ В-602, *E. hirae* ВКМ В-2107 — на триптиказо-соевом агаре; *L. plantarum* ВКМ В-578 — на лактобакагаре), которые смывали стерильным раствором хлорида натрия 0,9 %. Затем с помощью стандартного образца мутности ВОЗ (10 ЕД) готовили микробные взвеси с концентрацией клеток 10⁹ КОЕ/мл.

2. Эталонные образцы BioBall производства Biomerieux, Франция с количеством 10⁴ КОЕ для *P. acnes* DSM 1897, и 550 КОЕ для *C. sporogenes* NCTC 12935, растворенные в специальной жидкости для ре-гидратации.

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

В асептических условиях во флаконы и пробирки вносили по 1 мл инокулята необходимой концентрации каждого микроорганизма в 10-кратной повторности. Пробирки с тиогликолевой средой инкубировали в термостате при температуре (32,5 ± 2,5) °С; зараженные флаконы помещали в инкубационный модуль прибора VacT/ALERT 3D и культивировали 7 сут при (35,0 ± 0,5) °С [16].

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 VacT/ALERT 3D проводила автоматический мониторинг с детекцией контаминированных флаконов и построением кривых роста микроорганизмов.

Для статистической обработки данных использовали обобщенную формулу Спирмена — Кербера [17], 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.

Таблица 1
Предел обнаружения и доверительные интервалы для облигатных и факультативно анаэробных бактерий LOD₅₀ (CI)

Микроорганизм	Метод прямого посева, КОЕ/10 мл	VacT/ALERT 3D, КОЕ/10 мл	
		среда SN	среда SA
<i>C. sporogenes</i>	7 (3 – 16)	0,4 (0,2 – 0,9)	Роста нет
<i>B. fragilis</i>	18 (11 – 28)	7 (3 – 20)	Роста нет
<i>B. vulgatus</i>	28 (14 – 58)	18 (11 – 29)	Роста нет
<i>E. faecalis</i>	11 (6 – 21)	10 (5 – 21)	10 (3 – 31)
<i>E. hirae</i>	18 (11 – 28)	8 (5 – 15)	16 (5 – 45)
<i>L. plantarum</i>	45 (26 – 77)	15 (10 – 23)	14 (8 – 24)
<i>P. acnes</i>	73 (53 – 103)	8 (5 – 12)	Роста нет

Таблица 2
Процент восстановления единичных клеток анаэробных микроорганизмов

Микроорганизм	Метод прямого посева		VacT/ALERT 3D	
	N	R, %	N	R, %
<i>C. sporogenes</i>	20	95	5	100
<i>B. fragilis</i>	5	100	10	100
<i>B. vulgatus</i>	5	60	10	80
<i>E. faecalis</i>	5	80	10	100
<i>E. hirae</i>	5	80	10	100
<i>L. plantarum</i>	5	40	10	60
<i>P. acnes</i>	5	50	15	100
Все штаммы	50	82,0	70	88,6

Процент восстановления (R , %) рассчитывали как отношение количества флаконов, в которых наблюдался рост, к общему количеству инокулированных флаконов (N). Вычисление среднего времени обнаружения микроорганизмов проводили с помощью функции медиана.

Результаты и их обсуждение

На достоверность результатов определения стерильности ЛС оказывает влияние ряд факторов. Ключевую роль играет чувствительность питательной среды (предел обнаружения), так как теоретически присутствие единичных жизнеспособных клеток микроорганизма должно быть достаточно для получения положительного результата. Настоящая работа представляет собой расширенное и дополненное сравнительное исследование методов определения стерильности, отдельные результаты которого были опубликованы в 2017 г. [18]. Однако в данной статье акцент сделан на выделение именно анаэробных микроорганизмов. При прямом посеве инкубацию проводили на тиогликолевой питательной среде, при использовании системы BacT/ALERT 3D — на 2 видах флаконов: SA и SN. Результаты представлены в табл. 1.

Из полученных данных видно, что метод прямого посева на тиогликолевую среду позволяет выделять единичные клетки анаэробных бактерий. Наблюдаемые различия, очевидно, связаны с отношением к кислороду и скоростью метаболизма отдельных видов микроорганизмов. В целом предел обнаружения исследуемых анаэробных микроорганизмов был ниже при использовании среды SN, чем при использовании тиогликолевой среды в 1,1 – 9,4 раза. Для обнаружения облигатных анаэробов *Bacteroides spp.*, а также аэротолерантных бактерий *C. sporogenes* и *P. acnes* с помощью системы BacT/ALERT 3D необходимо использовать питательную среду SN. В то же время факультативные анаэробы *Enterococcus spp.*, аэротолерантные (микроаэрофильные) бактерии *L. plantarum* могут расти как на среде SA, так и на среде SN. Интересно отметить, что предел обнаружения *E. faecalis* не зависит от вида используемой питательной среды и способа детекции.

Степень вероятности выделения микроорганизмов из ЛС, как правило, увеличивается с возрастанием ко-

личества клеток в образце, а также варьируется в зависимости от вида присутствующего микроорганизма [19]. Данный вывод находит подтверждение и в настоящей работе. В табл. 2 приведены проценты восстановления изучаемых микроорганизмов.

Как видно из представленных данных, процент восстановления единичных клеток микроорганизмов на среде SN с помощью системы BacT/ALERT 3D выше, чем методом прямого посева на тиогликолевую среду.

Полученный процент восстановления анаэробных микроорганизмов с помощью системы BacT/ALERT 3D составляет 88,6 % при микробной нагрузке 5 КОЕ. По данным литературы, при выделении *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* из образцов крови, содержащих примерно по 1000 КОЕ, вероятность обнаружения с помощью системы BacT/ALERT составляла 85,0 % [2].

В табл. 3 представлено среднее, минимальное и максимальное время обнаружения микроорганизмов 2 методами.

Согласно полученным результатам, а также данным литературы, время определения микроорганизмов автоматической детекцией роста в большинстве случаев существенно меньше того, которое требуется для визуального установления, а ширина временного диапазона зависит от вида выделяемого микроорганизма и его состояния [20, 21]. Так, например, рост медленно-растущих бактерий *P. acnes*, выделенных в лабораторных условиях и находящихся в угнетенном состоянии, зафиксирован лишь в течение 7 – 14 сут даже при сравнительно высокой концентрации микробных клеток (> 200 КОЕ/флакон). Напротив, для детекции того же вида, полученного из официальной коллекции (ATCC), требуемый период инкубации не превышал 7 сут [21].

Таким образом, использование тиогликолевой питательной среды при анализе стерильности ЛС позволяет выделять анаэробные микроорганизмы с различной степенью толерантности к кислороду.

При использовании автоматизированной системы BacT/ALERT 3D для обнаружения анаэробных бактерий целесообразно использовать среду SN. Это позволяет достоверно определять минимальное количество клеток в образце в более короткие сроки.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. J. Hentges, in: *Medical Microbiology*, 4th ed., S. Baron (ed.), University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, TX (1996), chapter 17.
2. M. Mueller-Premru, S. Jeverica, L. Papst, et al., *Anaerobe*, **45**, 59 – 64 (2017).
3. М. В. Супотницкий, А. А. Елапов, И. В. Борисевич и др., *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, **53**(1), 36 – 44 (2015); М. В. Супотницкий, А. А. Елапов, И. В. Борисевич, et al., *Biopreparations. Prevention, diagnosis, treatment*, **53**(1), 36 – 44 (2015).
4. M. A. Klein, D. Kadidlo, J. McCullough, et al., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, **12**(11), 1142 – 1149 (2006).
5. R. Kamble, S. Pant, G. B. Selby, et al., *Transfusion*, **45**(6), 874 – 878 (2005).

Таблица 3
Время обнаружения анаэробных микроорганизмов (ч)

Микроорганизм	Метод прямого посева	BacT/ALERT 3D
<i>C. sporogenes</i>	116 (114 – 168)	20 (19 – 44)
<i>B. fragilis</i>	96*	67 (60 – 79)
<i>B. vulgatus</i>	96*	25 (21 – 180)
<i>E. faecalis</i>	24 (24 – 138)	18 (17 – 24)
<i>E. hirae</i>	24 (24 – 138)	20 (17 – 21)
<i>L. plantarum</i>	72*	45 (42 – 60)
<i>P. acnes</i>	129 (117 – 165)	96 (94 – 99)

* Все результаты параллельных определений получены в одно время.

6. P. A. Patah, S. Parmar, J. McMannis, et al., *Bone Marrow Transplant.*, **40**, 365 – 368 (2007).
7. M. R. Jacobs, C. E. Good, R. M. Fox, et al., *Transfusion*, **53**(11), 2690 – 2696 (2013).
8. I. D. Almeida, T. Schmalfluss, L. M. Rohsig, et al., *Brazil. J. Infect. Diseases*, **16**(4), 345 – 350 (2012).
9. J. M. Bello-López, J. Noguerón-Silva, J. I. Castañeda-Sánchez, et al., *Brazil. J. Infect. Diseases*, **19**(6), 571 – 577 (2015).
10. *Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд.*, Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва (2015), сс. 925 – 946.
11. *Pharmacopoeia of the people's republic of China*, Vol. 2, People's medical publishing house (2005).
12. *The United State Pharmacopoeia*, 40th ed., The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD (2017).
13. *European Pharmacopoeia*, 9th ed., Council of Europe, Strasbourg (2017).
14. М. С. Поляк, В. И. Сухаревич, М. Э. Сухаревич, *Путательные среды для медицинской микробиологии*, Санкт-Петербург (2002).
15. M. C. Claros, D. M. Citron, E. J. C. Goldstein, *J. Clin. Microbiol.*, **33**(9), 2505 – 2507 (1995).
16. О. В. Гунар, Н. Г. Сахно, М. В. Рошина, *Ведомости Научного центра экспертизы средств мед. применения*, № 4, 12 – 17 (2013); О. В. Гунар, Н. Г. Сахно, М. В. Рошина, *Scientific Centre for Expert Evaluation of Med. Products Bul.*, № 4, 12 – 17 (2013).
17. *Final report and executive summaries from the AOAC International Presidential task force on best practices in microbiology methodology*, AOAC International, Gaithersburg (MD) (2006).
18. М. В. Рошина, О. В. Гунар, Н. Г. Сахно, *Хим.-фарм. ж.*, **51**(6), 62 – 64 (2017); *Pharm. Chem. J.*, **51**(6), 508 – 520 (2017).
19. Ashutosh Kar, *Pharmaceutical microbiology*, New Age International (P) Ltd Publishers, New Delhi (2008).
20. H. M. Khuu, F. Stock, M. McGann, et al., *Cytotherapy*, **6**(3), 183 – 195 (2004).
21. S. Akel, J. Lorenz, D. Regan, *Transfusion*, **53**(12), 3251 – 3261 (2013).

Поступила 29.03.18

ISOLATION OF ANAEROBIC BACTERIA DURING QUALITY ANALYSIS OF MEDICINAL PRODUCTS

N. G. Sakhno, O. V. Gunar, M. V. Roshchina, L. V. Kolosova, and V. E. Grigor'eva

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

Important features of the isolation anaerobic microorganisms during quality analysis of medicinal products are considered, including determination of the limit of detection, frequency, and time to isolation of some anaerobic bacteria by direct inoculation to thioglycolate medium with the use of BacT/ALERT 3D automated system. It is shown that the use of thioglycolate medium in analysis of the sterility of pharmaceutical products makes it possible to isolate single cells of anaerobic microorganisms having various degrees of oxygen tolerance. The use of BacT/ALERT 3D automated system with a special medium allows the minimum number of cells in a sample to be reliably determined in a shorter time.

Keywords: medicinal products; anaerobic microorganisms; sterility testing.