

О. В. Гунар, Н. Г. Сахно

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ АНАЛИЗЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ОЦЕНКА ИХ ПРИМЕНИМОСТИ

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

Быстрая и правильная идентификация микроорганизмов является неотъемлемой частью фармацевтического анализа. В настоящее время для идентификации микроорганизмов используют ряд фенотипических, генотипических и протеотипических методов, каждый из которых имеет свои преимущества и ограничения. Целью настоящей работы было выявление особенностей и валидационная оценка анализатора бактериологического Vitek 2 Compact 30 (Biomerieux, Франция), работа которого основана на определении биохимических свойств микроорганизмов. Применимость указанного метода определяли по параметрам правильность, прецизионность и устойчивость. Из 396 анализов правильный результат был установлен в 86 % случаев. Результаты, полученные в условиях повторяемости и внутрिलाбораторной прецизионности, не отличались между собой в 100 % случаев. Кроме автоматической биохимической идентификации, в работе обсуждаются подходы к молекулярно-генетическому определению микроорганизмов, выделяемых из препаратов.

Ключевые слова: лекарственные средства; идентификация микроорганизмов.

Микроорганизмы-контаминанты, обнаруженные в готовых формах лекарственных средств (ЛС), вспомогательных веществах, воде, производственной среде, как правило, идентифицируют [1]. Согласно требованиям нормативной документации, характеристика микроорганизмов для целей фармацевтического анализа включает описание фенотипических признаков (культуральных, морфологических, физиологических, биохимических и ингибирующих), которые могут быть диагностированы.

Микробиологический анализ ЛС может включать идентификацию выделенных бактерий или грибов. При этом исследование не должно ограничиваться лишь отдельными видами микроорганизмов, отсутствие которых регламентировано требованиями фармакопеи. Необходимость и полнота идентификации всех выделенных контаминантов зависит от типа фармацевтического продукта, его назначения и способа применения. Полученная в ходе идентификации информация важна для установления источника контаминации.

В настоящее время для идентификации микроорганизмов используют ряд фенотипических, генотипических и протеотипических методов [2, 3]. Каждая технология имеет свои особенности и ограничения, а также может требовать дополнительных исследований и подготовительных работ. Каждый вид микроорганизмов характеризуется специфическим набором ферментов, поэтому определение ферментного спектра — важнейший этап идентификации микроорганизмов. О наличии того или иного фермента судят по способности микроорганизмов взаимодействовать с известными субстратами. Присутствие фермента регистрируют по изменению физического состояния субстрата, изменению pH питательной среды, образованию определенных продуктов метаболизма (индол, сероводород, аммиак) и т.д. Идентификацию микроорганизма осуществляют при сравнении установленного биохимического профиля с базой данных, вручную или с помощью автоматических при-

боров. В настоящее время на основе данного принципа разработано множество коммерческих наборов и анализаторов: API® и ID32, BBL™ Кристалл™; Biolog, Vitek 2 Compact; BD Phoenix™ и др.

Цель настоящей работы — выявление особенностей и валидационная оценка анализатора бактериологического Vitek 2 Compact 30 производства Biomerieux, Франция.

Экспериментальная часть

В настоящей работе были использованы различные тест-штаммы микроорганизмов, типичные по своим культуральным, морфологическим и тинкториальным свойствам, полученные из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection) в виде дисков: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Escherichia coli* ATCC 8739; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Salmonella enterica ssp. enteric ser.abony* IHE 103/39; *Bacillus cereus* ATCC 10702; *Clostridium sporogenes* ATCC 19404; *Candida albicans* ATCC 10231. Восстановление и работу с микроорганизмами проводили в соответствии с ГФ XIII изд., ОФС.1.2.4.0002.15 "Микробиологическая чистота".

В работе использовали 24-часовые культуры микроорганизмов, выращенные на соответствующей скошенной плотной питательной среде. Для культивирования бактерий использовали триптиказо-соевый агар, для дрожжевых грибов — агар Сабуру. Бактерии *C. sporogenes* ATCC 19404 выращивали на триптиказо-соевом агаре в анаэробных условиях.

В соответствии с инструкцией производителя анализатора Vitek 2 Compact готовили суспензии микроорганизмов определенной плотности по Мак-Фарланду (McF): для грамположительных и грамотрицательных бактерий ее значение составляло 0,5–0,63 McF, для бактерий рода *Bacillus spp.* и дрожжевых грибов —

1,8–2,2 McF, для анаэробных бактерий — 2,8–3,3 McF.

Готовые суспензии помещали в анализатор с соответствующей картой, представляющей собой пластину с 64 лунками, содержащими биохимические субстраты, подходящие для отдельной группы микроорганизмов. Идентификация микроорганизмов проводилась системой автоматически: ферментативные реакции, происшедшие в лунках, фиксировались системой, на основании полученных данных составлялся биохимический профиль микроорганизма, который сравнивался с имеющейся базой данной, которая для данного анализатора насчитывает свыше 450 таксонов. В среднем время идентификации составляло 4–24 ч в зависимости от тест-штамма.

Полученные результаты анализировали с целью оценки таких валидационных параметров, как прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная прецизионность), правильность и устойчивость.

Повторяемость считали доказанной, если результаты единичных определений при многократном исследовании одной и той же суспензии тест-штамма ($n \geq 6$) согласовывались между собой. Для оценки внутрилабораторной прецизионности суспензии одного и того же тест-штамма микроорганизма были приготовлены и проанализированы 2 микробиологами ($n \geq 5$).

Устойчивость системы определяли идентификацией различных серий одного и того же тест-штамма и выражали в виде стандартной ошибки доли (σ_p) с учетом биномиального распределения полученных данных.

При оценке правильности изучали способность системы определять отдельные микроорганизмы на требуемом таксономическом уровне. Результат выражали в виде отношения количества верных результатов к общему числу проведенных определений.

Результаты и их обсуждение

Результаты идентификации тест-штаммов представлены в табл. 1.

Из полученных данных видно, что из общего числа проведенных испытаний, которое составляет 396 определений, правильный результат идентификации получен в 86 % случаев, в 10 % случаев результат не получен, 4 % образцов были идентифицированы неверно.

В табл. 2 приведены сведения о неверно идентифицированных микроорганизмах.

К ошибкам, возникающим при идентификации микроорганизмов, относятся: неверное определение рода; ошибочное установление вида; отсутствие результата. Причинами этого могут быть отсутствие организма в базе данных анализатора, недостаточно широкие параметры системы, нетипичный профиль или отсутствие таксономического описания данного вида микроорганизма. Ошибку идентификации определить непросто, поэтому большое значение имеет сопоставление полученных результатов с данными о морфологии изолята, его физиологических потребностях, источнике его получения [4].

В результате изменений окружающей среды, генетических мутаций и др. некоторые микроорганизмы могут изменять свои фенотипические признаки [5]. Проявление таких характеристик как размер и форма клеток, спорообразование, клеточный состав, антигенность, биохимическая активность, чувствительность к противомикробным веществам и др. часто зависят от условий культивирования [6]. Так, например, в случае плесневых грибов питательная среда может оказывать влияние на цвет и морфологию колоний, образование определенных структур и др. [7]. Как отмечалось выше, микроорганизмы, выделенные из ЛС и производственной среды, находятся в состоянии физиологического стресса. Они могут переходить в некультивируемое состояние и не расти на стандартных питательных средах, используемых в фармацевтическом анализе [4, 6]. Кроме того, к факторам, оказывающим влияние на качество идентификации с помощью некоторых биохимических методов, можно отнести условия пробоподготовки и возраст культуры [8].

По данным литературы, правильность идентификации с помощью анализатора Vitek 2 Compact составляет от 42,5 до 94,0 %. Наименьший процент верных результатов был зафиксирован для бактерий *Bacillus cereus* [8–14].

Результаты, полученные в условиях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности, не отличались между собой. Во всех 100 % случаев системой были верно идентифицированы тест-штаммы из различных групп: грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *S. abony*); грамположительных бактерий (*S. aureus*); дрожжевых

Таблица 1

Правильность результатов идентификации тест-штаммов

Микроорганизм	Общее количество определений (n)	Количество результатов		Отсутствие результата
		правильных	ошибочных	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	50	44 (88 %)	2 (4 %)	4 (8 %)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	45	39 (87 %)	4 (9 %)	2 (4 %)
<i>E. coli</i> ATCC 8739	46	46 (100 %)	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	48	46 (96 %)	0	2 (4 %)
<i>S. enterica ssp. enterica ser. abony</i> ИНЕ 103/39	43	43 (100 %)	0	0
<i>B. cereus</i> ATCC 10702	48	22 (46 %)	2 (4 %)	24 (50 %)
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	54	14 (26 %) ¹ 28 (52 %) ²	6 (11 %)	6 (11 %)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	62	60 (97 %)	2 (3 %)	0

Верная идентификация: ¹ — до рода; ² — до вида.

грибов (*C. albicans*); анаэробных спорообразующих бактерий (*C. sporogenes*).

Устойчивость оценивали для нескольких серий ($n = 5$) дисков различных тест-штаммов. Результаты приведены в табл. 3.

Полученные экспериментальные результаты позволяют выделить наиболее трудные для идентификации группы микроорганизмов — бактерии родов *Bacillus* *ssp.* и *Clostridium* *ssp.*

Существуют некоторые виды микроорганизмов, определение которых как фенотипическими, так и генотипическими методами вызывает сложности.

В частности, *B. cereus*, *B. thuringensis* и *B. anthracis* настолько близки по своим свойствам, что большинство систем идентификации не позволяет различить их. Это ограничение изначально учтено при разработке базы данных анализатора Vitek 2 Compact. Система выдает результат в виде альтернативного ответа “*B. cereus/thuringiensis/mycoides*”. В настоящее время патогенность *B. cereus* и способность данного вида вызывать заболевания при применении контаминированных им фармацевтических продуктов могут потребовать совершенствования методов его идентификации [15]. Бактериологическое Руководство (ВАМ) FDA рекомендует ряд тестов для дифференциации *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis* и *B. megaterium* после культивирования на селективных и дифференциальных средах [16, 17]. Тем не менее результаты исследования атипичных штаммов *B. cereus* очень разнятся и для идентификации изолятов могут потребоваться дополнительные испытания. В данном случае генотипические методы более точны и прецизионны. Многообещающе выглядит метод, основанный на сравнении множественных генных локусов (в литературе Multiple-Locus Sequence Typing или MLST) совместно с филогенетическим анализом [15, 18, 19].

Некоторые близкородственные виды бактерий *Clostridium* *ssp.* могут быть дифференцированы с помощью высокоспецифических молекулярных маркеров или биохимических исследований. Например, *C. botulinum* обладает способностью продуцировать ботулинистические токсины 7 различных серотипов (от А до G). В зависимости от типов продуцируемых токсинов штаммы *C. botulinum* подразделяют на 4 группы, каждая из которых имеет нетоксигенные аналоги. Для группы I таким аналогом является вид *Clostridium sporogenes*, для группы III — *Clostridium novyi*. При этом в ряде случаев схожесть видов превышает 99 % [20].

Генотипические методы идентификации микроорганизмов, основанные на анализе нуклеиновых кислот, менее субъективны, в меньшей степени зависят от условий культивирования изолятов, и в большинстве своем более надежны. Однако эти методы технически более сложны, требуют дорогостоящего оборудования и расходных материалов [4, 21]. Тем не менее в некоторых случаях использование чувствительных молекулярно-генетических методов, подобных тем, которые применяются для эпидемиологических исследований, является обязательным. Например, повторное испытание стерильности ЛС проводится только в случае, если первоначальный анализ признан недействительным по причинам, не связанным с продуктом. Одним из условий

Европейской фармакопеи является доказательство того, что микроорганизм, выделенный из продукта, идентичен изоляту из материалов и/или лабораторной среды [22]. Очевидно, что, если испытания выполняются грамотно в требуемых условиях чистых помещений вероятность одновременной контаминации лабораторной среды, продукта, питательных сред, растворов и материалов ничтожно мала. Но в случае возникновения подобной ситуации проводить повторный анализ стерильности лишь на основании данных морфологической и биохимической идентификации микроорганизмов не допускается, т.к. образцы могут содержать множество микроорганизмов, которые трудно дифференцировать без использования чувствительных методов [23].

Применение методов амплификации нуклеиновых кислот в рутинной практике фармацевтического анализа ограничено из-за сложностей в их стандартизации и валидации. Многие из параметров, которые могут повлиять на результат анализа, с помощью ПЦР трудно контролировать, к ним относятся качество стандартных образцов, условия окружающей среды, оборудование, опыт оператора, условия проведения реакции и качество используемых материалов [5, 24]. Кроме того, решающим образом на результат определения может повлиять метод экстракции ДНК, и часто исследователю приходится искать компромисс между затратами, оптимальным выходом ДНК и чистотой получаемых образцов [25, 26].

Полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что использование бактериологических анализаторов обеспечивает получение результатов с приемлемым уровнем правильности, прецизионности и устойчивости. Автоматизация и стандартизация позволяют идентифицировать микроорганизмы-контаминанты ЛС и производственных помещений в максимально короткие сроки, и таким образом способствуют своевременному проведению корректирующих и предупреждающих действий.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ “НЦЭСМП” Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Таблица 2
Результаты идентификации тест-штаммов при их ошибочном определении

Идентифицируемый микроорганизм	Результат идентификации
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>Staphylococcus hominis ssp. hominis</i> , <i>M. luteus</i>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Serratia fonticola</i> , <i>Salmonella</i> group
<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	<i>Clostridium sordellii</i> , <i>C. cadaveris</i> , <i>C. bifermentans</i> , <i>C. difficile</i> , <i>C. glycolicum</i>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>Stephanoascus ciferrii</i> , <i>Trichosporon asahi</i>

Устойчивость результатов идентификации микроорганизмов

Микроорганизм	Доля правильных результатов идентификации					Стандартная ошибка, σ_p
	серия 1	серия 2	серия 3	серия 4	серия 5	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,61	1,00	0,88	1,00	1,00	0,13
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	1,00	1,00	1,00	0,75	0,70	0,14
<i>E. coli</i> ATCC 8739	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>S. enterica ssp. enterica ser. abony</i> IHE 103/39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>B. cereus</i> ATCC 10702	0,50	0,20	0,27	0,45	0,90	0,22
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	0,60	0,69	0,45	0,43	0,21	0,22
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	0,06

ЛИТЕРАТУРА

1. О. В. Гунар, Н. Г. Сахно, М. В. Рощина, В. Э. Григорьева и др., *Ведомости НЦЭСМП*, **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).
2. Р. А. Волкова, Е. С. Сколотнева, Е. В. Эльберт и др., *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*, **2**, 9 – 14 (2015); <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2015-2-9-14>; R. A. Volkova, E. S. Skolotneva, E. V. Elbert, et al., *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, **2**, 9 – 14 (2015); (In Russ.) <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2015-2-9-14>.
3. Д. С. Давыдов, М. П. Рудник, А. А. Мовсесянц и др., *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*, **4**, 52 – 58 (2015); <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2015-4-52-58>; D. S. Davydov, M. P. Rudnik, A. A. Movsesyants, et al., *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, **4**, 52 – 58 (2015); (In Russ.) <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2015-4-52-58>.
4. *The United State Pharmacopeia*, 40th ed., The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD (2017).
5. J. Hakovirta, *Modern techniques in detection, identification and quantification of bacteria and peptides from foods*, Helsinki (2008).
6. L. Li, N. Mendis, H. Trigui, et al., *Front. Microbiol.*, **5**, Article 258 (2014).
7. T. Sandle, *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control*, Woodhead Publishing, UK (2015).
8. G. Funke, D. Monnet, C. de Bernardis, et al., *J. Clin. Microbiol.*, **36**(7), 1948 – 1952 (1998).
9. S. Q. van Veen, E. C. Claas, E. J. Kuijper, *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 900 – 907 (2010).
10. P. C. Schreckenberger, K. L. Ristow, A. M. Krilcich, *Comparison of the Vitek legacy, Vitek 2 colorimetric and Phoenix systems for identification of fermenting and non-fermenting bacteria of clinical origin*, 105th General Meeting of the American Society for Microbiology, USA (2005).
11. U. Eigner, A. Schmid, U. Wild, D. Bertsch, et al., *J. Clin. Microbiol.*, **43**(8), 3829 – 3834 (2005).
12. L. Guo, L. Ye, Q. Zhao, et al., *J. Thoracic Disease*, **6**(5), 534 – 538 (2014).
13. C. M. O'Hara, F. C. Tenover, J. M. Miller, *J. Clinical Microbiol.*, **31**(12), 3165 – 3169 (1993).
14. J. A. Odumeru, M. Steele, L. Fruhner, et al., *J. Clin. Microbiol.*, **37**(4), 944 – 949 (1999).
15. S. Sutton, *Am. Pharm. Rev.*, **15**(6), 36 – 48 (2012).
16. *FDA. Bacteriological Analytical Manual (BAM)*, 8th ed., Revision A; URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>.
17. S. M. Tallent, K. M. Kotewicz, E. A. Strain, R. W. Bennett, *J. AOAC Int.*, **95**(2), 446 – 451 (2012).
18. N. J. Tourasse, O. A. Okstad, A. B. Kolsto, *Database (Oxford)* (2010), Article ID baq017; Doi:10.1093/database/baq017.
19. A. Sorokin, B. Candelon, K. Guilloux, et al., *Applied Environment. Microbiol.*, **72**(2), 1569 – 1578 (2006).
20. M. Sebahia, M. W. Peck, N. P. Minton, et al., *Genome Res.*, **17**(7), 1082 – 1092 (2007); DOI: 10.1101/gr.6282807.
21. S. Sutton, A. M. Cundell, *Pharmacopeial Forum*, **30**(5), 1884 – 1894 (2004).
22. *European Pharmacopeia*, 9th ed., Council of Europe, Strasbourg (2017).
23. *PI 0012-3. Recommendations on Sterility Testing*, Secretariat of the Pharmaceutical Inspection Convention, Belgium (2007).
24. B. Malorny, P. T. Tassios, P. Rådström, et al., *Int. J. Food Microbiol.*, **83**, 39 – 48 (2003).
25. L. Jimenes, S. Smalls, R. Ignar, *J. Microbiol. Methods*, **41**(3), 259 – 265 (2000).
26. K. Cankar, D. Štebih, T. Dreo, J. Žel, et al., *BMC Biotechnol.*, **6**(37), doi:10.1186/1472-6750-6-37 (2006).

Поступила 09.10.18

METHODS OF MICROBIAL IDENTIFICATION DURING DRUG QUALITY ANALYSIS: ASSESSMENT OF APPLICABILITY

O. V. Gunar* and N. G. Sakhno

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

* e-mail: gunarov@inbox.ru

Rapid and correct identification of microorganisms is an essential part of pharmaceutical analysis. Nowadays, microorganisms are identified using a number of phenotypic, genotypic and proteotypic methods, each one possessing particular advantages and limitations. The present work was aimed to reveal important features and validate operation of the commercial bacteriological analyzer Vitek 2 Compact 30 (Biomérieux, France), in which the identification of microorganisms is based on the determination of their biochemical properties. The accuracy, precision and robustness of analysis were assessed. Correct results were obtained in 86% of 396 determinations. There were no differences in data obtained under conditions of repeatability and intermediate precision. In addition to using automatic biochemical identification techniques, the molecular-genetic approach to the identification of microorganisms isolated from preparations is discussed.

Keywords: pharmaceutical products; microbial identification.