

АНТИСЕПТИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ И АНАЛИЗ ИХ КАЧЕСТВА ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

О.В. Гунар, Н.Г. Сахно

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва
nadine87@inbox.ru

Резюме: В статье приведены требования к качеству антисептических лекарственных средств по микробиологическим показателям, приведены методы контроля, в том числе способы определения бактерицидности. Отмечены особенности проведения анализа. Выявлено, что существующие методики не всегда подходят для контроля микробиологического качества антисептических лекарственных средств. Показана необходимость проведения оценки, оптимизации, модификации указанных методик анализа с учетом антимикробного действия этой группы лекарственных средств, а также валидации выбранного альтернативного метода.

Ключевые слова: антисептические лекарственные средства; контроль качества; бактерицидность; микробиологическая чистота

ANTISEPTICS AND THEIR MICROBIOLOGICAL QUALITY ASSESSMENT

O.V. Gunar, N.G. Sakhno

Abstract: The article introduces microbiological quality requirements for antiseptics as well as control methods, including methods for determining bactericidal activity. It was detected that the existing methods are not always suitable for antiseptics microbiological quality control. The necessity of performing assessment, optimization, modification of the mentioned analytical methods with consideration for antimicrobial activity of antiseptics as well as validation of an appropriate alternative method.

Key words: antiseptics; quality control; bactericidal activity; microbiological purity.

В последнее десятилетие на российском фармацевтическом рынке расширился ассортимент дезинфицирующих и антисептических лекарственных средств (АЛС).

АЛС могут использоваться для обеззараживания кожных покровов и полостей, слизистых оболочек, инфицированных и неинфицированных ран, в то время как дезинфектанты применяют для обработки окружающих поверхностей, предметов и выделений больного. Таким образом, АЛС – это часть достаточно обширной группы препаратов, направленных на уничтожение или снижение количества микроорганизмов.

Разделение рассматриваемой группы лекарственных средств (ЛС) на антисептические и дезинфицирующие средства достаточно условно, так как одни и те же средства в зависимости от концентрации могут быть использованы как в качестве антисептического средства, так и в виде дезинфицирующего. Например, хлорамин Б в качестве антисептика для обработки рук

используют в виде 0,25 – 0,5% раствора, а в качестве дезинфектанта для обеззараживания предметов ухода за больными – в виде 2 – 3% раствора.

Сравнение терминов и определений, относящихся к антисептическим и дезинфицирующим средствам, представлено в таблице 1.

Список веществ, применяемых в качестве антисептиков и дезинфектантов, с каждым годом пополняется новыми препаратами, в то время как многие из них сохраняют свои позиции уже в течение длительного времени. Лечебные свойства таких препаратов, как повидон-йод, водорода пероксид, калия перманганат, этанол, хлоргексидин и т.д. доказаны настолько, что препараты признаны жизненно необходимыми и включены в соответствующий нормативный документ – Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) на 2012 год, утв. Распоряжением Правительства РФ от 7 декабря 2011 г. N 2199-р.

Таблица 1. Сравнение определений антисептических и дезинфицирующих ЛС

| Документация | Антисептик | Дезинфектант |
|---|--|---|
| USP35-NF30 <1072>, 2012 г [1] | Препарат, замедляющий рост или уничтожающий микроорганизмы, применяемый к живым тканям, включая кожу, ротовую полость и открытые раны | Химический или физический агент, разрушающий или удаляющий вегетативные формы патогенных микроорганизмов, применяемый на различных поверхностях |
| EPA (Environmental Protection Agency) (1999) [1. The United State Pharmacopeia: XXXV rev. (USP35-NF30) // Rockville. – 2012. 2] | Вещество, которое препятствует сепсису, гниению путем предотвращения или задержки роста микроорганизмов. АЛС наносятся на тело человека или животных | Вещество, уничтожающее отдельные виды патогенных или других нежелательных микроорганизмов, за исключением их спор, только в неживых объектах |

Включение препарата в Перечень ЖНВЛП и его использование потребителями определяется такими параметрами, как эффективность, безопасность и качество. Контроль качества лекарственных средств (ЛС) проводится по физико-химическим и биологическим показателям, среди которых важнейшими критериями безопасности являются «Стерильность» или «Микробиологическая чистота».

Исследование качества АЛС по микробиологическим показателям вызывает определенные трудности. Это связано с тем, что АЛС в условиях определения их микробиологической чистоты обладают антимикробным действием, которое не всегда удается устранить методами, описанными в норматив-

ной документации. В то же время нельзя отказаться от контроля качества АЛС без научных доказательств целесообразности проведения анализа, так как существуют данные о микробной контаминации различными бактериями и грибами некоторых антисептиков, включая хлоргексидин, спирт этиловый. К настоящему времени имеются данные о выделении различных клинически значимых бактерий и грибов из многих используемых в медицине антисептиков и дезинфектантов. Как правило, риску подвержены вещества, обладающие невысокой антимикробной активностью. К ним относятся четвертичные аммониевые соединения, некоторые йодофоры, фенолсодержащие препараты, хлоргексидин. В ходе исследований каче-

Таблица 2. Сравнение допустимых пределов содержания микроорганизмов в ЛС, установленных в ГФ РФ XII изд., ч. 1 и зарубежными фармакопеями

| Категории ЛП, способы применения | Нормы | Способы применения ЛП ЕФ 7.0, USP34-NF29 | Нормы |
|---|---|--|---|
| Категория 2 – для применения местно, наружно, интравагинально; – для введения в полости уха, носа; – респираторно; – трансдермальные пластыри; <i>За исключением ЛП, которые должны быть стерильными</i> | в 1г или 1мл (или на 1 пластырь, включая клейкую сторону и основу): – ОЧБ и ОЧГ не более 10^2 – отсутствие: <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> – не более 10 энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий; – отсутствие энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий на 1 пластырь | – местно, на кожу, слизистую, на десны, в полости носа и уха – трансдермальные пластыри | в 1г или в 1 мл (или на 1 пластырь): – ОЧБ 10^2 КОЕ – ОЧГ 10^1 КОЕ – отсутствие <i>S. aureus</i> и <i>P. aeruginosa</i> |
| | | – интравагинально | в 1г: – ОЧБ 10^2 КОЕ – ОЧГ 10^1 КОЕ – отсутствие <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i> |
| Категория 3 А для приема внутрь или введения ректально | в 1г или в 1 мл: – ОЧБ не более 10^3 – ОЧГ не более 10^2 – отсутствие <i>E. coli</i> | – твердые препараты для приема внутрь | в 1г: – ОЧБ 10^3 КОЕ – ОЧГ 10^2 КОЕ – отсутствие <i>E. coli</i> |
| | | – растворы для приема внутрь | в 1г: – ОЧБ 10^2 КОЕ – ОЧГ 10^1 КОЕ – отсутствие <i>E. coli</i> |
| Категория 3 Б – для приема внутрь – из сырья природного происхождения, уровень микробной загрязненности которого невозможно снизить в процессе предварительной обработки и для которого федеральный орган контроля качества ЛС допускает более 10^3 жизнеспособных микроорганизмов в 1г (мл) <i>Исключение: лекарственные растительные средства, включенные в категорию 4</i> | в 1г или 1мл: – ОЧБ не более 10^4 – ОЧГ не более 10^2 – энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий не более 10^2 – отсутствие <i>E. coli</i> и <i>S. aureus</i> в 10 г или в 10 мл: – отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> | – препараты для приема внутрь из природного сырья | в 1г или 1мл: – ОЧБ 10^4 КОЕ – ОЧГ 10^2 КОЕ – не более 102 грамотрицательных устойчивых к желчи бактерий; – отсутствие <i>E. coli</i> и <i>S. aureus</i> в 10 г или в 10 мл: – отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> |
| Категория 1.2 Б – для стерильных ЛП, которые подвергаются стерилизации – для нестерильных ЛП, относящихся к категории 2 | в 1г или 1мл: – ОЧБ и ОЧГ не более 10^2 – отсутствие энтеробактерий, <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> | Субстанции для фармацевтического использования | в 1г или 1мл: – ОЧБ 10^3 КОЕ – ОЧГ 10^2 КОЕ |

Примечание. ОЧБ – Общее число бактерий, ОЧГ – Общее число грибов

ства препарата раствора хлоргексидина биглюконата 0,05%, проведенных различными авторами, выявлена микробная контаминация от 3,3% до 54% образцов. Основными контаминантами являлись *Burkholderia ceparia*, а также бактерии *Pseudomonas spp.* [3, 4]. В последнее десятилетие в литературе встречаются публикации, посвященные микробной контаминации антисептиков и дезинфектантов, используемых в лечебных учреждениях [3, 5, 6]. В настоящее время является актуальным изучение, анализ и стандартизация требований и методик контроля качества по микробиологическим показателям различных АЛС, поступающих на фармацевтическую лабораторную экспертизу.

В связи с указанием о введении на территории России правил GMP [7], наблюдается стремление к гармонизации отечественной и зарубежной документации. Попыткой гармонизации с Европейской Фармакопеей 5-го изд. [8] являются разделы «Стерильность» и «Микробиологическая чистота» ГФ РФ XII изд., ч.1 [9], причем в отечественной фармакопее, в отличие, например, от Государственной Фармакопии Беларуси, сохранены национальные особенности. На сегодняшний день понятно, что из-за ряда объективных причин полной гармонизации с Европейской Фармакопеей (ЕФ 7 изд.) [10] в России пока не достигнуто. При сравнении ОФС 42-0067-07, включенной в ГФ XII изд., ч. 1, и 2.6.12, 2.6.13 ЕФ 7-го изд., имеются некоторые различия, касающиеся, в том числе, нормирования и методов контроля АЛС. Рассматриваемые препараты существуют в различных лекарственных формах и по способу применения и природе исходного сырья могут быть отнесены к различным категориям (в соответствии с классификацией ГФ РФ XII изд., ч.1). В большинстве случаев АЛС в виде растворов, мазей, гелей, карандашей, трансдермальных пластырей, антисептических повязок, порошков присваивается категория 2: препараты бриллиантового зеленого, йода, хлоргексидина, настойки прополиса, календулы и т.д. Существует большое количество таблеток для рассасывания, пастилок, широко используемых для лечения ЛОР-заболеваний, которые относят к категории 3А: аджисепт, фарингосепт, анти-ангин и пр. Встречаются растительные АЛС, которые отнесены к категории 3Б, исходя не из способа применения, а из используемого исходного сырья природного происхождения, например, ротокан. Ряд антисептиков (например, повидон-йод) изготавливается в виде вагинальных суппозиториев.

В таблице 2 представлено сравнение требований отечественной и ведущих зарубежных фармакопей к качеству по микробиологическим показателям антисептических препаратов и фармацевтических субстанций в зависимости от категории.

Представленные в таблице 2 данные указывают на ряд различий между отечественной фармакопеей и зарубежными. В частности, можно отметить, что в

зарубежных фармакопеех отсутствует цифровая классификация категорий препаратов при нормировании допустимых пределов содержания микроорганизмов. Есть различия в нормировании бактерий и грибов для растворов, используемых для приема внутрь, а также содержатся требования по отсутствию *C.albicans* в препаратах для интравагинального применения.

При теоретическом и экспериментальном сравнении методов микробиологического анализа становится ясно, что в ЕФ 7-го изд. наблюдается тенденция к обобщенному описанию действий персонала при испытании качества ЛС в целом, и АЛС, в частности. Отсутствует детализация в алгоритмах выделения патогенных бактерий, упрощены схемы идентификации (особенно бактерий рода *Salmonella*), уменьшено количество наименований рекомендуемых питательных сред. Такое представление материала рассчитано, с одной стороны, на опытных микробиологов, с другой стороны, на необходимость детализации методов в стандартных процедурах (СОПах) и инструкциях конкретных производителей и контролеров фармацевтической продукции.

Анализируя подходы к микробиологическим методам анализа качества ЛС, предъявляемые отечественной и Европейской фармакопеей, можно заключить, что в целом наблюдается единый подход к процедурам выделения микроорганизмов из ЛС (в том числе из АЛС). С учетом выявленных различий разработан проект ОФС «Микробиологическая чистота», который подан на рассмотрение и утверждение в установленном порядке.

Другим аспектом проблемы качества АЛС является вопрос, касающийся воздействия препарата на различные микроорганизмы. Антисептическое или дезинфицирующее средство является таковым, если оказывает «-статическое» действие на рост микроорганизмов, но при этом может как влиять, так и не влиять на микробную жизнеспособность. Напротив, «-цидный» эффект заключается в существенном уменьшении числа живых микроорганизмов [1, 2].

Для определения бактерицидной, фунгицидной и спороцидной активностей препаратов разработаны различные тесты: тесты с носителем, суспензионные тесты, тесты возможностей, практические тесты, отраслевые тесты (или тесты *in-use*).

В Американской фармакопее (USP) официальными методами определения эффективности дезинфектантов являются методы, принятые Ассоциацией официальных аналитических химиков (*Association of Official Analytical Chemists, AOAC*): суспензионные тесты (включая тесты для определения фенольного коэффициента), тесты с носителем (включая тесты используемого разведения дезинфектанта), а также тесты для определения спороцидности [11].

В Европе разработан единый систематический подход к оценке эффективности антисептиков и де-

зинфектантов. Начало европейской стандартизации было положено в 1989 г. при создании «Европейского общества стандартизации» (CEN), получившего название «Химические дезинфектанты и антисептики». Это общество на сегодняшний день ответственно за стандартизацию терминологии, требований, методик испытания, включая потенциальную эффективность использования в стандартных условиях, рекомендации по использованию и маркировке во всех областях, где используются химические антисептики и дезинфектанты. CEN была проведена категоризация тестов оценки эффективности антимикробных препаратов. Все тесты были разделены на несколько категорий:

- основные тесты (фаза 1) – предоставляют информацию только об основной активности препарата;
- тесты фазы 2 – определение активности веществ в лабораторных условиях, приближенных к предполагаемому применению теста, выбираются в соответствии с областью применения;
- тесты фазы 3 являются полевыми тестами, нацеленными на получение данных об эффективности средства в практических условиях за пределами лаборатории, в «реальном мире».

Тесты с носителем являются самыми первыми методами оценки эффективности антимикробных препаратов и были описаны еще Робертом Кохом в 1881 г. В роли носителей в таких тестах могут выступать кусочки ткани (т.н. батистовый метод), яичная скорлупа, шелковая нить или кетгут, металлические носители [11, 13]. В некоторых случаях носителем является рука человека [14]. Методика заключается в следующем: носитель контаминируется взвесью тест-микробного организма, высушивается, после чего приводится во взаимодействие с антисептиком или дезинфектантом и после определенного времени экспозиции помещается в питательную среду. Ограничением данного типа тестов является сложность стандартизации числа бактериальных клеток, оставшихся на носителе после контаминации.

При выполнении суспензионных тестов инокулят вносят в раствор дезинфектанта, и, после определенного времени экспозиции, методом посева на питательную среду определяют «-цидное» действие препарата. Различают: качественный тест и количественные тесты.

При выполнении качественного теста после необходимой экспозиции образец в количестве 0,1 мл добавляют в жидкую питательную среду. Наличие помутнения среды после инкубации свидетельствует о неэффективности дезинфицирующего средства. Основным недостатком данного метода является тот факт, что выжившая единичная бактериальная клетка после инкубации даёт такой же результат, как и исходная бактериальная суспензия, которая не подвергалась воздействию дезинфицирующего средства. Результаты являются репрезентативными в случае, если происходит полная гибель микроорганизмов при соответствующем

разведении и времени экспозиции.

Отличие количественного суспензионного теста заключается в том, что после экспозиции бактериальной суспензии с раствором антисептика и дезинфектанта, осуществляется подсчет выживших микроорганизмов, одним из двух способов: прямым посевом на питательную среду или мембранной фильтрацией. Основной принцип количественного суспензионного теста с использованием прямого посева на питательную среду заключается в следующем: образец реакционной смеси после контакта с антисептиком высевают на твердые питательные среды, после инкубации подсчитывают количество выросших колоний и сравнивают с положительным контролем. В положительном контроле в качестве разбавителя используют стерильную дистиллированную воду вместо дезинфектанта. Микробицидный эффект (ME) высчитывается по формуле:

$$ME = \log N_c - \log N_o,$$

где, N_c – количество колоний в положительном контроле,

N_o – количество колоний в исследуемом образце.

Метод мембранной фильтрации применяется в случае, если не удастся найти эффективный нейтрализатор антимикробного действия. Преимуществом является тот факт, что нет необходимости использовать нейтрализатор, эффект нейтрализации достигается за счет использования большого количества промывной жидкости.

Несмотря на то, что эти тесты достаточно хорошо стандартизованы, они не нашли широкого применения в качестве методов оценки бактерицидности, фунгицидности и спороцидности антисептиков и дезинфектантов.

К суспензионным тестам можно отнести тесты для определения фенольного коэффициента дезинфектантов. Фенольный коэффициент – это величина, характеризующая отношение разведения исследуемого дезинфектанта, убивающего данную бактериальную суспензию в течение определенного времени, к разведению фенола, уничтожающего такую же бактериальную нагрузку за то же время. Используют для сравнительной оценки новых дезинфектантов фенольного ряда, реже – дезинфектантов других классов. Метод существует в двух модификациях: метод Риделя-Уолкера и метод Шика-Мартина.

Для контроля эффективности многократного использования дезинфектантов существует тест возможностей (тест Келси-Сайкса). Для оценки взаимодействия дезинфектанта и обрабатываемых поверхностей применяют практические тесты. Данные тесты относятся к тестам с носителем. Для определения контаминации дезинфектантов используют in-use тесты [1, 2, 11].

Несмотря на существующее разнообразие утвержденных методик определения «-цидности» антисепти-

ков и дезинфектантов, применяемые методы трудоемки, требуют большого объема питательных сред и временных затрат. С целью сокращения временных и трудозатрат разработан ряд альтернативных методик, например, методика Гудковой Е.И. и Красильникова А.П. (контаминация, экспозиция и нейтрализация производятся в репликаторе) [15]. Известны способы, основанные на применении питательной среды с рН-индикатором, изменяющим цвет в результате метаболизма размножающихся бактерий. Учет результатов испытания проводят путем регистрации изменения цвета питательной среды после термостатирования смесей раствора дезинфектанта и взвеси бактерий, а также на учете мутности в лунках, куда вносят препарат и бактериальную взвесь. Однако, данная методика применима далеко не всегда, и для каждого конкретного ЛС следует учитывать ограничения, касающиеся рН, концентраций ЛС, особенностей микроорганизмов [16, 17].

Существуют различные модификации метода диффузии в агар для оценки активности антибиотиков. Один из них основан на использовании цилиндров для создания временного микрорезервуара на поверхности плотной питательной среды, куда вносят раствор антисептика или дезинфектанта и инокулят, а после экспозиции, удаления части жидкости и инактивации цилиндры удаляют и распределяют оставшуюся смесь по поверхности агара. Эффективность оценивают по коэффициенту редукции [18]. В.А. Бондарев и др. из-

меряли антибактериальную активность дезинфектантов путем применения бумажных дисков, пропитанных препаратом [19].

Вышеуказанные альтернативные методики не всегда позволяют получить данные о бактерицидности препаратов и зачастую являются качественными тестами. В этой связи представляет интерес методика определения бактерицидности дезинфектантов, предложенная Аржаковым В.Н., Ермаковичем М.М., Аржаковым П.В. [20], в соответствии с которой препарат вносят в лунки, вырезанные в толще агара. Исследуемую культуру, выращенную в агаре, в зависимости от вида микроорганизма вносили в определенном объеме в расплавленную среду для испытания. К бактерицидным препаратам отнесены те, у которых зона угнетения роста испытываемых культур была диаметром 20 мм вместе с лункой (5 мм от края лунки).

Разработанные методики находят широкое применение в медицинских учреждениях, ветеринарных клиниках и т.п. Они служат для определения эффективности дезинфектантов или устойчивости микроорганизмов и не всегда подходят для контроля качества АЛС. Чтобы иметь возможность применять разработанные методики при определении бактерицидности антисептиков необходимо провести оценку, оптимизацию, модификацию указанных способов, а также валидацию выбранного метода, что планируется провести в лаборатории микробиологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

ЛИТЕРАТУРА

1. The United State Pharmacopeia: XXXV rev. (USP35-NF30) // Rockville. – 2012.
2. Disinfection, sterilization and preservation/ Editor Seymour S. Block – 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, PA, USA. 2001
3. Tswana Gajadhar, Alicia Lara, Patricia Sealy, Abiodun A. Adesiyun // Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health. – 2003. – Vol.14. №3. – P.193-200
4. Yeom J.S., Lim H.S., Park H.S. // Korean J nosocomial infect. control. – 2003. – Vol. 8. №1. – P.5-11
5. Гудкова Е. И., Красильников А. П. // Лабораторное дело. – 1991. – №1. – С. 59–61
6. Oie S., Kamiya A. // Am. J. Infect. Control. – 1996. – Vol.24. №5. – P. 389-395
7. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»
8. European Pharmacopoeia. – 5th ed. – Strasburg. – 2005.
9. Государственная фармакопея РФ. – 12-е изд. – Часть 1. – М.: Медицина. – 2007.
10. European Pharmacopoeia. – 7th ed. – Strasburg. – 2011.
11. AOAC: Official methods of analysis. 15th ed. – Association of Official Analytical Chemists. – Arlington. – 1990.
12. Козак С.С. Отчет о лабораторных исследованиях моюще-дезинфицирующего средства «Сокрена» фирмы «Боде Хеми ГмБХ и Ко», Германия. – Москва. – 2004
13. Jose E. Martinez. // Pharmaceutical technology. – 2006. – №2
14. Gunter Kampf. // Journal of Hospital Infection. – 2008. – Vol.70(S1). – P.27-34
15. Гудкова Е.И., Красильников А.П. // Клиническая лабораторная диагностика. – 1994. – №6. – С.48-50
16. Леви М.И., Сучков Ю.Г. // Дезинфекционное дело. – 1999. – №3. – С.30-33
17. Пат. 2409679 Российская Федерация, МПК С12Q1/04, А61L2/16. Способ определения устойчивости бактерий к дезинфектантам / Гудкова Е.И., Скороход Г.А., Адарченко А.А. и др., патентообладатель Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» - №2009114628/10, заявл. 17.04.2009, опубл.20.01.2011
18. Пат. 2191829 Российская Федерация, МПК С12Q1/00, А61L2/16. Способ оценки эффективности дезинфектантов и антисептиков / Афиногенов Г.Е., Краснова М.В., Доморад А.А., патентообладатель Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р.Вредена - №2000117652/13, заявл. 04.07.2000, опубл.27.10.2002
19. Бондарев В.А., Алтайская Г.Б., Горбунова З.А. // Дезинфекционное дело. – 1999. – №2. – С.4-5
20. Аржаков В.Н., Ермакович М.М., Аржаков П.В. Оценка резистентности микроорганизмов к дезинфицирующим препаратам // <http://home.sinn.ru/~orgsintez/sulf-virus-rezist.shtml>