

На правах рукописи

Сахно Надежда Геннадьевна

**ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ
СТАНДАРТИЗАЦИИ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА НЕКОТОРЫХ
АНТИСЕПТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Научный руководитель:

Доктор фармацевтических наук,

ГУНАР Ольга Викторовна

Официальные оппоненты:

КОЧЕРОВЕЦ Владимир Иванович, профессор, доктор медицинских наук (03.00.07), профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России

ЗИЛФИКАРОВ Ифрат Назимович, доктор фармацевтических наук (15.00.02), начальник лаборатории отдела контроля качества фармацевтической компании ЗАО «ВИФИТЕХ»

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения России (ГБОУ ВПО «ПГФА» Минздрава России)

Защита состоится «__» _____ 2013 г в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 006.070.01 при Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВИЛАР Россельхозакадемии) (117216, Москва, ул. Грина, 7) по адресу: 123056, г. Москва, ул. Красина, д.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВИЛАР Россельхозакадемии по адресу: 117216, Москва, ул. Грина, 7.

Автореферат разослан «__» _____ 2013 г

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 006.070.01,
доктор фармацевтических наук

Громакова А.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Среди препаратов для наружного и местного применения выделяют антисептические лекарственные средства (АЛС). В целом, АЛС – это антимикробные лекарственные вещества для местного (наружного) применения при инфекционно-воспалительных заболеваниях слизистых оболочек, кожи, мягких тканей, полостей организма ([Химическая энциклопедия, 1988](#)). Способ применения АЛС зависит от локализации поражения, вида микроорганизма-возбудителя заболевания и т.д. Ассортимент антисептических препаратов, зарегистрированных на российском фармацевтическом рынке, постоянно пополняется новыми наименованиями и лекарственными формами ([Государственный реестр лекарственных средств, 2012](#)). Некоторые из АЛС включены в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств (ЖНВЛС).

Основными показателями качества и безопасности АЛС являются подлинность, количественное содержание действующего вещества, содержание посторонних примесей, микробиологическая чистота, а в ряде случаев – стерильность и антибактериальная активность ([Государственная Фармакопея XII изд., 2007](#)).

Отличительной особенностью антисептических препаратов является антимикробная активность, которая и обуславливает их применение. Однако с этим сопряжены и трудности, возникающие при анализе качества таких препаратов по микробиологическим показателям. Антимикробное действие некоторых АЛС невозможно устранить в условиях испытания по микробиологическим показателям методами, указанными в ГФ XII изд. В связи с этим встает вопрос для каждого конкретного лекарственного средства о необходимости включения соответствующих разделов в нормативную документацию, целесообразности испытания качества по данным показателям и достоверности получаемых результатов.

К настоящему времени имеются данные о выделении различных клинически значимых микроорганизмов из антисептических препаратов и

дезинфектантов, используемых в медицинской практике (Oie S. et al., 1996; Tswana Gajadhar, 2003; Yeom J.S., 2003; Салманов А.Г. и др., 2011). Известны случаи заболеваний новорожденных детей, вызванных использованием растворов хлоргексидина, контаминированных бактериями рода *Chryseobacterium* (Mehmet Ceyhan et al., 2011). Вероятно, контаминация АЛС в процессе производства и применения может быть обусловлена резистентностью микроорганизмов к определенным средствам. Как правило, риску подвержены препараты, обладающие невысокой антимикробной активностью. К ним относятся четвертичные аммониевые соединения, некоторые йодофоры, фенолсодержащие препараты, хлоргексидин (Салманов А.Г. и др., 2011).

Среди АЛС особое место занимают препараты интравагинального применения для лечения и профилактики различных инфекционно-воспалительных заболеваний женской мочеполовой сферы: бактериального вагиноза, аэробного вагинита и кандидозного вульвовагинита. Так, например, вульвовагинальный кандидоз традиционно занимает одно из ведущих мест в акушерско-гинекологической практике. Возбудителями кандидоза человека являются дрожжеподобные грибы рода *Candida*, насчитывающего около 190 видов. По данным международных исследований (Pfaller M.A. etc., 2010), проводимых в 41 стране на протяжении 10 лет, 63% случаев возникновения вульвовагинального кандидоза вызваны *C.albicans*. Присутствие *C.albicans* в составе микрофлоры влагалища является достаточно распространенным, и любое нарушение местного или общего иммунитета может спровоцировать развитие заболевания, вызванного данным видом микроорганизмов. Наряду с этим, возможно и экзогенное инфицирование (Маянский А.Н. и др., 2003). Очевидно, что присутствие данного вида микроорганизмов в интравагинальных препаратах недопустимо. Однако в современной отечественной нормативной документации такое требование отсутствует.

В настоящее время в нормативной документации на отдельные АЛС наблюдается отсутствие стандартности требований и методик контроля

качества по микробиологическим показателям. При этом в большинстве случаев описание соответствующего раздела носит общий характер, что затрудняет проведение анализа.

Целью настоящего исследования является определение и стандартизация требований и методов, оптимизация проведения анализа качества АЛС по микробиологическим показателям.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ действующей нормативной документации, регламентирующей требования к качеству АЛС в различных формах выпуска и методы их контроля по микробиологическим показателям.
2. Разработать рабочий алгоритм (практическую схему) контроля качества различных форм выпуска АЛС по показателю «Микробиологическая чистота» и определить методические особенности этих испытаний.
3. Установить видовой состав микроорганизмов-контаминантов АЛС и охарактеризовать их биологические особенности.
4. Предложить целевой метод обнаружения *Candida albicans* в лекарственных средствах и оценить его эффективность в процессе практической работы.

Научная новизна.

На основании углубленного сравнительного информационно-аналитического исследования установлены характеристики АЛС, которые были положены в основу рабочей классификации, способствовавшей гармонизации исследований.

Впервые определены теоретические, экспериментальные и методические основы всесторонней оценки качества АЛС по показателю «Микробиологическая чистота». Предложенный подход представляет собой оптимальное сочетание методов и условий проведения испытания, обеспечивающего диагностическую информативность результатов.

Впервые в отечественной практике определены доминирующие микроорганизмы-контаминанты АЛС на стадии предрегистрационной

экспертизы качества. Установлен факт сохранения жизнеспособности выделенных микроорганизмов и их видовой спектр (*Enterobacter cloacae*, *Chriseobacterium (Elizabethkingia) meningosepticum*, *Chriseobacterium indologenes*).

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработан алгоритм испытания качества АЛС по показателю «Микробиологическая чистота», основанный на комплексном изучении свойств образца: антимикробного (бактериостатического и фунгистатического) действия и способов его устранения, бактерицидности, фунгицидности, спороцидности препарата.

Проведены модификация и валидация метода диффузии в агар для определения бактерицидности ряда АЛС в рамках предложенного алгоритма.

Результаты проведенных исследований в виде усовершенствованной методики выделения бактерий рода *Salmonella* из лекарственных средств природного происхождения и разработанной методики выделения и идентификации *C.albicans* из интравагинальных препаратов включены в проект ОФС «Микробиологическая чистота».

Материалы диссертации внедрены и используются на фармацевтических предприятиях: ООО «Инфамед» (акт о внедрении исх. №11/1 от 01.04.2013), ООО «Вифитех» (акт о внедрении исх. №36-О от 05.04.2013).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в Испытательном центре экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в рамках комплексной темы «Научное обоснование методических подходов к экспертной оценке фармакопейных показателей и методов контроля качества лекарственных средств» (регистрационный номер 01201275290).

Апробация работы. Результаты и основные положения работы доложены на первой научно-практической конференции молодых ученых ФГБУ «НЦЭСМП» «Медико-социальные аспекты проведения экспертизы

качества, безопасности и эффективности лекарственных средств в условиях реформирования здравоохранения России» (г. Москва, 2012 г); тематических семинарах ФГБУ «НЦЭСМП» «Перспективы развития микробиологических методов анализа качества лекарственных средств в условиях GMP. Валидация/аттестация микробиологических методик» (г. Москва, март 2011 г, октябрь 2011 г, март 2012 г, октябрь 2012 г); всероссийской научной конференции с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2011 г); заседаниях секции медицинской и фармацевтической микробиологии московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (г. Москва, 2011 г, 2012 г); международной виртуальной интернет-конференции "Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы" (г. Казань, 2012 г); XVII, XVIII, XIX конгрессах «Человек и лекарство» (г. Москва, 2010 г, 2011 г, 2012 г); 67-ой региональной конференции «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (г. Пятигорск, 2012 г); IV Всероссийский научно-практический семинар молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск лекарственных средств» (г. Волгоград, 2012 г).

Положения, выносимые на защиту.

1. Фармакопейный показатель «Микробиологическая чистота» – основная характеристика безопасности и качества АЛС.
2. Предложенный алгоритм, схему исследования и методы контроля качества АЛС по показателю «Микробиологическая чистота» целесообразно использовать как на стадии экспертизы качества, так и при разработке нормативной документации на данную категорию препаратов.
3. Адаптированный и валидированный метод диффузии в агар позволяет *in vitro* установить бактерицидность препаратов хлоргексидина, йода, бриллиантового зеленого.
4. Предложенный диагностический комплекс микологических

методов выделения и идентификации позволяет достоверно выявить *C.albicans* как контаминант АЛС.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в постановке задач, выборе объектов изучения, теоретических изысканиях, проведении экспериментальных исследований, обобщении полученных данных и обсуждении результатов в научных публикациях. Автором разработан алгоритм испытания качества АЛС, изучена их микробиологическая чистота, модифицирован метод диффузии в агар для определения бактерицидности АЛС и проведена его валидация. Произведена статистическая обработка результатов (на основании соответствующей нормативной документации с помощью статистических программ Excel 7.0, Statistica 6.0). Общий вклад в работу составляет 90%.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 2 и 3 паспорта специальности.

Публикации. Основное содержание работы представлено в 19 публикациях, среди них 5 статей в изданиях, рецензируемых ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 28 таблиц, 19 рисунков, включает введение, обзор литературы (глава 1), результаты собственных исследований (главы 2-5), обсуждение результатов (глава 6), выводы, список литературы, содержащий 139 библиографических источников, в том числе 72 иностранных, и приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследования проведены с использованием 48 наименований отечественных и зарубежных лекарственных средств (галогены и галогенсодержащие соединения – 20; окислители – 3; кислоты и щелочи – 2; спирты – 4; соли тяжелых металлов – 5; красители – 5; препараты природного

происхождения – 5; другие лекарственные препараты – 4); 14 тест-штаммов и микроорганизмов, выделенных из лекарственных средств; питательных сред (отечественного и зарубежного производства, сухих, приготовленных в лаборатории, а также готовых к использованию).

В работе применяли стандартный образец мутности (the international reference preparation of opacity of 10 international units, Лондон, Великобритания), камеру Горяева, микроскоп Olympus CX-41, оснащенный видеокамерой с программой ВидеоТесТ – размер 5,0.

Исследование АЛС по показателю «Микробиологическая чистота» в соответствии с предложенной классификацией

Применительно к целям и задачам исследования нами была предложена рабочая классификация АЛС, позволяющая более полно отразить свойства препаратов, имеющие значение при установлении нормативных требований и выборе методики испытания качества АЛС по показателю «Микробиологическая чистота».

Рабочая классификация АЛС включала в себя такие параметры как лекарственная форма (что имеет существенное значение при пробоподготовке образца); способ применения АЛС (определяет требования к качеству по микробиологическим показателям); область применения (урологические, гинекологические, стоматологические и др.), химический состав и природа АЛС.

Для проведения анализа качества 477 серий антисептических лекарственных препаратов и субстанций 84 отечественных и 23 зарубежных производителей по показателю «Микробиологическая чистота» за период 2009-2012 гг. было выполнено 2385 микробиологических исследований. Из всех изученных АЛС 70% составляли растворы для местного и наружного применения, 21% – фармацевтические субстанции. Наименьшая часть изученных готовых лекарственных средств (0,2%) была представлена аэрозолями. В ходе анализа установлено, что в 2% изученных АЛС были обнаружены микроорганизмы-контаминанты в количестве, не превышающем

нормативные требования, в 1% серий количество выделенных бактерий превышало установленную норму. Чаще были контаминированы образцы растворов АЛС, применяемых местно и наружно. Среди препаратов с повышенным количеством аэробных микроорганизмов, оказались хлоргексидин, раствор для местного и наружного применения 0,05%; ротокан, экстракт жидкий для приема внутрь и местного применения; метиленовый синий, раствор водный 1%.

Методические особенности проведения микробиологических исследований качества антисептических препаратов.

Алгоритм проведения испытания

Согласно требованиям ГФ XII изд. испытание микробиологической чистоты лекарственных средств предусматривает применение ряда последовательных процессов: отбор образцов для анализа, пробоподготовку, проводимую с учетом физико-химических свойств образца, оценку антимикробного (бактериостатического и фунгистатического) действия, количественное определение жизнеспособных аэробных микроорганизмов, выявление и идентификацию отдельных видов бактерий. Важную роль при выборе метода анализа и составлении раздела нормативной документации по показателю «Микробиологическая чистота» играют антимикробное (бактериостатическое и фунгистатическое, бактерицидное, фунгицидное и спороцидное) действие препарата в условиях проведения испытания, растворимость образца, лекарственная форма АЛС.

В рамках настоящего исследования проведено изучение антимикробного действия некоторых АЛС, в ходе которого установлено, что ряд препаратов не обладает антимикробным действием в условиях испытания качества по показателю «Микробиологическая чистота»: растворы спирта этилового 40%, 70%, 90%, 95%; препараты йода (йод, раствор 5% спиртовой, люголя раствор с глицерином, бетадин, йодиол). Это свидетельствует о возможности применения метода прямого посева для исследования их микробиологической чистоты. Также выявлено, что для оценки качества некоторых АЛС

невозможно выполнить нейтрализацию антимикробного действия путем дополнительного разведения, а соответственно метод прямого посева неприменим. К ним относятся хлоргексидин, раствор 20%, 5%; перекись водорода, раствор 37% и т.д.

Применение метода мембранной фильтрации при исследовании качества по микробиологическим показателям целесообразно для лекарственных средств, растворимых в водных растворах и обладающих ярко выраженным антимикробным действием (Гунар О.В. и др., 2004). В настоящей работе проведен подбор условий для исследования микробиологической чистоты таких препаратов, как бриллиантовый зеленый, растворы для наружного применения 1% и 2%; хлоргексидин, раствор 5% и хлоргексидин, раствор для наружного применения спиртовой 0,5%. Для устранения антимикробного действия указанных АЛС испытание проводили методом мембранной фильтрации препарата после растворения в нейтрализующей жидкости (ГФ XII изд., п.1.5), с последующим промыванием раствором хлорида натрия изотонического 0,9%.

Важно отметить, что в ходе испытания качества препарата хлоргексидин, раствор для наружного применения спиртовой 0,5%, по показателю «Микробиологическая чистота» методом мембранной фильтрации после инактивации антимикробного действия удалось выявить контаминацию образца грамположительными бактериями *Staphylococcus hominis* в количестве, не превышающем установленные нормативные требования (100 КОЕ бактерий и грибов суммарно).

В ходе исследования микробиологической чистоты ряда АЛС, одним из которых является протаргол, порошок для приготовления раствора для местного применения, была выявлена необходимость дополнительного исследования свойств препарата. Нейтрализация антимикробного действия указанного препарата с помощью метода мембранной фильтрации возможна только в отношении бактерий *P.aeruginosa* и плесневых грибов *A.brasiliensis*. В ходе дальнейших исследований установлено, что препарат обладает

бактерицидными, фунгицидными и спороцидными свойствами в отношении ряда тест-штаммов, в связи с чем анализ качества по показателю «Микробиологическая чистота» целесообразно проводить лишь с целью выделения устойчивых форм микроорганизмов.

Определенные методические сложности возникают при определении микробиологической чистоты некоторых субстанций АЛС. Наряду с антимикробным действием, которое в ряде случаев невозможно устранить методами, описанными в ГФ XII изд., возникают трудности, связанные с нерастворимостью веществ в водных растворах (например, субстанция бриллиантового зеленого). Проведение испытания по микробиологическим показателям субстанции йод кристаллический невозможно, так как в качестве растворителя указанного вещества можно использовать только этанол или йодид калия, что может послужить причиной получения недостоверных результатов.

На основании проведенных исследований и обобщения полученных данных (таблица 1) разработан алгоритм испытания качества АЛС по показателю «Микробиологическая чистота» (рисунок 1). Представленный алгоритм актуален как на стадии экспертизы качества АЛС по показателю «Микробиологическая чистота», так и при разработке нормативной документации на новые препараты.

В соответствии с приведенным алгоритмом, в случаях, когда нейтрализация антимикробного действия доступными методами невозможна, целесообразно проведение дополнительных исследований с целью определения бактерицидных, фунгицидных, спороцидных свойств препарата. В зависимости от полученных результатов, делают вывод о целесообразности и полноте проведения испытания по показателю «Микробиологическая чистота».

Таблица 1.

Результаты исследования антимикробного действия, бактерицидности, фунгицидности, спороцидности ряда АЛС

| Название АЛС | Бактериостатическое и фунгистатическое действие | | | | | | Бактерицидность | Фунгицидность | Спороцидность | Предлагаемый метод испытания |
|------------------------------------|---|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|---------------|---------------|------------------------------|
| | <i>B.cereus</i> ATCC 10702 | <i>E.coli</i> ATCC 8739 | <i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027 | <i>S.aureus</i> ATCC 6538 | <i>C.albicans</i> ATCC 10231 | <i>A.brasiliensis</i> ATCC 16404 | | | | |
| <u>Хлоргексидин</u> | | | | | | | | | | |
| Раствор 0,05% | 1:50 | 1:50 | 1:10 | 1:100 | 1:10 | 1:10 | - | - | - | Прямой посев |
| Раствор 0,5% | 1:500 | 1:500 | 1:50 | 1:1000 | 1:50 | 1:50 | - | - | - | |
| Раствор 0,5% спиртовой | 1:1000 | 1:50 | 1:1000 | 1:100 | 1:50 | 1:50 | - | - | - | Мембранная фильтрация |
| Раствор 1% | 1:1000 | 1:1000 | 1:100 | >1:1000 | 1:50 | 1:50 | - | - | - | |
| Раствор 5% | >1:1000 | >1:1000 | >1:1000 | >1:1000 | >1:100 | >1:100 | Наличие | Наличие | - | |
| Субстанция 20% | >1:1000 | >1:1000 | >1:1000 | >1:1000 | >1:100 | >1:100 | Наличие | Наличие | - | * |
| <u>Мирамистин</u> | | | | | | | | | | |
| Раствор 0,01% | >1:1000 | 1:1000 | 1:1000 | >1:1000 | >1:100 | >1:100 | Отсутствие | - | - | Мембранная фильтрация |
| Субстанция | >1:1000 | >1:1000 | >1:1000 | >1:1000 | >1:100 | >1:100 | Отсутствие | - | - | |
| <u>Этанол</u> | | | | | | | | | | |
| Раствор 40% | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | Отсутствие | Отсутствие | Отсутствие | Прямой посев |
| Раствор 95% | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | Наличие | Наличие | Отсутствие | |
| <u>Йод, раствор 5%</u> | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | Наличие | Наличие | Наличие | |
| <u>Люголя раствор с глицерином</u> | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | Наличие | Наличие | Отсутствие | |
| <u>Бетадин, р-р</u> | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | Наличие | Отсутствие | Наличие | |
| <u>Протаргол</u> | 1:1000 | 1:1000 | 1:1000 | >1:1000 | >1:100 | >1:100 | Отсутствие | Отсутствие | - | |
| <u>Колларгол</u> | >1:1000 | >1:1000 | >1:1000 | >1:1000 | >1:100 | >1:100 | Отсутствие | Отсутствие | - | |
| <u>Метиленовый синий</u> | | | | | | | | | | |
| Раствор 1% | 1:100 | 1:10 | 1:10 | 1:50 | 1:10 | 1:10 | - | - | - | Прямой посев |
| Субстанция - порошок | >1:1000 | 1:10 | 1:10 | 1:500 | 1:50 | 1:10 | - | - | - | |

Примечания: *Исключение раздела или испытание на отсутствие устойчивых форм; 1:10 и др. – разведение препарата, позволяющее нейтрализовать антимикробное действие; – - исследование не проводили

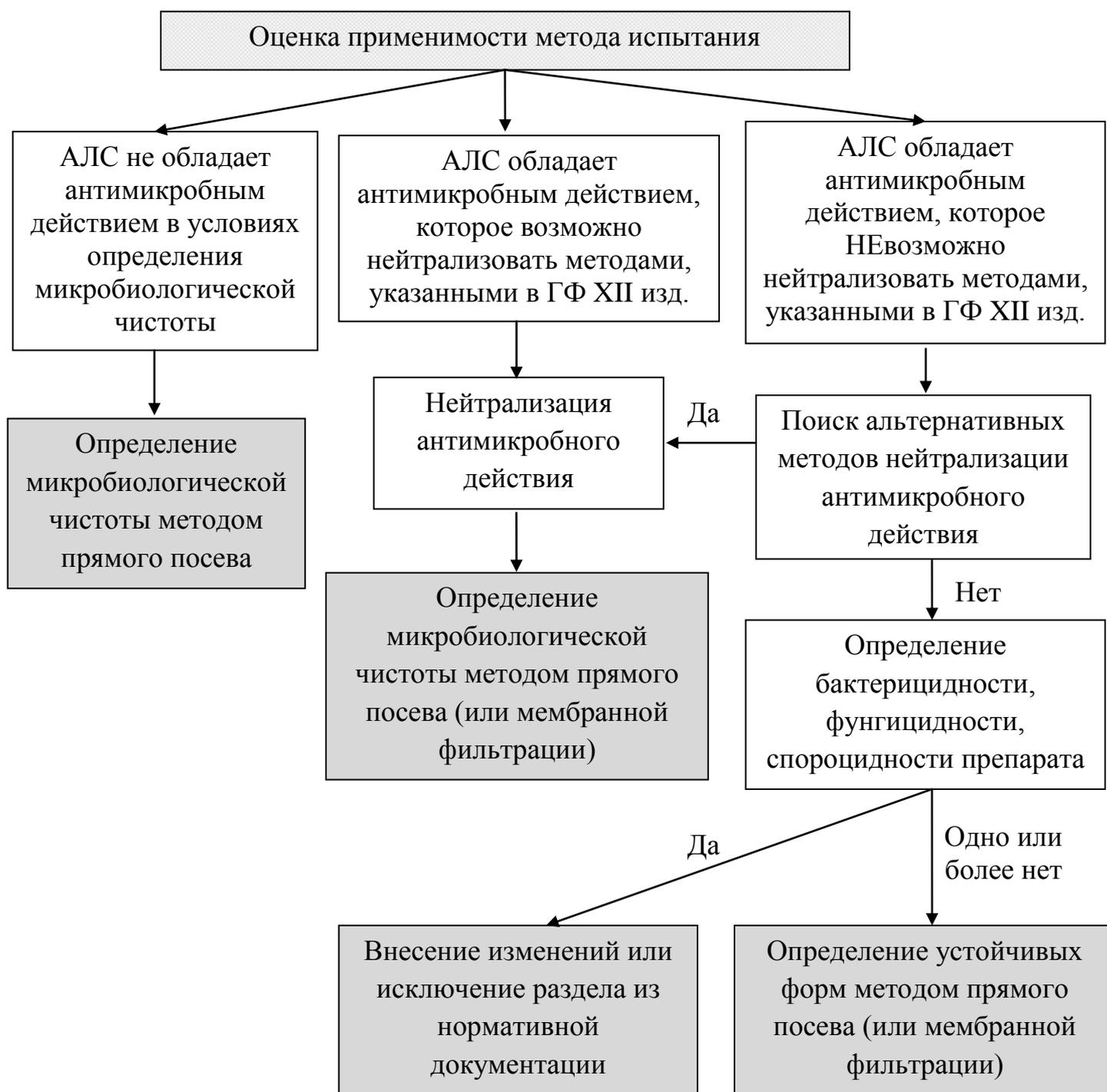


Рисунок 1 Алгоритм испытания качества АЛС по показателю «Микробиологическая чистота»

В нормативной документации «Европейского общества стандартизации» (CEN) описаны методы определения эффективности антисептиков и дезинфектантов, среди которых ключевое место занимают суспензионные методы ([EN 1040-2006](#); [EN 1275-2006](#); [EN 13704-2002](#)), которые и были использованы в настоящей работе. В ходе испытания взвесь соответствующего тест-микрорганализма вносили в раствор антисептика, и, после определенного

времени экспозиции и нейтрализации действия АЛС, методом прямого посева на соответствующую агаризованную питательную среду определяли количество жизнеспособных клеток тест-микроорганизма. Результаты представляли в виде коэффициента, показывающего уменьшения числа жизнеспособных клеток, внесенных в испытуемый образец, по сравнению с контрольной серией, не содержащей препарат. АЛС считали бактерицидным, если количество уничтоженных клеток составляло 10^5 и более, фунгицидным – 10^4 и более, спороцидным – 10^3 и более. Отечественными исследователями разработан ряд альтернативных методов, среди которых методика определения бактерицидности дезинфектантов, являющаяся измененным методом диффузии в агар для определения активности антибиотиков вызывает наибольший интерес (Аржаков В.Н. и др., 2004). Указанный метод был адаптирован нами для определения бактерицидности АЛС. Изменения касались способа учета результатов. Так, изначально авторы предлагали считать, что препарат обладает бактерицидностью, если наблюдается зона угнетения роста более 20 мм. В настоящей работе предложено измерять зоны ингибирования роста и проводить математический расчет количества инактивированных клеток тест-микроорганизмов. Таким образом, данная модификация позволяет сравнить вычисленные значения с результатами, полученными суспензионным методом.

С целью подтверждения возможности применения модифицированного метода диффузии в агар для определения бактерицидности ряда АЛС проведена его валидация. В ходе валидационного исследования были выбраны и оценены такие параметры, как правильность, прецизионность (повторяемость), специфичность, линейность, устойчивость. Для этого использовали 16 наименований АЛС, два тест-штамма микроорганизмов (*P.aeruginosa* ATCC 9027, *S.aureus* ATCC 6538), отечественные и зарубежные питательные среды. В качестве референсного метода был выбран количественный суспензионный тест.

В ходе оценки специфичности путем сравнения зон угнетения роста с зонами лизиса показано, что характеристикой, определяемой с помощью

валидируемого метода, является именно бактерицидность. Коэффициент корреляции, характеризующий линейность метода, больше 0,9 в диапазоне концентраций растворов хлоргексидина 1-20%, а также для зависимостей размера зон угнетения роста от количества внесенного образца, что соответствует установленному критерию приемлемости. В ходе оценки правильности установлено, что для ряда препаратов (перекиси водорода и спирта этилового) систематическая погрешность значима на фоне случайной, в остальных – незначима и не превышала 15%. Коэффициент вариации, используемый для оценки повторяемости метода, для всех случаев не превышал 2 – 4% (при установленном критерии приемлемости 15%).

При определении устойчивости проводили сравнение результатов, полученных с использованием различных питательных сред с помощью критерия Фишера (F). Установлено, что результаты статистически неразличимы между собой, что свидетельствует об устойчивости метода.

В настоящее время в ГФ XII изд. нет нормативных требований, регламентирующих отсутствие *C.albicans* в АЛС. С целью гармонизации с зарубежными фармакопеями для выделения и идентификации *C.albicans* разработана схема (рисунок 2).

Для апробации предлагаемой схемы в рамках настоящей работы проводили искусственную контаминацию АЛС для интравагинального применения в различных лекарственных формах смесью дрожжевых грибов: тест-штамма *Candida albicans ATCC 10231* и микроорганизмов, выделенных из различных лекарственных препаратов: *Saccharomyces spp.*, *Candida colliculosa*, *Candida pelliculosa*, *Candida guilliermondii*, *Rhodotorula glutinis*. Морфологические и тинкториальные свойства использованных микроорганизмов не отличались от свойств *C.albicans*. Исключение составлял лишь вид дрожжевых грибов *Rhodotorula glutinis*, колонии которого имеют розовую окраску. После контаминации воспроизводили предложенную методику. Для идентификации микроорганизмов производили посев на хромогенную питательную среду ChromID Candida (производства фирмы

«Biomerieux»), а также выполняли определение видовой принадлежности с помощью автоматического анализатора Vitek2Compact.

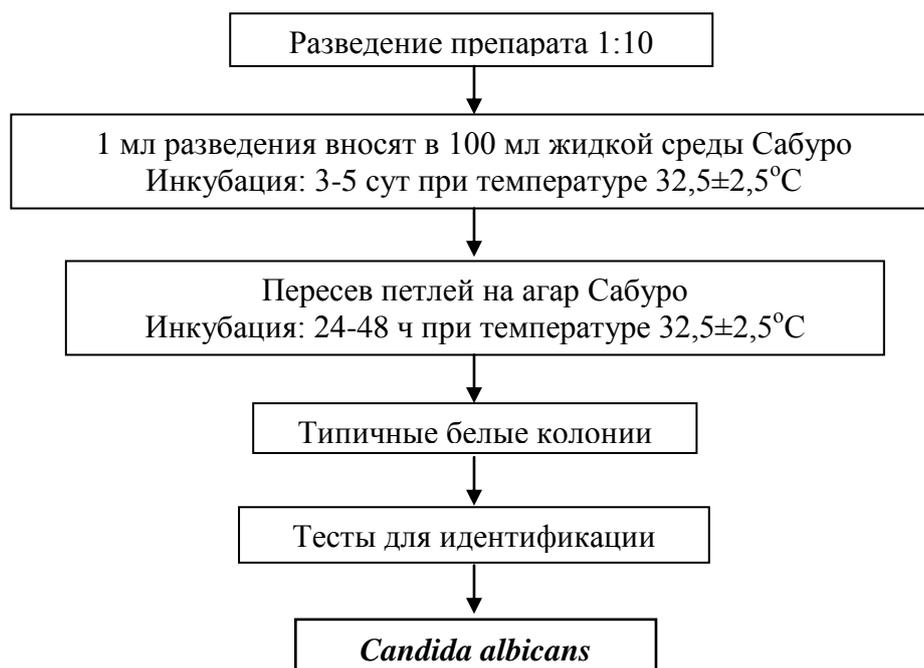
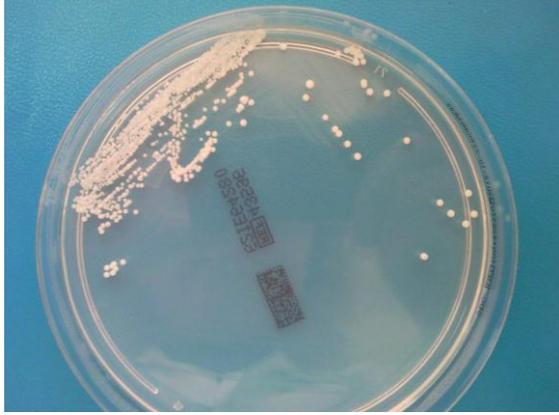
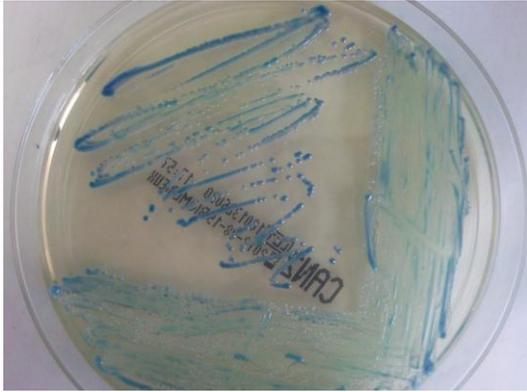


Рисунок 2. Схема выделения и идентификации *Candida albicans*

В ходе исследования из ряда препаратов (повидон-йода, а также из крема вагинального дафнеджин) не удалось выделить дрожжевые грибы, в отличие от остальных исследуемых препаратов. Проведенная идентификация путем посева из накопительной питательной среды на хромогенную питательную среду для селективного выделения дрожжей и прямой идентификации *C.albicans* (ChromID Candida) во всех случаях позволила визуально дифференцировать грибы *C.albicans* (таблица 2, рисунок 2.5). Ряд фотографий, полученных при апробации методики выделения и идентификации дрожжевых грибов *C.albicans*, представлен в таблице 2 (рисунки 2.1 – 2.6). В качестве примеров для сравнения приведены фотографии, демонстрирующие вид колоний тест-микроорганизмов *C.albicans* и *C.guilliermondii*. Полученные результаты, а также данные информационно-аналитических исследований подтверждают необходимость включения требований, регламентирующих отсутствие *C.albicans* в интравагинальных ЛС, а также методики выделения и идентификации указанного вида микроорганизма в нормативную документацию (ГФ XII изд.).

Таблица 2

Результаты, полученные при апробации методики выделения и идентификации дрожжевых грибов *C.albicans* после искусственной контаминации препаратов.

| | |
|---|---|
|  |  |
| <p>Рисунок 2.1 Рост дрожжевых грибов на агаре Сабуро, выделенных из препарата мирамистин, раствор 0,01%</p> | <p>Рисунок 2.2 Рост дрожжевых грибов на агаре Сабуро, выделенных из препарата ливарол, суппозитории вагинальные</p> |
|  |  |
| <p>Рисунок 2.3 Рост тест-микроорганизма <i>C.albicans</i> на хромогенном агаре</p> | <p>Рисунок 2.4 Рост тест-микроорганизма <i>C.guilliermondii</i> на хромогенном агаре</p> |
|  |  |
| <p>Рисунок 2.5 Рост дрожжевых грибов на хромогенной питательной среде, выделенных из препарата мирамистин, раствор 0,01%</p> | <p>Рисунок 2.6 Рост дрожжевых грибов на хромогенной питательной среде, выделенных из препарата ливарол, суппозитории вагинальные</p> |

Микроорганизмы-контаминанты АЛС

Присутствие микроорганизмов-контаминантов в лекарственных средствах может оказывать существенное влияние на стабильность препарата, изменять его физико-химические свойства, служить причиной заболеваний и побочных реакций, вызванных токсигенными, аллергенными, канцерогенными свойствами микроорганизмов и их метаболитов.

Хлоргексидина биглюконат широко применяется для профилактики и лечения заболеваний различной этиологии в таких отраслях медицины как хирургия, стоматология, гинекология, урология, дерматовенерология, оториноларингология и др. Особое внимание в настоящей работе было уделено изучению микробиологической чистоты препарата хлоргексидин, раствор для местного применения 0,05%. В ходе испытания было выявлено, что в 3 образцах разных отечественных производителей общее количество бактерий значительно превышало установленные нормативные требования (10^2 КОЕ/мл бактерий и грибов суммарно) и составляло до $10^4 - 10^7$ КОЕ/мл.

При изучении микрофлоры, контаминирующей АЛС, установлено, что микроорганизмами-контаминантами в большинстве случаев были грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Результаты идентификации микроорганизмов-контаминантов препаратов представлены в таблице 3.

Таблица 3

Микроорганизмы-контаминанты АЛС

| Лекарственное средство | Микроорганизмы-контаминанты |
|--|---|
| Хлоргексидин раствор 0,05% (образец 1) | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| Хлоргексидин раствор 0,05% (образец 2) | <i>Chriseobacterium indologenes</i> |
| Хлоргексидин раствор 0,05% (образец 3) | <i>Chriseobacterium (Elizabethkingia) meningosepticum</i> |

Указанные микроорганизмы при определенных условиях (сниженный иммунитет, ранний детский возраст и др.) представляют серьезную опасность для здоровья человека. В связи с этим большое значение имеет исследование возможности контаминантов сохранять жизнеспособность в АЛС, не соответствующих требованиям нормативной документации по показателю

«Микробиологическая чистота». Количество микроорганизмов снизилось до нуля за 7 месяцев только в одном образце хлоргексидина, раствор 0,05% (рисунок 3), в остальных случаях бактерии-контаминанты сохраняли жизнеспособность на протяжении срока годности образца.

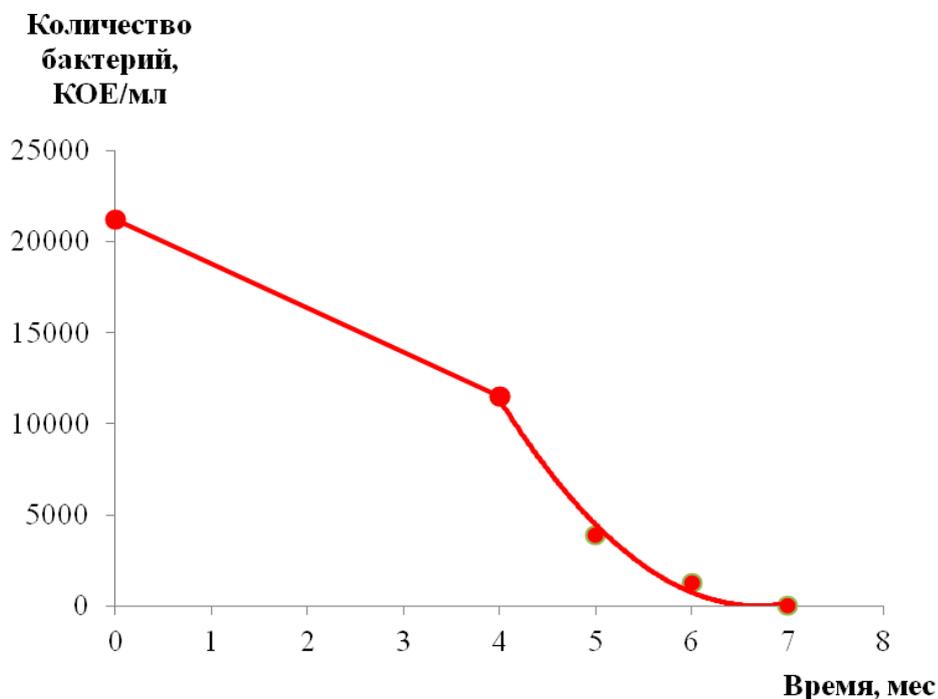


Рисунок 3. Сохранение жизнеспособности микроорганизмов в контаминированном препарате Хлоргексидин, раствор 0,05% (образец 1).

Проведена оценка влияния микроорганизмов на химические характеристики контаминированных препаратов. Для этого определяли количественное содержание хлоргексидина методом спектрофотометрии. Выявлено, что полученные значения содержания активного вещества в контаминированных образцах соответствовали требованиям нормативной документации.

ВЫВОДЫ

1. Результаты изучения и анализа нормативной документации номенклатуры АЛС 84 отечественных и 23 зарубежных производителей в период с 2009 по 2012 гг свидетельствуют о необходимости актуализации и унификации раздела «Микробиологическая чистота». Данный раздел, предусмотренный Государственной Фармакопеей Российской Федерации, требует конкретизации материалов по методам и критериям оценки качества с учетом особенностей антимикробного действия и форм выпуска анализируемой продукции.
2. Алгоритм испытания качества АЛС по показателю «Микробиологическая чистота», разработанный с учетом антимикробного (бактериостатического, фунгистатического, бактерицидного, фунгицидного и спороцидного) действия и методических особенностей анализа качества препарата, рационален как при оптимизации экспертизы качества, так и при актуализации раздела «Микробиологическая чистота» нормативной документации на данную группу препаратов.
3. Адаптированный вариант метода диффузии в агар для определения бактерицидности АЛС и его математическая составляющая позволяют установить количество инактивированных клеток микроорганизмов. Выполненная валидация обосновывает возможность использования усовершенствованного метода для определения бактерицидности АЛС при испытании качества препарата по показателю «Микробиологическая чистота» в соответствии с предложенным алгоритмом.
4. По результатам проведения 2385 микробиологических исследований качества АЛС установлено, что из 58 серий препаратов природного происхождения 5,2% образцов содержали превышенное количество микроорганизмов-контаминантов, из 419 серий препаратов синтетического происхождения – 1%. Это были препараты хлоргексидина и метиленового синего в форме растворов для местного и наружного применения.

5. Установлено, что в структуре видового состава микробных контаминантов препаратов хлоргексидина доминируют грамотрицательные бактерии *Chriseobacterium indologenes*, *Chriseobacterium meningosepticum*, *Enterobacter cloacae*. Учитывая принадлежность этих видов к группе условно-патогенных микроорганизмов, применение контаминированных АЛС может быть потенциально опасно для здоровья человека.
6. В ходе целевого изучения культурального метода обнаружения и идентификации дрожжевых грибов *Candida albicans* в интравагинальных лекарственных средствах, установлено, что наиболее информативным способом дифференциации экспресс-идентификации является использование хромогенной питательной среды.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гунар О.В., Колбикова А.С., **Сахно Н.Г.** К вопросу о микробиологической чистоте твердых лекарственных форм оториноларингологических (ЛОР) препаратов. // Тезисы докладов XVII Российского нац. конгресса «Человек и лекарство». – М., 2010. – С. 517
2. Гунар О.В., **Сахно Н.Г.** Анализ качества твердых лекарственных средств синтетического происхождения по показателю «Микробиологическая чистота». // Тезисы докладов XVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2010. – С. 545
3. Каграманова К.А., Гунар О.В., **Сахно Н.Г.** Совершенствование подходов к интерпретации результатов микробиологических анализов лекарственных средств путем гармонизации с требованиями зарубежных фармакопей. // Тезисы докладов XVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2010. – С. 522
4. Гунар О.В., Каграманова К.А., **Сахно Н.Г.** Требования к микробиологическому качеству лекарственных средств и процедур испытания в различных фармакопеях. Часть 1. // Фармация. – 2010. – №6. – С. 9-14
5. **Сахно Н.Г.** Особенности испытания препаратов бриллиантового зеленого и йода по показателю «Микробиологическая чистота». // Тезисы докладов Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация» - потенциал будущего. – СПб.: «Издательство СПХФА», 2011. – С. 134-135
6. **Сахно Н.Г.** Использование оптического стандарта для количественного определения микроорганизмов в инокулятах.// Тезисы докладов XVIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2011. – С. 541-542
7. **Сахно Н.Г.**, Гунар О.В. Сохранение жизнеспособности аэробных бактерий-контаминантов в твердых лекарственных препаратах, изготовленных из синтетических субстанций.// Тезисы докладов XVIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2011. – С. 632
8. Гунар О.В., **Сахно Н.Г.** Микробиологическая безопасность лекарственных препаратов, содержащих этиловый спирт // Биозащита и биобезопасность. – 2011. – №2 – С.42-47
9. **Сахно Н.Г.** Микробиологическое качество лекарственных препаратов хлоргексидина биглюконата. // Фармация. – 2012. – №1 – С.3-5
10. **Сахно Н.Г.**, Гунар О.В., Каграманова К.А., Булгакова Г.М. Испытание микробиологического качества лекарственных средств по российской и европейской фармакопеям. Сравнение методик. // Фармация. – 2011. – №2 – С.47-49
11. Гунар О.В., **Сахно Н.Г.**, Булгакова Г.М., Красильникова Т.Н.. Анализ качества гомеопатических лекарственных средств по микробиологическим показателям. // Ведомости НЦЭСМП. – 2011. – №2 – С.54-55
12. Красильникова Т.Н., **Сахно Н.Г.**, Давиденко О.В., Булгакова Г.М. Гунар О.В. Анализ качества лекарственных растительных средств по показателю

«Микробиологическая чистота» // Тезисы докладов XVIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2012. – С. 392

13. Гунар О.В., Сахно Н.Г. Безопасность антисептических лекарственных средств. // Медицина в XXI веке: традиции и перспективы. сборник трудов международной Интернет-конференции. Казань, 12-15 марта 2012 г. Сервис виртуальных конференций Рах Grid. – Казань: Изд-во "Альянс", 2012. – С.61-63.

14. Гунар О.В., Сахно Н.Г. Микофлора нестерильных лекарственных средств // Современная микология в России. Том 3. Материалы 3-го Съезда микологов России. – М.: Национальная академия микологии, 2012. – С.184

15. Сахно Н.Г., Гунар О.В. Совершенствование и разработка фармакопейных методов выделения и идентификации микроорганизмов-контаминантов лекарственных средств // Вестник ВолгГМУ(приложение): Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств». Часть II. – Волгоград: Издательство ВолгГМУ, 2012. – С.11-12

16. Гунар О.В., Сахно Н.Г. Антисептические лекарственные препараты и анализ их качества по микробиологическим показателям // Ведомости НЦЭСМП. – 2012. – №4 – С.44-48

17. Одегова Т.Ф., Гунар О.В., Сахно Н.Г., Булгакова Г.М. Валидация процесса хранения взвесей некоторых тест-микроорганизмов. // Фармация. – 2012. – №8 – С.7-9

18. Сахно Н.Г. Микроорганизмы-контаминанты антисептических лекарственных средств//Медико-социальные аспекты проведения экспертизы качества, безопасности и эффективности лекарственных средств в условиях реформирования здравоохранения: Материалы первой научно-практической конференции молодых ученых.- М.:ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздравсоцразвития России, 2012.- С.69-71

19. Гунар О.В., Сахно Н.Г., Давиденко О.В. Микробиологический контроль растительных лекарственных средств и сохранение жизнеспособности микроорганизмов-контаминантов // Материалы 67-ой региональной конференции «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск, 2012 – С.322-323

Используемые сокращения

АЛС – антисептические лекарственные средства

ЖНВЛС – жизненно необходимые и важнейшие лекарственные средства

ГФ – Государственная фармакопея

ОФС – общая фармакопейная статья

КОЕ – колониеобразующие единицы

РЕЗЮМЕ

Сахно Надежда Геннадьевна (Россия)

Применение микробиологических методов для стандартизации и контроля качества некоторых антисептических лекарственных средств

Диссертационное исследование посвящено стандартизации требований и разработке методов анализа качества антисептических лекарственных средств по микробиологическим показателям. Проведен сравнительный анализ нормативной документации. Изучено качество 48 АЛС в соответствии с предложенной классификацией. Выявлено, что наибольшему риску контаминации подвержены водные растворы (хлоргексидин, раствор 0,05%, метиленовый синий, раствор 1%). Предложен алгоритм испытания качества АЛС по показателю «Микробиологическая чистота» с учетом антимикробного действия препарата и методических особенностей анализа его качества. Проведена модификация и валидация полуколичественного метода диффузии в агар для определения бактерицидности АЛС. Изучен видовой состав микроорганизмов-контаминантов АЛС и исследована возможность сохранения жизнеспособности выделенных бактерий в контаминированных АЛС. Разработан метод выделения и идентификации *Candida albicans* из интравагинальных лекарственных средств и проведена его апробация.

ABSTRACT

Sakhno Nadezhda (Russia)

The use of microbiological methods for the standartization and quality control of some antiseptic medicines

The dissertational research is devoted to the requirement standartization and development of microbiological quality analysis techniques of antiseptics. The comparative analysis of normative documentation was performed. 48 medicines quality was studied according to the proposed classification. It was revealed that liquid free-alcohol medicines such as chlorhexidine solution 0.05%, methylene blue solution 1% are exposed to the greatest risk of microbial contamination. The procedure of microbiological quality testing of antiseptics was proposed. It was developed taking into account a medicine antimicrobial action and methodical features of its quality analysis. Modification and validation of semi-quantitative agar diffusion method for the determination of antiseptics bactericidity were carried out. The microorganisms species contaminated antiseptics were investigated. It was studied whether isolated bacteria were able to maintain their viability in contaminated medicines. The technique of *Candida albicans* isolation and identification from intravaginal medicines was developed and approved.