

Алгоритм действий при определении стерильности антибиотиков-карбапенемов

С. И. Кулешова, С. А. Процак, С. А. Лисунова, Г. Ю. Романюк, Е. Н. Семенова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Статья поступила 02.06.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: Разработан алгоритм действия по оценке эффективности и достоверности проведения испытания по показателю «Стерильность» в части оценки снятия антимикробного действия остаточных количеств антибиотиков, остающихся на мембранных фильтрах в процессе анализа. Установлено, что рассмотренный порядок действий позволяет подобрать условия проведения анализа, исключающие возможность получения ложноотрицательных результатов для препаратов антибиотиков, обладающих высокой биологической активностью и способностью сорбироваться на мембранных фильтрах. Обоснована необходимость проведения поэтапного экспериментального подбора условий анализа с использованием различных тест-микроорганизмов, позволяющего определить комбинацию нескольких способов нейтрализации остаточных количеств антибиотиков, так как на любом из описанных этапов возможно получение удовлетворительных результатов в зависимости от природы антибиотика, что позволяет минимизировать материальные затраты. Подробно обоснованы все этапы определения полноты отмыывания мембранных фильтров от остаточных количеств антибиотика на примере меропенема. Экспериментально подобраны условия проведения испытания для препаратов меропенема, позволяющие получить достоверные результаты по испытанию на стерильность.

Ключевые слова: меропенем; стерильность; мембранная фильтрация; устранение антимикробного действия; алгоритм действий.

Библиографическое описание: Кулешова СИ, Процак СА, Лисунова СА, Романюк ГЮ, Семенова ЕН. Алгоритм действий при определении стерильности антибиотиков-карбапенемов. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 251–255.

Испытание на стерильность является обязательным показателем для оценки качества лекарственных препаратов, для которых предъявляется требование отсутствия живых микроорганизмов в конечном продукте. Монографии, подробно описывающие проведение испытания на стерильность, приведены во всех ведущих фармакопеях (Фармакопея США [1], Европейская фармакопея [2]) и национальных фармакопеех, в том числе и в Государственной фармакопее Российской Федерации XIII издания (ГФ XIII) — ОФС 1.2.4.0003.15 «Стерильность». Структура практически всех монографий идентична и включает в себя описание двух общепринятых методов — метода прямого посева и метода мембранной фильтрации, отбор проб для анализа, подготовку образцов для проведения испытания, питательные среды, проверку их ростовых свойств, условия инкубации посевов, способы устранения антимикробного действия лекарственных средств, интерпретацию результатов. Тем не менее, исследователи при проведении испытания на стерильность сталкиваются с рядом проблем, которые требуют более детальной разработки, чем это предусмотрено в общих статьях на стерильность. Совершенствуются методики определения стерильности для сравнительно новых препаратов, получаемых на основе клеточных технологий, разрабатываются подходы к подготовке препаратов к испытанию с учетом особенностей отдельных групп лекарственных средств [3, 4].

Одними из самых проблемных лекарственных средств при определении стерильности являются препараты, обладающие ярко выраженным противо-

микробным действием, в частности антибиотики. Для парентеральных лекарственных форм антибиотиков, как правило, испытание на стерильность проводят методом мембранной фильтрации с использованием специальных мембранных фильтров, позволяющих минимизировать сорбцию остаточных количеств антибиотиков после промывания мембраны. Ранее авторами рассмотрен вопрос контроля снятия остаточного антимикробного действия антибиотиков при определении стерильности методом мембранной фильтрации. Получены результаты, подтверждающие отсутствие влияния остаточных количеств антибиотиков на оценку качества определенных препаратов антибиотиков по показателю «Стерильность» при комбинации нескольких способов устранения антимикробного действия: разведение, специфические нейтрализаторы, увеличение объема промывной жидкости [5]. Как показал многолетний опыт работы лаборатории антибиотиков ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при проведении испытания на стерильность, задача контроля полноты отмыывания мембранных фильтров является достаточно трудоемкой и требует значительного расхода материальных ресурсов и трудозатрат специалистов-микробиологов.

Целью настоящей работы является разработка алгоритма действия при определении стерильности препаратов антибиотиков для установления необходимых количеств активного вещества, пропускаемого через мембрану, инактиватора (при необходимости), объема промывной жидкости, что позволило бы исключить воздействие остаточных количеств анти-

биотика, остающихся на мембранных фильтрах после проведения фильтрации, на возможные микроорганизмы-контаминанты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран инъекционный препарат меропенема. Меропенем является β -лактамным антибиотиком, относится к группе карбопенемов и обладает широким спектром действия, высокоактивен в отношении многих грамположительных, грамотрицательных и анаэробных микроорганизмов. При определении стерильности меропенема выявлена способность данного антибиотика сорбироваться на мембранных фильтрах, что не позволяет выявлять возможное присутствие жизнеспособных микроорганизмов в лекарственных препаратах [5].

Испытание проводили методом мембранной фильтрации на приборе «Стеритест Эквинокс» фирмы «Merck», с установленными специальными фильтроэлементами «Стеритест», оснащенными специальными мембранными фильтрами «Дюрапор» с низкой сорбцией, которые рекомендованы производителями для испытания на стерильность препаратов антибиотиков. Питательные среды готовили из сухих сред производства фирмы «HiMedia» (жидкую тиогликолевую среду — для выявления аэробных и анаэробных бактерий; жидкую соево-казеиновую среду — для выявления грибов). Данные среды по прописям полностью соответствуют средам, рекомендованным для испытания на стерильность ГФ XIII (ОФС 1.2.4.0003.15). Дополнительно использовали инактиватор пенициллиназу, производства ООО НПФ «БИОКАР» с активностью 10^6 ЕД на флакон, и нейтрализующую жидкость («Merck»), состав которой аналогичен составу нейтрализующей жидкости, приведенному в ГФ XIII (ОФС 1.2.4.0002.15). В качестве промывной жидкости применяли раствор натрия хлорида изотонического 0,9 % стерильного, рН 7,0, и в качестве растворителя — воду дистиллированную стерильную.

Подготовку образцов к анализу также проводили в полном соответствии с фармакопейными требованиями [6]. Полноту отмывания мембраны от остаточных количеств антибиотика определяли с помощью тест-микроорганизмов, рекомендованных ГФ XIII: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231,

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Тест-микроорганизмы вносились в питательные среды каждый по отдельности в количестве не более 100 КОЕ/100 мл среды. Количество антибиотика, вносимого в питательные среды, рассчитывали в миллиграммах по активному веществу, а не по массе препарата. Одновременно ставился контрольный опыт (положительный контроль) с вышеперечисленными микроорганизмами в аналогичных условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе определение стерильности препарата меропенема было проведено с использованием пенициллиназы (100 ЕД на 1 мл среды), рекомендованной для нейтрализации β -лактамных антибиотиков. Количество антибиотика, пропускаемого через мембранные фильтры для внесения в каждую питательную среду, составило 500 мг, объем промывной жидкости — 300 мл. Результаты эксперимента представлены в таблице 1 (опыт 1). Наличие роста тест-микроорганизмов обнаружено на пятые сутки наблюдения только для грибной микрофлоры *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, что согласуется со спектром действия меропенема, который используется в медицинской практике только для лечения бактериальных инфекций. Полученные данные показали, что для получения адекватных результатов по показателю «Стерильность» необходимо проводить дальнейшие экспериментальные исследования по подбору условий проведения испытания.

На следующем этапе было решено уменьшить количество антибиотика, пропускаемого через мембранный фильтр, в два раза (150 мг). Это минимально возможное количество испытуемого препарата для посева на питательные среды в соответствии с ОФС 1.2.4.0003.15 ГФ XIII. Полученные результаты аналогичны результатам при внесении 500 мг меропенема, что свидетельствует о необходимости комбинировать способы устранения антимикробного действия меропенема, остающегося на мембранных фильтрах при отмывании их 300 мл промывной жидкости (табл. 2, опыт 2).

В соответствии с ранее полученными данными, проведен опыт с увеличением объема промывной жидкости до 450 мл и содержания пенициллиназы до 600 ЕД в 1 мл питательной среды, при этом количество антибиотика на мембрану не изменилось (табл. 2,

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА КОНТРОЛЯ ПОЛНОТЫ ОТМЫВАНИЯ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СТЕРИЛЬНОСТИ МЕРОПЕНЕМА

Категория испытаний	Количество активного вещества на мембрану, мг	Объем промывной жидкости на мембрану, мл	Пенициллиназа, ЕД/мл питательной среды	Тест-штаммы микроорганизмов, используемые для контроля полноты отмывания мембраны от остаточных количеств антибиотика						
				Тиогликолевая среда				Соево-казеиновая среда		
				<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
Опыт 1	500	300	100	НР	НР	НР	НР	Р	Р	НР
Положительный контроль	н/п	н/п	100	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р

Примечание: н/п — не применяли, (Р) — наличие роста тест-микроорганизмов, (НР) — отсутствие роста тест-микроорганизмов

опыт 3). В этом случае в опытных емкостях наблюдалось наличие роста всех тест-микроорганизмов, кроме *Bacillus subtilis* ATCC 6633, рост которого не проявился ни на тиогликолевой среде, ни на соево-казеиновой среде. Отсутствие положительного результата с одной из используемых тест-культур не позволило сделать заключение о возможности проведения испытания с использованием указанных количеств промывной жидкости и инактиватора для получения адекватных результатов по показателю качества «Стерильность».

Учитывая предыдущие исследования, в ходе которых даже значительные количества пенициллиназы не позволяют устранить антибактериальное действие меропенема, был проведен целый ряд экспериментов с использованием различных нейтрализующих соединений, рекомендованных ГФ XII, и их комбинаций, кроме того анализировалась возможность увеличения объема промывной жидкости в допустимых пределах. В целях экономии материальных

ресурсов в качестве тест-микроорганизма использовался только *Bacillus subtilis* ATCC 6633. После получения положительных результатов с данным микроорганизмом была проделана работа с применением 900 мл промывной жидкости, и для нейтрализации меропенема, остающегося на мембранных фильтрах, использовалась комбинация пенициллиназы (100 ЕД/мл) и нейтрализующей жидкости, которая в количестве 90 мл вносилась в фильтроэлементы и соприкасалась с мембраной в течение 45 мин. Время выдержки было подобрано экспериментально, учитывая многолетний опыт работы лаборатории по устранению антимикробного действия препаратов антибиотиков при проведении испытаний по микробиологическим показателям. После удаления нейтрализующей жидкости фильтрацией в емкости вносили питательные среды. Проведенные опыты показали, что при использовании данной комбинации способов устранения антимикробного действия наблюдается рост всех используемых

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА КОНТРОЛЯ ПОЛНОТЫ ОТМЫВАНИЯ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СТЕРИЛЬНОСТИ МЕРОПЕНЕМА

Категория испытаний	Количество активного вещества на мембрану, мг	Объем промывной жидкости на мембрану, мл	Пенициллиназа, ЕД/мл питательной среды	Тест-штаммы микроорганизмов, используемые для контроля полноты отмывания мембраны от остаточных количеств антибиотика						
				Тиогликолевая среда				Соево-казеиновая среда		
				<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
Опыт 2	150	300	100	НР	НР	НР	НР	Р	Р	НР
Положительный контроль	н/п	н/п	100	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
Опыт 3	150	450	600	НР	Р	Р	Р	Р	Р	НР
Положительный контроль	н/п	н/п	600	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р

Примечание: н/п — не применяли, (Р) — наличие роста тест-микроорганизмов, (НР) — отсутствие роста тест-микроорганизмов

Таблица 3

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА КОНТРОЛЯ ПОЛНОТЫ ОТМЫВАНИЯ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СТЕРИЛЬНОСТИ МЕРОПЕНЕМА

Категория испытаний	Количество активного вещества на мембрану, мг	Объем промывной жидкости на мембрану, мл	Пенициллиназа, ЕД/мл питательной среды/объем и время экспозиции нейтрализующей жидкости, мл/мин	Тест-штаммы микроорганизмов, используемые для контроля полноты отмывания мембраны от остаточных количеств антибиотика						
				Тиогликолевая среда				Соево-казеиновая среда		
				<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
Опыт 4	150	900	100/90/45	Р	Р	н/п	Р	н/п	н/п	Р
Положительный контроль	н/п	н/п	100	Р	Р	н/п	Р	Р	Р	Р
Опыт 5	300	900	100/90/45	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
Положительный контроль	н/п	н/п	100	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р

Примечание: н/п — не применяли, (Р) — наличие роста тест-микроорганизмов, (НР) — отсутствие роста тест-микроорганизмов

тест-микроорганизмов, как в случае фильтрации 150 мг активного вещества через каждую мембрану, так и в случае фильтрации 300 мг (табл. 3). Определение стерильности при таких условиях позволяет получить адекватные результаты и гарантировать качество препаратов меропенема по показателю «Стерильность».

Таким образом, предложенный алгоритм действий по оценке эффективности и достоверности проведения испытания на стерильность антимикробных лекарственных средств включает в себя поэтапный экспериментальный подбор условий проведения анализа, исключающих возможность получения ложно-отрицательных результатов при оценке стерильности препаратов антибиотиков, обладающих высокой биологической активностью и способностью сорбироваться на мембранных фильтрах. Поэтапный подход к оценке полноты отмывания мембранных фильтров с использованием различных тест-микроорганизмов дает возможность определить комбинацию нескольких способов нейтрализации остаточных количеств антибиотиков, так как на любом из описанных этапов возможно получение удовлетворительных результатов в зависимости от природы антибиотика, что позволит минимизировать материаль-

ные затраты. Для некоторых антибиотиков, к которым относится меропенем, необходимо проведение целого ряда экспериментальных исследований, чтобы отработать условия для проведения испытания, позволяющие гарантировать получение достоверных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. United States Pharmacopoeia. 39th ed. USP 39-NF 34; 2016.
2. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
3. Сахно НГ, Гунар ОВ. Лекарственные препараты на основе клеточных технологий, микроорганизмы-контаминанты и методы определения стерильности. *Биофармацевтический журнал* 2016; 8(2): 19–28.
4. Гунар ОВ, Сахно НГ, Рощина МВ. Особенности определения стерильности различных групп твердых лекарственных препаратов для парентерального применения. *Химио-фармацевтический журнал* 2016; 50(1): 42–6.
5. Кулешова СИ, Протак СА, Вилкова СИ, Романюк ГЮ, Семенова ЕН. Определение стерильности препаратов антибиотиков. Валидация метода. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2012; (3): 8–10.
6. Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15. Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. М.; 2015 [Интернет]. Available from: <http://femb.ru/feml>.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
Кулешова Светлана Ивановна. Начальник лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук.

Протак Светлана Александровна. Главный эксперт лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

Лисунова Светлана Анатольевна. Эксперт 1-й категории лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

Романюк Галина Юрьевна. Эксперт 1-й категории лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

Семенова Екатерина Николаевна. Эксперт 2-й категории лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Кулешова Светлана Ивановна; Kuleshova@expmed.ru

PLAN OF ACTION FOR CARBAPENEM ANTIBIOTICS STERILITY TESTING

S. I. Kuleshova, S. A. Protsak, S. A. Lisunova, G. Yu. Romanyuk, E. N. Semenova

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article proposes a plan of action for assessing effectiveness and reliability of sterility testing in terms of neutralization of antimicrobial activity of residual amounts of antibiotics remaining on the membrane filters during the analysis. It was demonstrated that the proposed plan of action helps to select appropriate test conditions that rule out the possibility of obtaining false negative results for antibiotics with high biological activity that are capable of sticking to membrane filters. The article demonstrates the need for a stepwise experimental selection of test conditions using different test microorganisms in order to determine a combination of several methods for neutralization of residual amounts of antibiotics which helps to reduce costs, given that satisfactory results may be obtained at any stage depending on the nature of an antibiotic drug. The article explicitly substantiates all stages involved in determination of the completeness of membrane filters cleaning from residual amounts of antibiotics using the example of meropenem. Based on results of experiments test conditions were selected for meropenem products that ensured reliable results of sterility testing.

Key words: meropenem; sterility; membrane filtration; neutralization of antimicrobial activity; plan of action.

For citation: Kuleshova SI, Protsak SA, Lisunova SA, Romanyuk GYu, Semenova EN. Plan of action for carbapenem antibiotics sterility testing. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2017; 7(3): 251–255.

REFERENCES

1. United States Pharmacopoeia. 39th ed. USP 39-NF 34; 2016.
2. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
3. Sakhno NG, Gunar OV. Biomedical cell products. Microbial contaminants and methods of sterility testing. *Biopharmaceutical Journal* 2016; 8(2): 19–28 (in Russian).
4. Gunar OV, Sakhno NG, Roschina MV. Specific features of determining sterility of various groups of solid drug preparations for parenteral administration. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2016; 50(1): 42–6 (in Russian).
5. Kuleshova SI, Protsak SA, Vilkova SI, Romanyuk GYu, Semenova EN. Sterility testing of antibiotic preparations. Validation of the method. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2012; (3): 8–10 (in Russian).
6. General monograph 1.2.4.0003.15. Sterility. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. Moscow; 2015 [Internet]. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Kuleshova SI. Head of the Laboratory of Antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Candidate of Biological Sciences.

Protsak SA. Chief expert of the Laboratory of Antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Lisunova SA. 1st professional category expert of the Laboratory of Antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Romanyuk GYu. 1st professional category expert of the Laboratory of Antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Semenova EN. 2nd professional category expert of the Laboratory of Antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

CONTACT E-MAIL

Kuleshova Svetlana Ivanovna; Kuleshova@expmed.ru