



О.В. Гунар

Практические аспекты учета и интерпретации результатов микробиологического анализа качества нестерильных лекарственных средств

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

РЕЗЮМЕ

Представлены материалы, касающиеся учета и интерпретации результатов микробиологического анализа качества лекарственных средств в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации и Фармакопеи Евразийского экономического союза. На примерах показано использование правил учета результатов и расчета количества аэробных микроорганизмов и микроскопических грибов на агаризованной питательной среде в чашках Петри и на мембранных фильтрах. Обсуждаются возможности и перспективы использования различных методов посева образцов и применения расчетных коэффициентов при интерпретации результатов. Рассмотрены подходы к повторному микробиологическому испытанию лекарственных средств в случае первичного выявления несоответствия, которое требует подтверждения для получения достоверного результата.

Ключевые слова: лекарственное средство; качество; микробиологическая чистота; учет результатов

Для цитирования: Гунар О.В. Практические аспекты учета и интерпретации результатов микробиологического анализа качества нестерильных лекарственных средств. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(3):236–240. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-3-236-240>

O.V. Gunar

Practical Aspects of Processing and Interpretation of the Results of Microbiological Analysis of the Quality of Non-Sterile Medicines

*Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation*

ABSTRACT

The article presents materials on processing and interpretation of the results of microbiological analysis of the quality of medicines in accordance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation and the Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union. It exemplifies the use of the rules for processing test results and counting aerobic microorganisms and microscopic fungi on agar culture media in Petri dishes and on membrane filters. The author discusses the possibility of and prospects for applying various sample inoculation methods, as well as using calculation factors when interpreting their results. The text covers approaches to repeating microbiological testing of medicines to verify the reliability of a non-compliant first result.

Key words: medicinal product; quality; microbiological quality; processing of results

For citation: Gunar O.V. Practical aspects of processing and interpretation of the results of microbiological analysis of the quality of non-sterile medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(3):236–240. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-3-236-240>

В Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) указано, что нестерильные лекарственные средства (ЛС), среди которых фармацевтические субстанции, лекарственные формы препаратов для внутреннего и наружного применения, не стерилизуемые в процессе производства (таблетки, капсулы, гранулы, суспензии, сиропы, мази, гели, суппозитории и др.), а также вспомогательные вещества могут быть контаминированы микроорганизмами¹. Согласно ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» в 1 г/мл указанных ЛС допускается некоторое лимитированное количество микроорганизмов при подтвержденном отсутствии жизнеспособных бактерий определенных видов, обоснованно представляющих высокую опасность для здоровья человека.

Под микробиологическим анализом ЛС мы понимаем совокупность лабораторных процедур, позволяющих получить качественную и количественную микробиологическую характеристику ЛС. Микробиологический анализ включает обширный комплекс лабораторных приемов, начиная от подготовки пробы и ее исследования в контролируемых условиях микробиологической лаборатории, заканчивая получением через фиксированный период инкубации необходимой информации о качестве испытуемого препарата. Важным завершающим этапом среди всего комплекса обозначенных мероприятий является процесс учета, расчетов и оценки полученных результатов, а также их адекватная интерпретация.

Применение правил расчета количества аэробных микроорганизмов и дрожжевых/плесневых грибов, выделяемых из ЛС, нами детально рассмотрено на примерах учета результатов количественного определения микроорганизмов после ежедневного просмотра посевов в течение установленного периода инкубации и окончательной фиксации результатов через 5–7 сут.

Для получения достоверных результатов были отобраны те чашки Петри с посевами, в которых число колоний бактерий не превышало

250, а колоний микроскопических грибов – 50. После посева образца ЛС методом мембранной фильтрации учет результатов проводили с использованием только тех чашек Петри, где число микроорганизмов на фильтрах не превышало 100 колоний, а грибов – 50 колоний. Если при учете результатов двух последующих разведений число колоний на чашках Петри находилось в указанных выше пределах, рассчитывали результаты из меньшего разведения. Если на чашках с питательной средой рост микроорганизмов отсутствовал, результаты отмечали следующим образом²:

- при посеве ЛС из разведения 1:10 – «в 1 г/мл образца менее 10 микроорганизмов (или грибов)»;
- при посеве ЛС в разведении 1:100 – «в 1 г/мл образца менее 100 микроорганизмов (или грибов)» и т.д.

При обнаружении роста микроорганизмов на чашках Петри выявленные единичные колонии фиксировали как микроорганизмы-контаминанты с учетом выполненного разведения образца. Например, на двух параллельных чашках Петри были обнаружены соответственно одна и две колонии плесневых грибов после посева образца из разведения в фосфатном буферном растворе 1:10 по 1 мл на чашку. После расчета получаем: $(2 + 1) / 2 \times 10 = 15$ колониеобразующих единиц в 1 г (КОЕ/г). При норме 10 КОЕ/г и с учетом коэффициента приемлемости 2 препарат соответствовал предъявляемым требованиям, а именно содержал не более 20 КОЕ/г.

Еще один пример учета результатов представлен в таблице 1.

Наиболее достоверным является результат, полученный при разведении образца 1:100, т.е. в 1 г ЛС обнаружено 4900 КОЕ аэробных микроорганизмов при норме с учетом коэффициента 2000, что недопустимо.

При отсутствии роста микроорганизмов на мембранных фильтрах (количество образца

¹ ОФС.1.2.4.0002.18. Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

² Там же.

Таблица 1. Учет результатов микробиологического анализа при различных разведениях испытуемого образца, подтверждающих брак**Table 1.** Processing of the microbiological analysis results obtained at various test sample dilutions and indicative of non-compliance

Разведение образца <i>Sample dilution</i>	Количество колоний, шт. <i>Number of colonies, pcs</i>	Результат испытания, КОЕ/г <i>Test result, CFU/g</i>	Соответствие требованиям <i>Compliance with the requirements</i>
1:10	Более 250 <i>More than 250</i>	Учет невозможен <i>Calculation is not possible</i>	–
1:100	48, 50	$(48 + 50) / 2 \times 100 = 4900$	Не соответствует <i>Not compliant</i>
1:1000	3, 5	$(3 + 5) / 2 \times 1000 = 4000$	Не соответствует <i>Not compliant</i>

Примечание. «–» – заключение о соответствии требованиям невозможно сделать, так как результат выходит за диапазон достоверного учета результатов.

Note. – It is impossible to draw a conclusion on compliance with the requirements, because the result is outside of the range for reliable calculations.

ЛС, профильтрованного через мембрану, составляло 1 г) результат записывали следующим образом: в 1 г образца микроорганизмы-контаминанты не обнаружены.

Если на питательной среде, предназначенной для выявления в основном бактериальной флоры (триптиказо-соевый агар, среда № 1), дополнительно были обнаружены колонии грибов, то их суммировали с числом выявленных бактерий, определяя и фиксируя в этом случае общее число аэробных микроорганизмов.

Количество микроорганизмов (N) в 1 г/мл, полученное чашечными агаровыми методами и мембранной фильтрацией, рассчитывали по формуле:

$$N = (\sum c) / n \times d \times 10, \quad (1)$$

где: $\sum c$ – количество колоний на всех чашках Петри; n – число чашек Петри; d – коэффициент разведения образца; 10 – коэффициент пересчета при проведении посева на чашку в объеме 0,1 мл (поверхностный метод посева).

Если объем образца, вносимого на чашку Петри, составлял 1,0 мл, то при расчете количества контаминантов в 1 г/мл коэффициент 10 в формуле (1) отсутствует.

В случае если при посеве 1,0 мл образца из разведения 1:100 (10^2) на двух чашках Петри выросло 168 и 215 колоний³, подставив полученные результаты в формулу (1), имеем следующее:

$$N = (168 + 215) / 2 \times 10^2 = 191,50 \times 10^2 = 1,9 \times 10^4.$$

Полученный результат округляли до 2 значащих цифр – 19000 и записывали как $1,9 \times 10^4$ КОЕ/г.

Число КОЕ используют в качестве единицы измерения количества микроорганизмов уже более 100 лет. В настоящее время такая аббревиатура продолжает оставаться актуальной во всех действующих фармакопеях мира, включая ГФ РФ. Однако важно помнить, что КОЕ всегда являлась лишь оценочной характеристикой числа микроорганизмов, присутствующих в образцах, а не их точным подсчетом. Концептуализация КОЕ в качестве применяемой аббревиатуры для учета колоний требует понимания процесса культивирования бактерий, дрожжевых или плесневых грибов на твердой питательной среде, а также знания всех условий, необходимых для получения одной дискретной колонии, поддающейся счету. Теоретически возможно, чтобы каждая жизнеспособная клетка выступала в качестве источника КОЕ, но на практике маловероятно, чтобы одна-единственная клетка привела к росту колонии в чашке. Ведь жизнеспособность клетки связана с ее размножением простым делением для образования колонии. Для чего необходим ряд условий, среди которых определенная питательная среда, правила инкубации, время и др. Однако в реальности отдельные клетки встречаются редко, поэтому колония, вырастающая на твердой питательной среде, как правило, происходит из скопления (множества) клеток, собранных вместе. Поэтому сигнал, основанный на КОЕ, имеет тенденцию занижать фактическое количество клеток, присутствующих в образце. Степень занижения результата может варьировать в зависимости от природы микроорганизма и способа подготовки образца. Ведь большинство микроорганизмов, присутствующих в ЛС, испытывают значительное

³ ОФС.1.2.4.0002.18. Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018. ОФС 2.1.6.6. Микробиологические испытания нестерильных лекарственных средств: общее количество аэробных микроорганизмов. Фармакопея Евразийского экономического союза. 2020.

стрессовое воздействие в сухой, лишенной питательных элементов среде, при повышенной температуре, высоких значениях ионной силы, крайних показателях pH или в возможном присутствии противомикробных веществ, поэтому их выделение бывает сложно или даже невозможно осуществить. Очевидно, данные стрессовые факторы играют определенную роль в искажении результатов чашечного метода.

Именно для снижения ложных, заниженных результатов предложены варианты чашечного агарового метода (глубинный, двухслойный и глубинный модифицированный), которые целесообразно использовать при испытании различных лекарственных форм независимо от уровня микробной загрязненности. Поверхностный чашечный агаровый метод предпочтительнее использовать при испытании ЛС с объективно высоким уровнем микробной контаминации, например лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Для сокращения сроков получения результатов количественного определения микроорганизмов, колонии которых склонны к сливному росту, используют модифицированный глубинный агаровый метод посева⁴.

Метод мембранной фильтрации для микробиологического анализа применяют только для тех ЛС, которые растворимы в воде и водных разбавителях. Целесообразно использование метода мембранной фильтрации для препаратов, расфасованных в большие емкости (более 100 мл), а также обладающих антимикробным действием, для нейтрализации которого необходима промывка значительным количеством (не более 500 мл) промывных жидкостей.

Метод наиболее вероятных чисел (НВЧ) используется для количественного определения микроорганизмов-контаминантов в ЛС с низким уровнем контаминации, а главное — в том случае, если другие методы не дают достоверного результата. Принято считать, что метод НВЧ менее точен и недостаточно чувствителен, особенно при определении плесневых грибов, поэтому предпочтительнее применять этот метод только для подсчета аэробных бактерий по таблице, представленной в фармакопее⁵.

Для интерпретации результатов испытания в ГФ РФ, фармакопее ЕАЭС и в ведущих

зарубежных фармакопеях⁶ указаны цифровые коэффициенты приемлемости, используемые при оценке количественного содержания микроорганизмов-контаминантов в ЛС. Эти коэффициенты позволяют однозначно определить, когда контролируемый образец следует считать не соответствующим требованиям. Для лекарственных препаратов и субстанций всех категорий, за исключением категории 4 (лекарственные растительные препараты, ЛРП), результаты интерпретируют следующим образом:

- при норме 10 КОЕ в 1 г — максимально допустимое количество микроорганизмов = 20;
- при норме 10² КОЕ в 1 г — максимально допустимое количество микроорганизмов = 200;
- при норме 10³ КОЕ в 1 г — максимально допустимое количество микроорганизмов = 2000 и т.д.

В связи с тем что лекарственные растительные препараты, представляющие собой лекарственные растения или их части (листья, цветки, трава, плоды, семена, кора, корни, корневища и др.), и фармацевтические субстанции растительного происхождения являются неоднородными в отношении количества аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов, результаты микробиологического испытания интерпретируют следующим образом:

- при норме 10⁷ КОЕ в 1 г — максимально допустимое количество микроорганизмов = 5×10⁷;
- при норме 10⁴ КОЕ в 1 г — максимально допустимое количество микроорганизмов = 5×10⁴ и т.д.

Благодаря указанным коэффициентам приемлемости установление несоответствия ЛС приобрело более четкие формы в несколько облегченном формате, а именно: ЛС бракуется только в том случае, если выявленное количество микроорганизмов-контаминантов в 1 г/мл образца превышает допустимые пределы в 2 раза для ЛС на основе субстанций синтетического происхождения или в 5 раз для лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе.

Важным аспектом анализа качества ЛС по показателю «Микробиологическая чистота», особенно при подозрении на несоответствие, является этап повторения испытания. В ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» указано,

⁴ ОФС.1.2.4.0002.18. Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁵ Там же.

ОФС 2.1.6.6. Микробиологические испытания нестерильных лекарственных средств: общее количество аэробных микроорганизмов. Фармакопея Евразийского экономического союза. 2020.

United States Pharmacopeia. USP44-NF39. Rockville, MD; 2021.

European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

⁶ Там же.

что в случае выявления контаминации ЛС повторяют тот раздел испытания, результаты которого не соответствуют требованиям нормативной документации.

Главный вопрос при выполнении анализа ЛС по микробиологическим показателям возникает при первичном выявлении роста микроорганизмов на питательных средах, то есть микробиолог фиксирует видимые признаки микробного роста, а не химического взаимодействия испытуемого образца с питательной средой. В некоторых случаях такие признаки легко спутать. На жидких питательных средах могут быть обнаружены опалесценция, помутнение, осадок и др. На чашках Петри с посевами на твердых питательных средах обнаруживают колонии бактерий и (или) плесневых грибов, количество которых превышает предъявляемые нормативные требования.

Такая ситуация требует расследования причин ее возникновения, и возможно, в дальнейшем приведет к установлению брака препарата. В ГФ РФ причины возможного несоответствия рассматриваются в ОФС «Стерильность»⁷, тогда как перечисленные ниже ошибки полностью можно отнести и к анализу микробиологической чистоты ЛС. Когда результат первоначального испытания признан недействительным по причинам, не связанным с исследуемым образцом, необходимо подтвердить, что в ходе испытания были допущены одна или несколько из следующих ошибок:

- 1) получены неудовлетворительные результаты микробиологического мониторинга окружающей среды (воздушной среды, поверхностей и рук персонала и др.);
- 2) выявлены методические ошибки при поведении испытания;
- 3) обнаружен рост микроорганизмов при проверке стерильности растворителя/разбавителя («отрицательный» контроль);
- 4) используемые питательные среды нестерильны и (или) их ростовые свойства неудовлетворительны или не доказаны;

5) выявлены ошибки в ходе процесса стерилизации материалов.

При выявлении хотя бы одного из перечисленных недочетов испытание ЛС повторяют на удвоенном количестве образцов препарата. Однако если речь идет о количественном определении микроорганизмов-контаминантов, содержание которых в том или ином ЛС регламентировано, необходимо, чтобы результаты находились в ранее обсуждаемом диапазоне применяемой методики (например, не более 250 колоний аэробных микроорганизмов на чашке Петри). При превышении указанных пределов и невозможности достоверного учета результатов необходимо повторить испытание с дополнительным разведением испытуемого образца.

Таким образом, использование рассмотренных правил учета результатов микробиологического испытания качества ЛС позволит получить достоверную оценку, однозначную трактовку, а также более стандартизовано подойти к расчетам и оформлению полученных данных.

При выборе критериев для интерпретации результатов микробиологического испытания ЛС и установлении несоответствия испытуемого образца следует использовать гармонизированные с требованиями ведущих фармакопей коэффициенты приемлемости. ЛС бракуется только в том случае, если выявленное количество микроорганизмов-контаминантов в 1 г/мл образца превышает допустимые пределы в 2 раза для ЛС на основе субстанций синтетического происхождения или в 5 раз для лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе.

При первичном обнаружении несоответствия образца предъявляемым требованиям необходимо выявить причины и документально подтвердить те из них, которые не связаны с испытуемым объектом. Повторение анализа проводится при подтверждении брака, а также в том случае, когда превышен диапазон определения применяемой методики.

По всем вопросам просим пользоваться формой обратной связи, размещенной на сайте <https://www.regmed.ru/feedback.aspx>

ОБ АВТОРЕ / AUTHOR

Гунар Ольга Викторовна, начальник лаборатории микробиологии, д-р фарм. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4825-8356>

Olga V. Gunar, Head of the Microbiology Laboratory, Dr. Sci. (Pharm.).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4825-8356>

⁷ ОФС.1.2.4.0003.15. Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.