

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение эффективности

ОФС.1.2.4.0011.15

антимикробных

консервантов

ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0069-07

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения эффективности антимикробных консервантов, входящих в состав лекарственных препаратов (ЛП).

Антимикробные консерванты – это вещества органической или неорганической природы, обладающие антимикробным действием, которые добавляют в ЛП для предотвращения роста и развития микроорганизмов, которые могут попасть в них в процессе производства или при многократном применении. Эффективная концентрация консерванта в готовом ЛП должна быть ниже дозы, токсичной для человека.

Эффективность антимикробных консервантов – это способность вещества ингибировать рост микроорганизмов в ЛП на протяжении срока годности. Испытание эффективности консервантов – это процедура, состоящая из искусственной контаминации образца ЛП суспензиями определенных тест-микроорганизмов, инкубации контаминированных образцов при определенной температуре, отбора проб через указанные интервалы времени и подсчете жизнеспособных клеток микроорганизмов в 1г (мл) ЛП на протяжении периода испытания, расчетов и оценке полученных результатов.

ЛП, в состав которых входят консерванты, разделены на три категории, представленные в табл. 1.

Таблица 1 – Категории ЛП, содержащие консерванты

Категория	Лекарственные препараты
1	Стерильные ЛП (парентеральные; препараты для местного применения, офтальмологические ЛП)
2	Нестерильные ЛП, применяемые местно, для введения в полость носа, в том числе и на слизистые оболочки
3	ЛП для приема внутрь, включая антацидные, водорастворимые или приготовленные на водной основе

Недопустимо вносить консерванты в ЛП для внутривидовых, внутрисердечных, внутриглазных инъекций, имеющих доступ к спинномозговой жидкости, а также при разовой дозе, превышающей 15 мл.

1. Используемые тест-штаммы микроорганизмов и работа с ними

Эффективность консервантов определяют в отношении определенных видов бактерий и дрожжевых и плесневых грибов:

Escherichia coli ГКМП 240533, АТСС 25922, АТСС 8739,

Pseudomonas aeruginosa ГКМП 190155, АТСС 9027,

Staphylococcus aureus ГКМП 201108, АТСС 6538,

Candida albicans ГКМП 303903, ГКМП 303901,

АТСС 10231, NCTC 885-653,

Aspergillus brasiliensis ВКМ F-3882, АТСС 16404, ВКМ F-1119, АТСС 9642.

Примечания.

1. Кроме перечисленных тест-штаммов можно использовать и другие микроорганизмы, которые должны быть типичными по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам.

2. Набор тест-штаммов микроорганизмов может быть уменьшен или увеличен в зависимости от способа применения или состава испытуемого ЛП.

Все тест-штаммы микроорганизмов, полученные из Государственных коллекций с сертификатом производителя в ампулах, на дисках или в другом виде следует восстанавливать способами, описанными в прилагаемых к тест-штаммам инструкциях или в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота». Культуры бактерий и грибов пересевают, делая не более 5 пассажей. Условия культивирования тест-штаммов для приготовления инокулята

представлены в табл. 2. Используемые питательные среды представлены в ОФС «Микробиологическая чистота».

Таблица 2 – Условия культивирования тест-микроорганизмов для приготовления инокулята

Тест-штамм	Питательная среда	Условия инкубации посевов	
		температура	время
- <i>Escherichia coli</i> ГКМП 240533, ATCC 25922, ATCC 8739 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ГКМП 190155, ATCC 9027 - <i>Staphylococcus aureus</i> ГКМП 201108, ATCC 6538	Соево-казеиновый агар или среда № 1 Соево-казеиновый бульон или среда № 8	32,5 ± 2,5 °С	18 – 24 ч
- <i>Candida albicans</i> ГКМП 303903, ГКМП 303901, ATCC 10231, NCTC 885-653	Агар Сабуро с глюкозой или среда № 2, жидкая среда Сабуро или соево-казеиновый бульон	22,5 ± 2,5 °С	48 ч
- <i>Aspergillus brasiliensis</i> ВКМ F-3882, ATCC 16404, ВКМ F-1119, ATCC 9642	Агар Сабуро с глюкозой или среда № 2	22,5 ± 2,5 °С	6 – 10 сут
Примечание. Допускается использование альтернативных жидких и агаризованных питательных сред отечественного и зарубежного производства			

Контроль ростовых свойств используемых питательных сред проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

При приготовлении инокулята суточные культуры тест-штаммов бактерий и *C.albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида. Концентрацию клеток бактерий доводят до 10⁹ КОЕ/мл, а *C.albicans* – до 10⁷ КОЕ/мл, используя стандартный образец мутности или инструментальные методы, в том числе турбидиметрический. В случае использования жидких питательных сред для культивирования тест-штаммов, клетки бактерий и *C.albicans* выделяют центрифугированием,

промывают и ресуспендируют стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации $1 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл.

Для смыва конидий *A. brasiliensis* используют стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида, содержащий 0,05 % раствор твина-80. Количество конидий *A. brasiliensis* в 1 мл смыва определяют с помощью камеры Горяева или чашечным агаровым методом. Полученную взвесь разводят до концентрации 10^7 конидий в 1мл.

Стандартизованные суспензии всех тест-штаммов микроорганизмов разводят до концентрации $10^7 - 10^8$ КОЕ/мл.

2. Методика испытания

Для определения эффективности консервантов используют готовые ЛПП в неповрежденной упаковке.

В каждый стерильный флакон с исследуемым препаратом вносят суспензию, содержащую один из тест-штаммов микроорганизмов, обеспечивая концентрацию клеток $10^5 - 10^6$ КОЕ в 1 мл или 1 г ЛПП, и перемешивают. Объем инокулята должен составлять 0,5 – 1 % от объема образца.

Образцы ЛПП на твердой мазевой основе нагревают до температуры ($42,5 \pm 2,5$) °С. Смешивают инокулят каждой стандартизованной микробной суспензии с образцом ЛПП в течение не менее 1 мин до достижения гомогенной эмульсии. Для улучшения смешивания можно добавить определенное (валидированное) количество стерильного поверхностно-активного вещества, например, твина-80, если оно не влияет на жизнеспособность микроорганизмов или на эффективность консерванта.

Фактическую исходную концентрацию бактерий и грибов в контаминированных образцах определяют сразу после контаминации. Для этого чашечным агаровым методом делают посев на соответствующие питательные среды (табл. 2), используя подходящие разведения для получения на чашке от 30 до 300 колоний бактерий и от 10 до 100 колоний грибов. Для этой цели также можно применять метод мембранной фильтрации (при условии растворимости ЛПП в водных растворителях или изопропилмиристате).

Контаминированные образцы ЛП выдерживают при температуре $(22,5 \pm 2,5)$ °С в защищенном от света месте в течение определенного времени. Через 7, 14, 28 сут после инокуляции образцов препаратов 1 категории и через 14, 28 сут препаратов 2 и 3 категорий определяют количество жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл образца, делая высев на чашки Петри глубинным или модифицированным глубинным методами в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Антимикробное действие ЛП устраняют одним из способов: разведением, мембранной фильтрацией или с помощью инактиватора, который вносят в чашки с питательной средой или в соответствующее разведение лекарственного средства перед посевом. Используемые инактиваторы, некоторые из которых указаны в ОФС «Микробиологическая чистота», не должны влиять на жизнеспособность микроорганизмов.

3. Результаты испытания и их интерпретация

Чашечным агаровым методом определяют количество КОЕ/мл для каждого тест-штамма через указанные выше сроки инкубации контаминированного образца ЛП. Изменение количества микробных клеток по сравнению с исходной концентрацией в 1 мл выражают в десятичных логарифмах (lg). При оценке эффективности антимикробного действия консервантов увеличение КОЕ/мл не фиксируется, если последующее измерение превышает предыдущее менее, чем $0,5 \lg$ КОЕ.

4. Требования к качеству

Консерванты считают эффективными, если наблюдают уменьшение количества клеток бактерий в соответствии с критериями, описанными в табл. 3. Количество клеток дрожжевых и плесневых грибов не должно увеличиваться на протяжении всего срока исследования.

Таблица 3 – Критерии оценки эффективности антимикробных консервантов ЛП

Категория ЛП	Уменьшение количества клеток бактерий, lg	Уменьшение количества клеток дрожжевых и плесневых грибов, lg
--------------	---	---

	7 сут.	14 сут.	28 сут.	7 сут.	14 сут.	28 сут.
1	Не менее 1	Не менее 3	Не должно быть увеличения*	Не должно быть увеличения*		
2	-	Не менее 2		-	Не должно быть увеличения*	
3	-	Не менее 1		-	Не должно быть увеличения*	
Примечание. * Не должно быть увеличения количества клеток бактерий, дрожжевых и плесневых грибов по сравнению с предыдущим результатом						