

Ocena możliwości zastosowania aparatu DeltaTox® do badań czystości mikrobiologicznej produktów leczniczych

Jadwiga Marczevska, Jolanta Krzysztoń-Russjan, Ewa Karwicka

Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowy Instytut Leków, Warszawa

Adres do korespondencji: Jadwiga Marczevska, Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, tel. 022 841 39 91 wew. 304, faks 022 841 06 52, e-mail: jagodazlw@il.waw.pl

Metody mikrobiologiczne, opisane w Farmakopei Polskiej oraz innych obowiązujących w innych krajach urzędowych spisach leków, stosowane do oceny ilościowej oraz identyfikacji zanieczyszczeń mikrobiologicznych produktów leczniczych oraz środowiska ich wytwarzania są długotrwałe, a wyniki nie są dostępne przed upływem okresu inkubacji, który zwykle wynosi do 14 dni.

Do badań czystości mikrobiologicznej produktów leczniczych poszukiwane są alternatywne metody o wysokiej wiarygodności, czułości i gwarantujące uzyskanie rzetelnego wyniku w krótkim czasie.

Wprowadzenie alternatywnych metod badań do oceny czystości mikrobiologicznej produktów leczniczych i środowiska wytwarzania może mieć wpływ na obniżenie kosztów badania, poprawę systemu zapewnienia jakości produktów farmaceutycznych, ale przede wszystkim na skrócenie czasu oczekiwania na wynik. Stosowanie niektórych metod alternatywnych pozwala na uzyskanie wyników badań produktów leczniczych w czasie rzeczywistym lub prawie rzeczywistym, co potencjalnie może być podstawą do podjęcia wcześniejszych działań korygujących, jak również zmniejszać okres oczekiwania na zwolnienie do obrotu.

Metody alternatywne mogą być wykorzystane do trzech typów oznaczeń, specyficznych dla badań mikrobiologicznych, obejmujących: badania jakościowe dotyczące obecności lub braku określonych drobnoustrojów, badania ilościowe występujących drobnoustrojów oraz identyfikacyjne. Metody te mogą być stosowane jako bezpośrednie lub pośrednie metody wykrywania mikroorganizmów.

Jedną z alternatywnych metod oznaczania mikroorganizmów jest metoda pomiaru bioluminescencji oparta na zaproponowanym przez Chapelle i Lenin

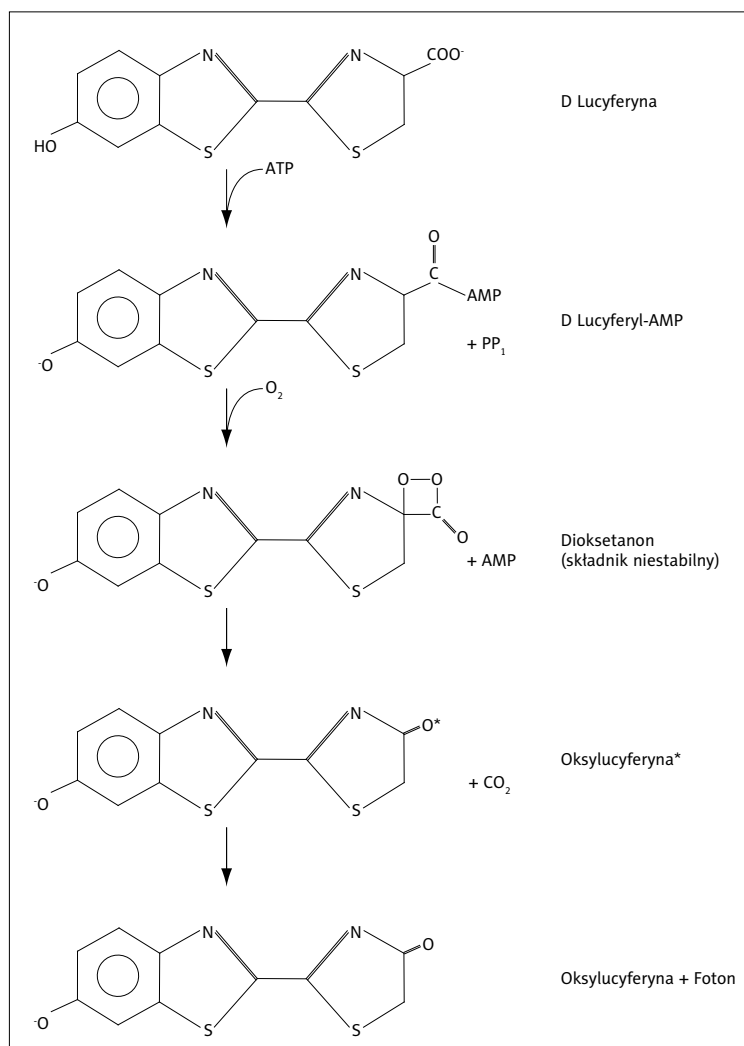
Possibility of application of DeltaTox® analyzer for evaluation of microbiological contamination of medicinal products

Quantitative and qualitative methods applied for evaluation of microbiological contamination described in the European Pharmacopeia are time-consuming due to the incubation period, which lasts usually up to 14 days. One of the alternative methods used for evaluation of microbiological contamination is the method based on luciferin-luciferase light producing reaction proposed by Chapelle and Lenin. This reaction requires ATP (adenosine triphosphate) present in every living cell. The intensity of bioluminescence measured is directly proportional to ATP amount in the system and it can be easily recalculated into biomass amount. The aim of the study was to evaluate the possibility of the DeltaTox® analyzer application for quantification of microorganisms in medicinal products samples. The DeltaTox® instrument was designed for rapid quantification of total viable biomass present in water and for toxicity testing. Using the DeltaTox® analyzer you can achieve a quick response in chemical or microbiological contamination of drinking water tests.

Keywords: luciferin, bioluminescence, ATP, DeltaTox®.

© Farm Pol, 2009, 65(12): 829-833

systemie wykorzystującym reakcję lucyferyna/lucyferaza, jako szybką metodę detekcji i oznaczania ilościowego mikroorganizmów [1]. Zjawisko bioluminescencji występuje w systemach biologicznych, których funkcjonowanie uwalnia energię w formie fotonów światła. Zjawisko to następuje na skutek naturalnych reakcji enzymatycznych zachodzących w różnych organizmach żywych. Badania biochemiczne [2, 3] systemów bioluminescencji wykazały, że emisja światła wynika z aktywacji systemu lucyferyna/lucyferaza (**rycina 1**). Emitowane światło



Rycina 1. Schemat aktywacji systemu lucyferyna/lucyferaza

Celem naszych badań była ocena możliwości zastosowania analizatora DeltaTox® do określenia ilości drobnoustrojów zawartych w badanych próbkach produktów leczniczych. System ten został zaprojektowany do oceny ilości żywej biomasy w wodzie pitnej i ściekach oraz do badania toksyczności.

Stosując DeltaTox® można otrzymać szybką odpowiedź w badaniach jakości wody pod kątem skażenia chemicznego i mikrobiologicznego, w sytuacji stanowiącej zagrożenie dla wód pitnych.

wyrażone jest we względnych jednostkach światła (RLU) (ang. *relative light unit*). Poziom bioluminescencji jest wprost proporcjonalny do ilości ATP (adenozynotrójfosforan) zawartego w systemie. ATP obecne jest we wszystkich żywych komórkach. Przeciętna zawartość ATP w komórkach bakterii stanowi 1 femtogram (fg), tj. 10^{-15} g, ale w zależności od stanu fizjologicznego zawartość ATP bakterii może się wahać w granicach od 1–10 fg. Drożdże i pleśnie zawierają około 100 fg, zaś komórki somatyczne eukariotyczne 1000 fg [4]. ATP jest dobrym markerem żywych komórek, gdyż po ich śmierci jest rozkładany przez enzymy ATP-azy [4]. Ilościowe oznaczenie ATP może umożliwić szybką ocenę obecności mikroorganizmów w danym produkcie lub na danej powierzchni [5].

Celem naszych badań była ocena możliwości wykorzystania analizatora DeltaTox® do ilościowego określenia drobnoustrojów zawartych w badanych próbkach produktów leczniczych. System ten został zaprojektowany do oceny ilości żywej biomasy oraz badania toksyczności. Używając urządzenia DeltaTox® można uzyskać szybką odpowiedź w badaniach jakości wody pod kątem skażenia chemicznego i mikrobiologicznego w sytuacji stanowiącej zagrożenie dla wód pitnych. Pomiar zanieczyszczenia mikrobiologicznego polega na pomiarze światła emitowanego w wyniku reakcji bioluminescencji lucyferyna/lucyferaza. Reakcja ta wymaga ATP obecnego w każdej żywej komórce. Ilość ATP jest wprost proporcjonalna do ilości biomasy w próbce. Ilość światła powstająca w wyniku reakcji może być dokładnie zmierzona przy użyciu analizatora DeltaTox®, a następnie przeliczona na ilość biomasy w próbce.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538,
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,
- *Escherichia coli* ATCC 8739,
- *Candida albicans* ATCC 16404,
- *Salmonella typhimurium* CIP 108115 (TA97).

Podłoża hodowlane

Do hodowli szczepów: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* stosowano podłoża zgodnie z wymaganiami zamieszczonymi w Farmakopei Polskiej (FP) rozdział 2.6.12., 2.6.13.

Do hodowli *S. typhimurium* użyto podłoża bulionowego o składzie zaproponowanym przez Maron i Ames [6].

0,9% roztwór soli fizjologicznej do wykonania rozcieńczeń zawiesin mikroorganizmów.

Urządzenia

Komora laminarna, ciepłarki, analizator DeltaTox®, licznik koloni bakterii.

Przygotowanie prób do badań i przebieg oznaczenia

Z 18 godzinnych hodowli każdego badanego drobnoustroju przygotowano niezależne zawiesiny:

- bakterii (o gęstości 0,5 w skali McFarlanda lub $OD_{625} = 0,1$), zawierające 10^8 CFU/ml (ang. *Colony Forming Unit* – jednostki tworzące kolonie),
- drożdży *C. albicans* (zawiesinę o gęstości 0,5 w skali McFarlanda lub $OD_{625} = 0,23$), zawierającą 10^6 CFU/ml [7, 8],
- mieszaninę zawiesin stosowanych szczepów bakterii, zmieszanych w równych proporcjach,

- mieszaninę zawiesin stosowanych bakterii i drożdży *C. albicans*, zmieszanych w równych proporcjach.

Z każdej zawiesiny szczepu przygotowano rozcieńczenia w soli fizjologicznej, aby uzyskać inokulum o gęstości 10^5 , 10^4 , 10^3 i 10^2 CFU/ml.

Ilościowe oznaczenie mikroorganizmów wykonano metodą posiewu bezpośredniego. Wysiano na 3 osobne płytki po 0,1 ml zawiesiny mikroorganizmów w określonym rozcieńczeniu. Po 24 godz. inkubacji liczono wyrosłe na płytkach kolonie i obliczono średnią liczbę kolonii na płytce w określonym rozcieńczeniu.

W ten sam sposób przygotowano próby produktu leczniczego zawierające zawiesinę mieszaniny szczepów bakteryjnych w odpowiednim rozcieńczeniu, z lub bez zawiesiny komórek *C. albicans* w odpowiednim rozcieńczeniu.

Przeprowadzono badanie zawartości ATP w jałowym produkcie leczniczym i nadkażonym zawiesiną badanych mikroorganizmów.

Do oznaczenia zawartości ATP w badanych próbach wybrano zawiesiny szczepów mikroorganizmów o gęstości od 10^4 , 10^3 i 10^2 CFU/ml. Pomiar ATP w zawiesinach przygotowanych do posiewu przeprowadzono równoległe z wykonaniem posiewu metodą tradycyjną. Wykonywano trzy pomiary zawartości ATP i obliczano średnią dla danego rozcieńczenia. Wybór rozcieńczenia inokulum do badań zawartości ATP był podyktowany wymaganiami FP dotyczącymi dopuszczalnej maksymalnej liczby mikroorganizmów zawartych w 1 g lub 1 ml gotowego produktu leczniczego. Zgodnie z wymaganiami FP dopuszczalna maksymalna liczba zanieczyszczeń mikrobiologicznych w produktach leczniczych Kategorii 3 wynosi 10^3 lub 10^4 drobnoustrojów tlenowych w 1 g lub 1 ml i nie więcej niż 10^2 grzybów w 1 g lub w 1 ml.

W badanych próbach wykonano pomiar ATP zgodnie z instrukcją producenta aparatu DeltaTox®. Na podstawie oznaczonego ATP obliczono zawartość biomasy w badanych próbkach wg wzoru zaproponowanego przez wytwórcę analizatora:

$$x = 10^{\frac{\log y - \log 350,99}{0,6866}}$$

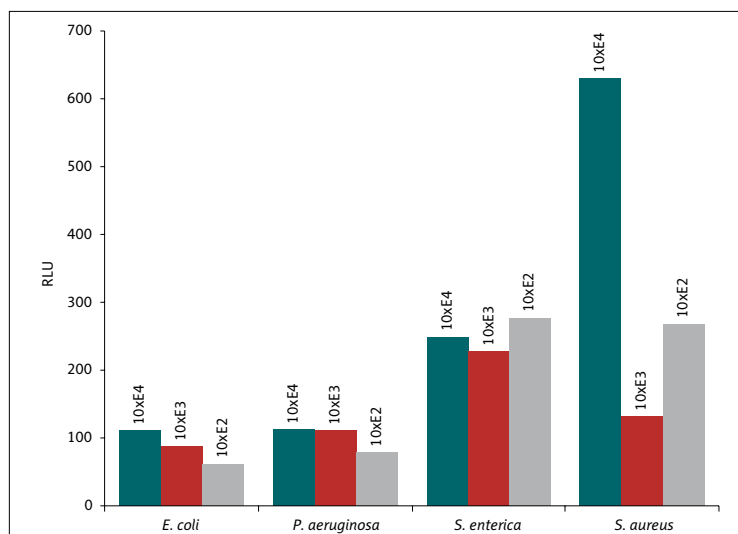
x – biomasa w pikogramach,
y – odczyt RLU z analizatora DeltaTox®.

Omówienie wyników

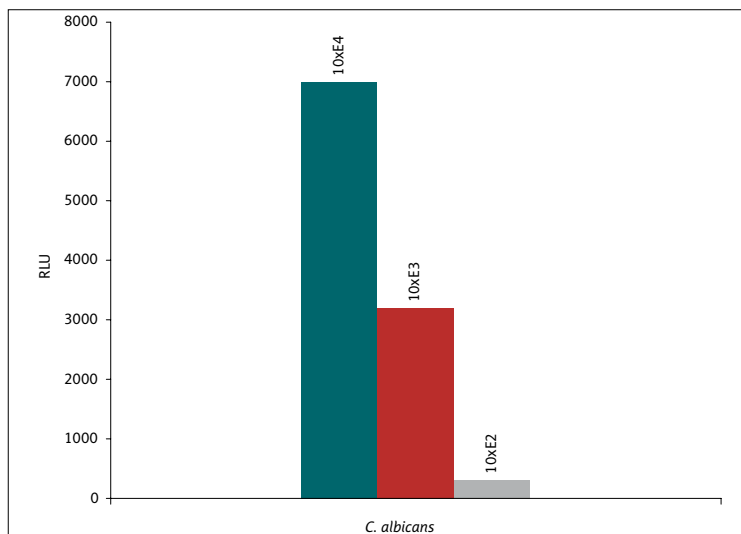
W przeprowadzonych badaniach podjęto próbę zastosowania analizatora DeltaTox® do oceny czystości mikrobiologicznej produktów leczniczych. W urzędzeniu wykorzystano reakcję bioluminescencji systemu lucyferyna /lucyferaza do oznaczania zawartości ATP w próbach zawierających zawiesinę pojedynczych szczepów bakterii, drożdży lub ich mieszaninę oraz

Tabela 1. Określenie liczby CFU/ml stosowanych szczepów i odpowiadającej zawartości biomasy

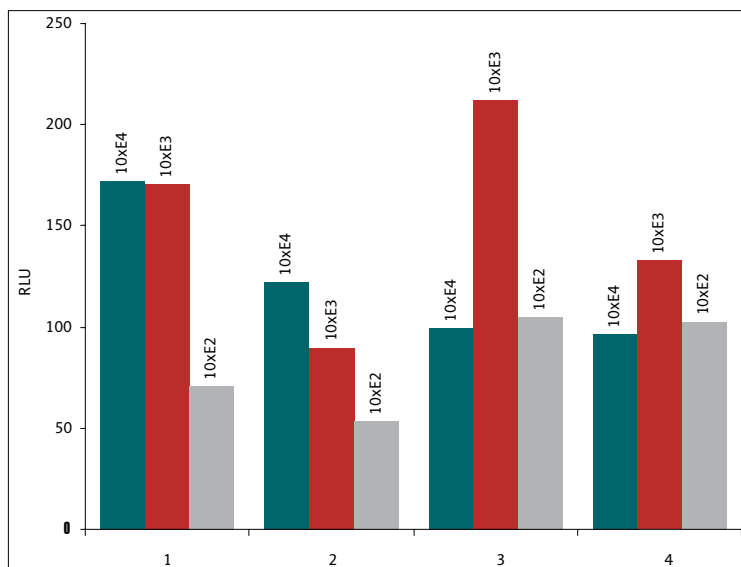
Badana próba	Rozcieńczenie	Liczba CFU/ml	Biomasa (fg)
<i>Escherichia coli</i>	10^4	995	185
	10^3	103	131
	10^2	12	80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10^4	483	189
	10^3	73	187
	10^2	6	112
<i>Salmonella typhimurium</i>	10^4	808	607
	10^3	65	530
	10^2	5	704
<i>Staphylococcus aureus</i>	10^4	2095	2339
	10^3	473	241
	10^2	43	675
<i>Candida albicans</i>	10^4	1846	78100
	10^3	302	25048
	10^2	40	858
Mieszanina drobnoustrojów bez <i>Candida albicans</i>	10^4	287	354
	10^3	29	351
	10^2	2	98
Mieszanina drobnoustrojów z <i>Candida albicans</i>	10^4	256	215
	10^3	32	137
	10^2	4	67
Produkt leczniczy + Mieszanina drobnoustrojów bez <i>Candida albicans</i>	10^4	328	161
	10^3	53	480
	10^2	5	172
Produkt leczniczy + Mieszanina drobnoustrojów z <i>Candida albicans</i>	10^4	360	154
	10^3	84	243
	10^2	5	168
Produkt leczniczy	-	brak wzrostu	118
H ₂ O	-	Jałowa – brak wzrostu	204



Rycina 2. Zależność RLU od rozcieńczenia inokulum szczepów *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *S. aureus*



Rycina 3. Zależność RLU od rozcieńczenia inokulum *C. albicans*



Rycina 4. Zależność RLU od rozcieńczenia inokulum oznaczonego jako: 1 – mieszanina bakterii; 2 – mieszanina bakterii i drożdży; 3 – badany produkt leczniczy nadkażony zawiesiną bakterii; 4 – badany produkt leczniczy nadkażony mieszaniną bakterii i drożdży

do oznaczania próbek produktu leczniczego nadkażonego mieszaniną bakterii i drożdży.

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1 oraz na rycinach 2–4.

W tabeli 1 przedstawiono wyniki posiewu, liczby CFU/ml, każdego drobnoustroju, mieszaniny drobnoustrojów, produktu leczniczego bez mikroorganizmów oraz produktu leczniczego zawierającego mieszaninę wszystkich badanych drobnoustrojów w rozcieńczeniu 10⁴, 10³ i 10², uzyskanych metodą tradycyjną, metodą bezpośredniego posiewu oraz odpowiadającą tym rozcieńczeniom zawartość biomasy. W tych samych próbach zmierzono zawartość ATP przy zastosowaniu urządzenia DeltaTox®. Wyniki przedstawiono na rycinach 2–4.

Wyniki przedstawione w tabeli świadczą o poprawności wykonania badania określenia liczby kolonii drobnoustrojów w rozcieńczeniach 10⁴, 10³ i 10² metodą bezpośredniego posiewu. Uzyskano dziesięciokrotną redukcję liczby kolonii w kolejnych rozcieńczeniach. Stwierdzono brak korelacji pomiędzy liczbą komórek a zawartością biomasy w danym rozcieńczeniu. Uzyskane wyniki nie wykazują proporcjonalnej redukcji zawartości biomasy zależnej od liczby komórek zawartych w badanej próbce. Dla szczepu *S. typhimurium* uzyskano w rozcieńczeniach 10⁴, 10³, 10² odpowiednio 808, 65, i 5 CFU/ml, a odpowiadająca wielkość biomasy wyniosła 607, 530 i 704 fg.

Ryciny 2 i 3 zawierają wyniki pomiaru ATP w hodowlach mikroorganizmów, w kolejnych rozcieńczeniach. Zaobserwowano zależność pomiędzy zawartością ATP a liczbą komórek w hodowli *E. coli* i *C. albicans*. W rozcieńczeniu 10⁴, 10³ i 10² średnia zawartość ATP wynosiła odpowiednio 110, 87 i 62 dla *E. coli* i 6995, 3204, 316 dla *C. albicans*. Uzyskano wartość pomiaru ATP prawie na takim samym poziomie (249, 227, 276) dla całego zakresu rozcieńczeń hodowli szczepu *S. typhimurium*, pomimo różnic liczby komórek bakterii w hodowli. Brak korelacji pomiędzy zawartością ATP a liczbą komórek bakterii zaobserwowano również dla szczepu *P. aeruginosa*. Zawartość ATP określono na poziomie 112, 111 i 78 RLU w hodowli zawierającej 483, 73 i 6 CFU/ml. Wyniki zamieszczone na rycinie 2 wskazują na brak korelacji pomiędzy gęstością zawiesiny komórek a zawartością ATP w zawieszynie hodowli szczepu *S. aureus*. Pomiar światła w hodowlach 10⁴, 10³ i 10² wyniósł odpowiednio 629, 162, 268 RLU.

W doświadczeniach, w których badano mieszaninę drobnoustrojów, jak również mieszaninę drobnoustrojów zawieszonych w produkcie leczniczym, jedynie w próbach zawierających mieszaninę bakterii i drożdży zaobserwowano korelację pomiędzy liczbą komórek w hodowli a wartością RLU, która wynosi odpowiednio 122, 90 i 54. W próbach zawierających jedynie mieszaninę bakterii stwierdzono zawartość ATP na poziomie 172, 171 i 71 RLU. Uzyskano porównywalne wyniki pomiaru intensywności bioluminescencji (100 i 105 oraz 97 i 103 RLU) w próbach zawierających badany produkt oraz mieszaninę bakterii i w próbach zawierających produkt leczniczy, mieszaninę bakterii i drożdży w rozcieńczeniach 10⁴ i 10². Poziom ATP w tych hodowlach w rozcieńczeniu 10³ wynosi odpowiednio 212 i 133. Stwierdzono zawartość ATP w jałowym produkcie leczniczym na poziomie 81 RLU, zaś w próbkach wody stosowanej do rozcieńczeń na poziomie 118 RLU.

Uzyskane wyniki wskazują na brak możliwości zastosowania analizatora DeltaTox® do ilościowego określenia drobnoustrojów zawartych w badanych próbkach produktów leczniczych ze względu na:

- niską czułość urządzenia dla oznaczania biomasy w stężeniach wymaganych dla czystości mikrobiologicznej produktu, tj. w zakresie 10^2 – 10^4 CFU/ml,
- fałszywie dodatnie wskazania zawartości ATP w próbkach jałowych (rozcieńczalnik, próbka produktu leczniczego),
- brak liniowej zależności odczytu pomiaru światła do gęstości komórek.

Otrzymano: 2009.09.09 · Zaakceptowano: 2009.09.25

Piśmiennictwo

1. Chapelle E.W., Lenin G.V.: Use of firefly bioluminescent reaction for rapid detection and counting bacteria. *Biochemical Medicin.* 1968, 2(1): 41–52.
2. McCapra F.: The chemistry of bioluminescences- In: *Bioluminescence in Action*, Peter J. Herring Academic Pres, London-New York-San Francisco, 1978 Chapter 2.
3. McElroy W.D., DeLuca M.: Chemistry of firefly luminescence – In: *Bioluminescence in Action*, Peter J. Herring Academic Pres, London-New York-San Francisco, 1978.
4. Raport komisji SFSTP Alternatywne metody kontroli mikrobiologicznej. Prezentacja szybkich technik. *Pharmaceutica.* 2000, 10: 2–18.
5. Campbell A.K. and Simpson J.S.A.: Chemi and bioluminescence as an analytical tool in biology. *Techniques in Metab. Res. B.* 1979, 213: 1–56.
6. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* 1983, 113: 173–215.
7. Rajvinder Atwal.: (2003) *In vitro* Antimicrobial Activity Assessment of Zymox Otic Solution Against a Broad Range of Microbial Organisms. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine.* 2003, 1(1): 3.
8. Wardle H.M., Law D., Moore C.B., Mason C.F., Dennig D.W.: In vitro activity of D0870 compared with those of other azoles against fluconazole-resistant *Candida spp.* *Antimicrob Agents Chemother.* 1995, 39(4): 868–71.