

Wanda Grzybowska¹, Stefan Tyski^{1,2}

Badanie mocy antybiotyków przy zastosowaniu metod mikrobiologicznych – przygotowanie farmakopealnych wzorców antybiotyków

Estimation of potency of antibiotics by means of microbiological methods – preparation of pharmacopoeial antibiotic modules

¹ Z Narodowego Instytutu Leków, Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Warszawa

^{1,2} Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawa

STRESZCZENIE

Wstęp i cel pracy: Produkty lecznicze zawierające antybiotyki stanowią ważną i złożoną grupę preparatów terapeutycznych. Jednym z najważniejszych parametrów jest oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej metodami mikrobiologicznymi, czyli określenie mocy antybiotyków. Wartość ta jest oznaczana w oparciu o odpowiednie wzorce. Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii Narodowego Instytutu Leków (NIL) w ramach międzylaboratoryjnych badań biegłości, od 2000 roku uczestniczy w wyznaczaniu mocy nowych farmakopealnych wzorców antybiotyków. Badania organizowane są przez Europejski Dyrektoriat ds. Jakości Leków (EDQM) – Komisję Farmakopei Europejskiej, a uzyskane wyniki są analizowane statystycznie i opracowywane w formie raportów.

Celem pracy było przedstawienie wyników badań dotyczących wyznaczania mocy wzorców antybiotyków.

Materiał i metody: Oznaczano moc substancji – kandydatów na wzorce, następujących antybiotyków: amfoterycyna B, bacytracyna cynkowa, dihydrostreptomycyna, erytromycyna, kolistyna siarczan, kolistymetat sodowy, nystatyna, polimyksyna B siarczan, ryfamycyna sodowa i spiramycyna. Moc antybiotyków oznaczana jest przez porównanie zahamowania wzrostu wrażliwych drobnoustrojów standardowych przez badany antybiotyk i substancję porównawczą w znanym stężeniu. W badaniach stosowano zalecane przez farmakopeę wrażliwe na badane antybiotyki drobnoustroje testowe z kolekcji ATCC. Moc antybiotyków określano przy zastosowaniu farmakopealnych metod mikrobiologicznych,

ABSTRACT

Introduction and objective: Medicinal products containing antibiotics constitute an important and complex group of therapeutic preparations. One of the most important parameters is estimating the antimicrobial activity by means of microbiological methods, or assessing the potency of antibiotics, with reference to proper standards. The Department of Antibiotics and Microbiology of the National Medicines Institute (NMI) has participated in inter-laboratory proficiency tests aimed at estimating the potency of new pharmacopoeial antibiotic modules since 2000. The tests are conducted by the European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) – European Pharmacopoeia Commission, and the results are analyzed and drawn up in report form. The aim of this paper is to present the results of estimating the potency of antibiotic modules.

Materials and methods: The potency of substances, prospective modules, of the following antibiotics was estimated: amphotericin B, bacitracin zinc, dihydrostreptomycin, erythromycin, colistin sulphate, colistimethate sodium, nystatin, polymyxin B sulphate, rifamycin sodium and spiramycin. The potency of antibiotics is estimated by comparing the inhibition of growth of sensitive standard micro-organisms produced by known concentrations of the examined antibiotic and a reference substance. The test micro-organisms sensitive to the examined antibiotics were recommended by pharmacopoeia and were supplied by the American Type Culture Collection

głównie metody dyfuzyjnej, a w przypadku oznaczania mocy ryfamycyny sodowej również metody turbidymetrycznej. Badania prowadzone były w sposób umożliwiający przeprowadzenie walidacji matematycznego modelu równania mocy.

Wyniki: Oznaczono moc mikrobiologiczną 14 substancji przyjętych następnie jako wzorce 10 różnych antybiotyków z bardzo dobrą precyzją: ± 1 odchylenie standardowe (tylko w 2 przypadkach ± 2 SD) od wartości średniej uzyskanej ze wszystkich laboratoriów biorących udział w badaniach biegłości. Wartość średnia została przyjęta przez EDQM jako oficjalna moc biologiczna dla danej serii wzorca.

Wnioski: Oznaczenia mocy różnorodnych antybiotyków w Zakładzie Antybiotyków i Mikrobiologii NIL, według akredytowanej metody farmakopealnej, przeprowadzane jest na bardzo wysokim poziomie, uznanym przez EDQM przyznaniem atestu.

Słowa kluczowe: CSP, wzorzec antybiotyków, moc antybiotyków, badania międzylaboratoryjne, metoda farmakopealna

Wstęp

Ocena jakości produktów leczniczych jest zagadnieniem złożonym. Stosowane są metody analityczne chemiczne i biologiczne, oparte o opracowania farmakopealne, a uzyskany wynik badania musi być zgodny ze specyfikacją produktu przygotowaną przez wytwórcę i zatwierdzoną przez Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych i Wyrobów Medycznych. Leki zawierające antybiotyki stanowią ważną i złożoną grupę preparatów farmaceutycznych, do analizy których stosuje się wiele metod chemicznych oraz mikrobiologicznych [1]. Jednym z najważniejszych parametrów jakości produktów leczniczych zawierających antybiotyki jest oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej metodami mikrobiologicznymi, czyli określenie mocy antybiotyków (zawartość substancji czynnej w 1 mg preparatu wyrażana jest w μg lub jednostkach aktywności). Podawanie mocy w jednostkach masy jest powszechne i wygodne, zwłaszcza w sytuacji, gdy wartości MIC (najmniejsze stężenie związku hamujące wzrost drobnoustrojów) oraz MBC (najmniejsze bakteriobójcze stężenie związku) wyrażane są w jednostkach: mg/l lub $\mu\text{g/ml}$. Niejednorodność substancji czynnych, np. makrolidów, polimyksyn, antybiotyków polienowych czy kolistyn sprawia, że ich moc jest często również wyrażana w jednostkach aktywności. Na naszym rynku znajduje się także szereg złożonych preparatów (zwłaszcza weterynaryjnych) zawierających 2, 3 lub nawet 4 antybiotyki. Oznaczenia zawartości tych związków czynnych prowadzi się za pomocą różnych metod chemicznych i mikrobiologicznych [2].

Badania aktywności antybiotyków w produktach leczniczych prowadzone są zgodnie z monografią 2.7.2. Farmakopei Polskiej (FP) – tożsamej z odpowiednią monografią Farmakopei Europejskiej (Ph. Eur.): „Mi-

(ATCC). The potency of antibiotics was estimated by means of pharmacopoeial microbiological methods, mainly a diffusion method, and a turbidimetric method in case of estimating the potency of rifamycin sodium. The examination was conducted in a way which permitted the validation of the mathematical model on which the power equation is based.

Results: The microbiological potency of 14 substances was determined. The substances were then accepted as modules of 10 different antibiotics with high precision: ± 1 standard deviation (SD) (in only two cases ± 2 SD) of the average value received from all laboratories taking part in proficiency tests. The average value was accepted by the EDQM as the official biological potency for a given module batch.

Conclusions: The estimation of the potency of a variety of antibiotics in the Department of Antibiotics and Microbiology of the NMI by means of an accredited pharmacopoeial method is a high-level scheme approved by the EDQM.

Key words: CSP, antibiotic module, the potency of antibiotics, inter-laboratory tests, pharmacopoeial method

Introduction

The estimation of quality of medicinal products is a complex issue. Analytical, chemical and biological methods, based on pharmacopoeial studies, are used, and the result of the examination has to comply with the product specification prepared by the producer and approved by the Office for Registration of Medicinal Products, Medical Devices and Biocidal Products. Medicines containing antibiotics constitute an important and complex group of pharmaceutical preparations, which are analysed by means of many chemical and microbiological methods [1]. One of the most important parameters of quality of medical products containing antibiotics is estimating the antimicrobial activity by means of microbiological methods, that is assessing the potency of antibiotics (active ingredient content in one mg of preparation is given in μg or in International Units (IU)). Giving the potency in mass units is common and convenient, especially when the values of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) are given in units: mg/a or $\mu\text{g/ml}$. Heterogeneity of active ingredients, e.g. macrolides, polymyxin, polyene antibiotics and colistin, is the reason why the potency is often presented in IU. There are other complex preparations on the market (especially veterinary ones) containing two, three or even four antibiotics. A variety of chemical and microbiological methods is used to estimate the content of active compounds in antibiotics [2].

The examination of antibiotic activity in medical products is conducted in accordance with the monograph 2.7.2. of the Polish Pharmacopoeia (Ph. P.), which corresponds to an appropriate monograph of the European Pharmacopoeia. (Ph. Eur.): “Microbiological assay of antibiotics” [3]. Two microbiological methods of the

krobiologiczne metody oznaczania aktywności antybiotyków” [3]. Stosuje się dwie farmakopealne metody mikrobiologiczne: dyfuzyjną – cylinderkowo-płytkową oraz turbidymetryczną. Moc antybiotyków oznaczana jest przez porównanie zahamowania wzrostu wrażliwych drobnoustrojów standardowych, przez badany antybiotyk i substancję porównawczą w znanym stężeniu. Uzyskany wynik dla produktu leczniczego odnosi się do wyniku dla farmakopealnego wzorca antybiotyków.

Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii Narodowego Instytutu Leków (NIL) od 2000 roku uczestniczy w organizowanych przez EDQM (Komisję Farmakopei Europejskiej) międzylaboratoryjnych badaniach biegłości dotyczących oznaczania mocy farmakopealnych wzorców antybiotyków. Pięć lat temu, jako jedyni w Polsce, uzyskaliśmy akredytację Polskiego Centrum Akredytacji (PCA) oraz atestację EDQM, m.in. na mikrobiologiczne metody oznaczania aktywności antybiotyków. W każdym badaniu biegłości organizowanym przez EDQM uczestniczy przynajmniej 5 laboratoriów. Dla badanej substancji porównawczej wyznaczana jest moc wobec wzorca międzynarodowego (IS). Uzyskane wyniki w poszczególnych laboratoriach analizowane są statystycznie i opracowywane przez EDQM w formie publikacji [4, 5, 6, 7].

W Narodowym Instytucie Leków w ramach międzylaboratoryjnych badań biegłości określano moc antybiotyków przy zastosowaniu głównie metody dyfuzyjnej, jedynie w przypadku oznaczania mocy ryfamycyny użyto metodę turbidymetryczną.

Materialy i metody

Drobnoustroje

W badaniach stosowano wrażliwe na badane antybiotyki drobnoustroje testowe: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 i *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, zgodnie z zaleceniami Ph. Eur.

W tabeli 1 zestawiono badane w NIL substancje – kandydatów na farmakopalne wzorce antybiotyków oraz użyte drobnoustroje testowe.

Wzorce

Stosowano międzynarodowe substancje porównawcze amfoterycyny B, bacytracyny cynkowej, dihydrostreptomycyny, erytromycyny, kolistyny siarczanu, kolistymetatu sodowego, nystatyny, polimyksyny B siarczanu, ryfamycyny sodowej i spiramycyny dostarczone przez EDQM w ramach badań biegłości.

Metoda dyfuzyjna

Podłoża agarowe odpowiednie do badania zaszczipiano wystandaryzowaną zawiesiną drobnoustrojów testowych. Stosowano technikę płytek jedno- lub dwuwarstwowych.

pharmacopoeia are used: the diffusion – cylinder-plate method and the turbidimetric one. The potency of antibiotics is estimated by comparing the inhibition of growth of sensitive standard micro-organisms produced by known concentrations of the examined antibiotics and the reference substance. The outcome for a medical product refers to the result for a pharmacopoeial antibiotic module.

The Department of Antibiotics and Microbiology of the National Medicines Institute (NMI) has participated in the EDQM (European Pharmacopoeia Commission) inter-laboratory proficiency tests aimed at estimating the potency of pharmacopoeial antibiotic modules since 2000. Five years ago, the NMI was the only institute in Poland which was given accreditation by the Polish Centre for Accreditation (PCA) and was approved by the EDQM to use microbiological methods for estimating antibiotic activity. At least five laboratories participate in each proficiency test organized by the EDQM. The potency for the reference substance examined is estimated on the basis of international standard (IS). The results obtained in the laboratories are analysed statistically and compiled by the EDQM in a publication [4, 5, 6, 7].

As part of inter-laboratory proficiency tests in the National Medicines Institute, the potency of antibiotics was estimated mainly by means of the diffusion method, and the turbidimetric method in case of estimating the potency of rifamycin.

Materials and methods

Micro-organisms

The test micro-organisms sensitive to the antibiotics examined were used in the examination: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, according to the Ph. Eur.'s recommendations. Table 1 presents the substances of prospective pharmacopoeial antibiotic modules and test micro-organisms examined in the NMI.

Modules

International reference substances of amphotericin B, bacitracin zinc, dihydrostreptomycin, erythromycin, colistin sulphate, colistimethate sodium, nystatin, polymyxin B sulphate, rifamycin sodium and spiramycin were used and were provided by the EDQM as part of proficiency tests.

Diffusion method

An agar examination medium was inoculated with a standard suspension of test micro-organisms. A technique of one- or two-layer plates was used. Solvents and buffer solutions were used, according to the Ph. Eur.'s guidelines [3]. The examined solutions were incubated

Tab. 1

Badany antybiotyk / Tested antibiotic	Seria badanego wzorca / batch number	Rok badania / date of study	Drobnoustroj testowy / Test organism
Erytromycyna/Erythromycin	CRS, batch 4	2000	B. subtilis ATCC 6633
Nystatyna/Nystatin	CRS, batch 3 CRS, batch 4 3rd IS	2001 2003 2006	S.cerevisiae ATCC 9763
Kolistyny siarczan/Colistin sulphate	CRS batch 2	2001	E. coli ATCC 10536
Kolistymetat sodowy/Colistimethate sodium	CRS batch 2	2009	E. coli ATCC 10536
AmfoterycynaB /Amphotericin B	CRS batch 1 CRS batch 2 WHO IS 2	2001 2003 2007	S. cerevisiae ATCC 9763
Spiramycyna/Spiramycin	CRS batch 3	2003	B. subtilis ATCC 6633
Bacytracyna cynkowa /Bacitracin zinc	CRS batch 2	2003	M. luteus ATCC 10240
Ryfamycyna sodowa /Rifamycin sodium metoda dyfuzyjna /diffusion assay metodaturbidymetryczna /turbidimetric assay	CRS batch 3	2003	M. luteus ATCC 9341 E. coli ATCC 10536
Polimyksyny B siarczan /Polymyxin B sulphate	CRS batch 2	2010	B. bronchiseptica ATCC 4617
Dihydrostreptomycyna/ Dihydrostreptomycin	WHO IS 3	2011	B. subtilis ATCC 6633

Używano rozpuszczalników i roztworów buforowych zgodnie z wytycznymi zawartymi w Ph. Eur. [3]. Badane roztwory wprowadzano do sterylnych cylindereków ze stali nierdzewnej umieszczonych na powierzchni podłoża. W badaniach używano 3 stężenia substancji porównawczej i 3 stężenia badanej próby, analizowano stężenia przygotowane w postępie geometrycznym. W badaniu zastosowano taką liczbę powtórzeń każdego stężenia (n = 16), aby zapewnić wymaganą precyzję. Badania prowadzone były w sposób umożliwiający przeprowadzenie walidacji matematycznego modelu równania mocy. Wybrano model linii równoległych; linie odpowiadające 2 logarytmom odpowiedzi na stężenie, dla substancji badanej i substancji porównawczej, muszą być równoległe i liniowe, powyżej zakresu stężeń używanych do obliczania. Granice ufności (P = 0,95) dla oznaczania mocy są nie mniejsze niż 95% i nie większe niż 105% wyznaczonej mocy.

Metoda turbidymetryczna

Odpowiednie dla badania podłoże płynne zaszczepiano wystandaryzowaną zawiesiną drobnoustrojów wrażliwych na badany antybiotyk – ryfamycynę. Ilość zawiesiny dobrano w taki sposób, aby otrzymać łatwe do zmierzenia zmętnienie po ok. 4 godzinach inkubacji. Zaszczepione podłoże stosowano bezpośrednio po jego przygotowaniu. Badane roztwory antybiotyku w ilości 0,1 ml rozdzielano do identycznych probówek zawierających 9,9 ml zaszczepionego podłoża. W badaniach używano 7

in sterile, stainless steel cylinders placed on the surface of the medium. Three concentrations of the reference substance and three concentrations of the examined assay were used, the concentrations were prepared in the geometric progression. Each concentration (n=16) was used in one examination as many times as it was necessary to ensure the required precision. The test was conducted in a way that permitted the validation of the mathematical model of the power equation. A parallel-line model was chosen; the lines corresponding to two logarithms of the concentration for the examined substance and the reference substance have to be parallel and linear, above the range of concentrations used for calculations. The confidence bounds (P=0,95) for the estimation of the potency are narrower than 95 percent and not wider than 105 percent of the designated potency.

Turbidimetric method

A liquid examination medium was inoculated with a standard suspension of micro-organisms sensitive to the examined antibiotic – rifamycin. An appropriate quantity of suspension was chosen so as to obtain a readily measurable opacity after an incubation period of about four hours. The inoculated medium was used immediately after its preparation. The 0,1 ml of the solutions of the tested antibiotics was separated to identical test tubes containing 9,9 ml of the inoculated medium. Seven concentrations of the reference substance and seven concentrations of the assay were used. The concentrations

stężeń substancji porównawczej i 7 stężeń badanej próby, badano stężenia przygotowane w postępie geometrycznym. W badaniu zastosowano 3 powtórzenia każdego stężenia, aby osiągnąć wymaganą precyzję.

Analiza statystyczna

Wyniki badania mocy dla różnych antybiotyków metodą dyfuzyjną i turbidymetryczną oceniano za pomocą analizy statystycznej zgodnie z monografią 5.3 FP i Ph. Eur. „Analiza statystyczna wyników biologicznych oznaczeń zawartości i badań jakościowych” [8].

Przy zastosowaniu układu 3-punktowego, w analizie brano pod uwagę te wartości, dla których w analizie wyników wykazano, że są statystycznie ważne, tzn. spełniają warunki:

- regresji liniowej (*regression*) – obliczone prawdopodobieństwo przypadkowości jest mniejsze niż 0,05, możliwe jest liczenie zakresu 95% przedziału ufności;
- nierównoległości (*non-parallelism*) – obliczone prawdopodobieństwo nierównoległości jest większe niż 0,05; dla badanego nieznanego preparatu linia jest równoległa do linii otrzymanej dla wzorca;
- nieliniowości (*non-linearity*) – obliczone prawdopodobieństwo nieliniowości jest większe niż 0,05, stosunek między logarytmem stężenia i odpowiedzią w pełnym zakresie badanych stężeń jest reprezentowany przez linię prostą.

Ocena wyników prowadzona była przy zastosowaniu programu komputerowego CombiStats. Obliczano wynik mocy antybiotyku z wartości statystycznie ważnych zgodnie z jednym z podanych poniżej modeli:

- model średniej ważonej (*weighted combination*) – gdy wartość p homogenności jest większa niż 0,1 (homogenne przedziały ufności);
- model półśredniej ważonej (*semi weighted combination*) – gdy wartość p homogenności jest mniejsza niż 0,1 (tendencja do heterogenności przedziałów ufności).

Po przeprowadzeniu analizy wariancji badanie uznawano za zwalidowane lub niezwalidowane zgodnie ze schematem decyzyjnym (ryc. 1).

Wyniki

* Erytromycyna

W badaniu uczestniczyło 7 laboratoriów. Średnia moc erytromycyny została określona na 960 IU/mg z odchyleniem standardowym (SD) 20,1 IU/mg. Wynik uzyskany w NIL – 948 IU/mg mieścił się w granicach średniej minus 1 SD. Było to pierwsze badanie wykonywane w NIL i obliczenia zostały przeprowadzone zgodnie z FP V, w związku z tym nie została prawidłowo przeprowadzona walidacja wyników. Europejski Dyrektoriat ds. Jakości Leków odrzucił jeden z 6 przedstawionych wyników z powodu niemożności zwalidowania [4].

prepared in the geometric progression were examined. Each concentration was used in one examination three times to ensure the required precision.

Statistical analysis

The results of the potency estimation of different antibiotics by means of the diffusion and turbidimetric methods were analysed statistically, in accordance with the monograph 5.3 of the Ph. P. and the Ph. Eur. “Statistical analysis of results of biological assays and tests” [8]. Using a three-point array, the values which were proved to be statistically important, i.e. which met the conditions, were taken into consideration in the analysis. The conditions included:

- linear regression – a calculated likelihood of randomness is lower than 0,05; it is possible to estimate the 95 percent level of the confidence interval;
- non-parallelism – a calculated likelihood of non-parallelism is higher than 0,05; the line of the examined unknown preparation is parallel to the line of the module;
- non-linearity – a calculated likelihood of non-linearity is higher than 0,05; a straight line represents the relationship between the logarithm of the concentration and the concentrations examined in full scope.

The results were estimated by means of a computer programme CombiStats on the basis of the values statistically important, in accordance with one of the following models:

- a weighted mean model – when the test of homogeneity yields a P-value more than 0,1 (homogeneous confidence intervals);
- a semi-weighted mean model – when the test of homogeneity yields a P-value less than 0,1 (a tendency to heterogeneity of the confidence intervals).

After the variance analysis, the examination was considered to be validated or disapproved, in accordance with a decision making scheme (Figure 1).

Results

* Erythromycin

Seven laboratories participated in the examination. The estimated average potency of erythromycin was 960 IU/mg with 20,1 IU/mg SD. The result in the NMI – 948 IU/mg was within the average minus one SD. It was the first test conducted in the NMI and the calculations were done in accordance with Ph. P. V, as a result of which the validation of the results was not performed properly. The European Directorate for the Quality of Medicines rejected one out of six presented results because validation was not possible [4].

* Nystatin

The NMI took part in the estimation of the potency of nystatin four times.

* Nystatyna

NIL uczestniczył 4-krotnie w badaniach mocy nystatyny.

- W badaniu serii 3 w 2001 roku brało udział 6 laboratoriów. Średnia moc nystatyny została określona na 6030 IU/mg z odchyleniem standardowym 81,5 IU/mg. Wynik uzyskany w naszym laboratorium – 6041 IU/mg mieścił się w granicach średniej plus 1 SD. Ocenę statystyczną przeprowadzono zgodnie z wytycznymi monografii 5.3 Ph. Eur. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych [5].
- W badaniu serii 4 w 2004 roku uczestniczyło 8 laboratoriów. Średnia moc nystatyny została określona na 5600 IU/mg z odchyleniem standardowym 131,8 IU/mg. Wynik uzyskany w NIL – 5446 IU/mg mieścił się w granicach średniej minus 2 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych.
- W 2006 roku seria poprzednia (batch 4) była badana ponownie ze względu na obawy o obniżenie się mocy standardu. W badaniu uczestniczyły tylko 3 laboratoria. Uzyskane wyniki były niższe niż założona moc – ok. 5500 IU/mg: (5270 IU/mg i 5162 IU/mg oraz wynik uzyskany w NIL: 5486 IU/mg). Pomimo uzyskania niższych wartości, EDQM nie zmienił mocy dla nystatyny serii 4.
- W badaniu serii 3rd IS (CRS seria 5) w 2006 roku uczestniczyło 17 laboratoriów. Średnia moc nystatyny została określona na 5710 IU/mg z odchyleniem standardowym 234,7 IU/mg. Wynik uzyskany w NIL – 5963 IU/mg mieścił się w granicach średniej plus 1 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych. W przypadku tak dużej grupy uczestniczących laboratoriów (17) uzyskano dość duży rozrzut wyników od 5299 IU/mg do 5981 IU/mg (wynik dla jednego laboratorium – 7244 IU/mg – został odrzucony). Do średniej wyliczonej przez EDQM wybrano również bardzo niskie wyniki, które znacznie zaniżyły średnią.

Międzylaboratoryjne badania biegłości opracowano w publikacji [7].

* Kolistyny siarczan

W badaniu 2001 r uczestniczyło 6 laboratoriów. Średnia moc kolistyny została określona na 580 935 IU/fiolkę z odchyleniem standardowym 8378,5 IU/fiolkę. Wynik uzyskany w NIL – 584 143 IU/fiolkę mieścił się w granicach średniej plus 1 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych [5].

* Kolistymetat sodowy

W badaniu 2009 r uczestniczyło 5 laboratoriów. Średnia moc kolistymetatu sodowego została określona na 285 000 IU/fiolkę z odchyleniem standardowym 9046 IU/fiolkę. Wynik uzyskany w NIL – 282 336 IU/fiolkę mieścił się w granicach średniej minus 1 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych.

- Six laboratories participated in the examination of batch three in 2001. The estimated average potency of nystatin was 6030 IU/mg with 81,5 IU/mg SD. The result obtained in our laboratory – 6041 IU/mg was within the average plus one SD. The statistical analysis was conducted according to the guidelines of the Ph. Eur's monograph 5.3. All six assays were validated [5].
 - Eight laboratories took part in the examination of batch four in 2004. The estimated average potency of nystatin was 5600 IU/mg with 131,8 IU/mg SD. The result obtained in the NMI – 5446 IU/mg was within the average minus two SD. All six assays were validated.
 - Bath four was reexamined in 2006 for fear of lowering the potency of the standard. Only three laboratories participated in the examination. The obtained results were lower than the expected potency – around 5500 IU/mg: (5270 IU/mg and 5162 IU/mg and the result of the NMI: 5486 IU/mg). Despite receiving lower values, the EDQM did not change the potency of the nystatin examined in batch four.
 - 17 laboratories took part in the examination of batch three IS (CRS batch five) in 2006. The estimated average potency of nystatin was 5710 IU/mg with 234,7 IU/mg SD. The NMI result – 5963 IU/mg was within the average plus one SD. All six assays were validated. Considering a high number of laboratories taking part in the examination (17), there was a wide dispersion of the results, from 5299 IU/mg to 5981 IU/mg (one laboratory result – 7244 IU/mg – was rejected). Very low results were also selected for calculating the average determined by the EDQM, numbers which significantly lowered the average.
- Inter-laboratory proficiency tests were presented in a publication [7].

* Colistin sulphate

Six laboratories participated in the examination in 2001. The estimated average potency of colistin was 580 935 IU/vial with 8378,5 IU/vial SD. The result of the NMI – 584 143 IU/vial was within the average plus one SD. All six assays were validated [5].

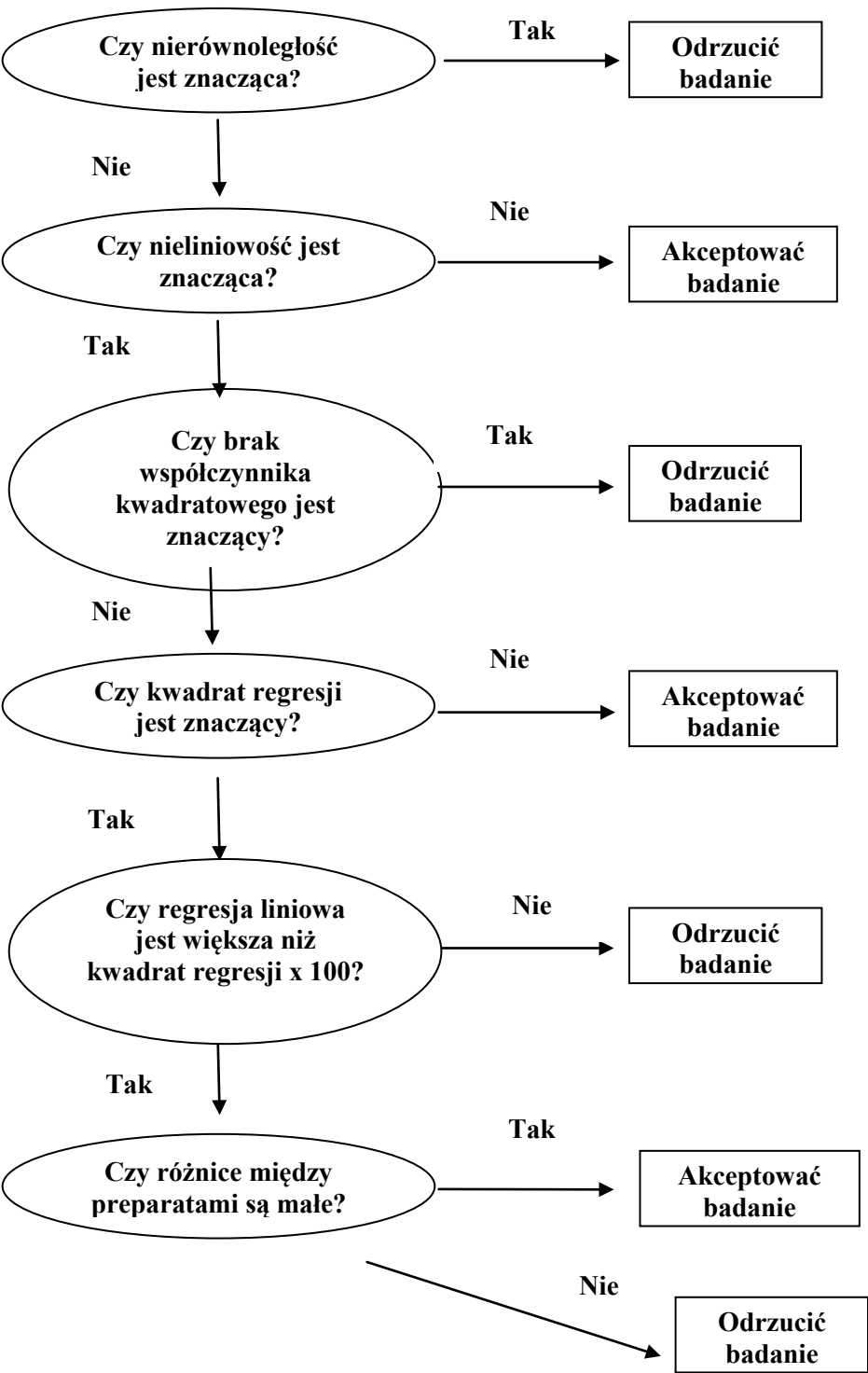
* Colistimethate sodium

Five laboratories took part in the examination in 2009. The estimated average potency of colistimethate sodium was 285 000 IU/vial with 9046 IU/vial SD. The NMI result – 282 336 IU/vial was within the average minus one SD. All six assays were validated.

* Amphotericin B

The NMI laboratory participated in the examination of the potency of amphotericin B three times.

- Seven laboratories took part in the examination of batch CRS one in 2001. The estimated average



Ryc. 1

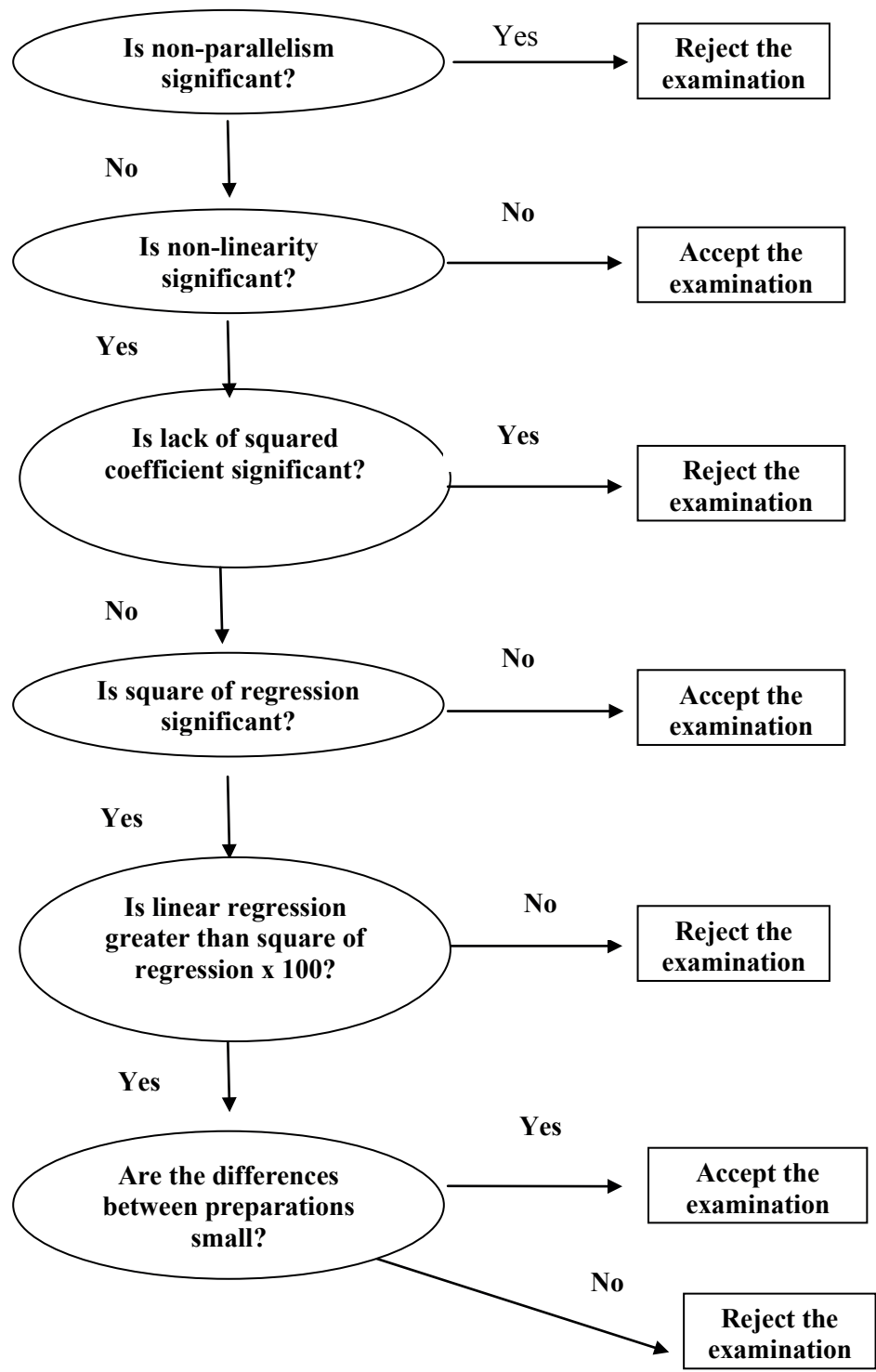


Fig. 1.

* Amfoterycyna B

Laboratorium NIL uczestniczyło 3-krotnie w badaniach mocy amfoterycyny B.

- W badaniu serii CRS 1 w 2001 roku uczestniczyło 7 laboratoriów. Średnia moc amfoterycyny B została określona na 990 IU/mg z odchyleniem standardowym 17,6 IU/mg. Wynik uzyskany w naszym laboratorium – 993 IU/mg mieścił się w granicach średniej plus 1 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych [5].
- W badaniu serii CRS 2 w 2003 roku uczestniczyły 4 laboratoria. Średnia moc amfoterycyny B została określona na 960 IU/mg z odchyleniem standardowym 42,0 IU/mg. Wynik uzyskany w naszym laboratorium – 987 IU/mg mieścił się w granicach średniej plus 1 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych.
- W badaniu serii WHO IS 2 w 2007 roku uczestniczyło 10 laboratoriów. Średnia moc amfoterycyny B została określona na 944 IU/mg z odchyleniem standardowym 36,0 IU/mg. Wynik uzyskany w NIL – 990 IU/mg mieścił się w granicach średniej plus 2 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych.

Międzylaboratoryjne badania biegłości przedstawiono w publikacji [6].

* Spiramycyna

W badaniu w 2003 roku uczestniczyło 7 laboratoriów. Średnia moc spiramycyny została określona na 4530 IU/mg z odchyleniem standardowym 254,9 IU/mg. Wynik uzyskany w NIL – 4540 IU/mg mieścił się w granicach średniej plus 1 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych [5].

* Bacytracyna cynkowa

W badaniu w 2003 roku uczestniczyło 7 laboratoriów. Średnia moc bacytracyny została określona na 62,9 IU/mg z odchyleniem standardowym 2,2 IU/mg. Wynik uzyskany w NIL – 63,1 IU/mg mieścił się w granicach średniej plus 1 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych [5].

* Ryfamycyna sodowa

Laboratorium NIL uczestniczyło w badaniach mocy dla ryfamycyny, wykonując badania dwiema metodami: dyfuzyjną i turbidymetryczną.

W badaniu metodą dyfuzyjną uczestniczyło 6 laboratoriów [4]. Średnia moc ryfamycyny została określona na 856 IU/mg z odchyleniem standardowym 5,5 IU/mg. Wynik uzyskany w NIL – 857 IU/mg. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych.

W badaniu metodą turbidymetryczną uczestniczyły 4 laboratoria. Średnia moc ryfamycyny została określona na 856 IU/mg z odchyleniem standardowym 12,0 IU/

potency of amphotericin B was 990 IU/mg with 17,6 IU/mg SD. The result obtained in our laboratory – 993 IU/mg was within the average plus one SD. All six assays were validated [5].

- Four laboratories participated in the examination of batch CRS two in 2003. The estimated average potency of amphotericin B was 960 IU/mg with 42,0 IU/mg SD. The result of our laboratory – 987 IU/mg was within the average plus one SD. All six assays were validated.
- 10 laboratories took part in the examination of batch WHO IS two in 2007. The estimated average potency of amphotericin B was 944 IU/mg with 36,0 IU/mg SD. The NMI result – 990 IU/mg was within the average plus two SD. All six assays were validated.

Inter-laboratory proficiency tests were presented in a publication [6].

* Spiramycin

Seven laboratories participated in the examination in 2003. The estimated average potency of spiramycin was 4530 IU/mg with 254,9 IU/mg SD. The result received in the NMI – 4540 IU/mg was within the average plus one SD. All six assays were validated [5].

* Bacitracin zinc

Seven laboratories took part in the examination in 2003. The estimated average potency of bacitracin zinc was 62,9 IU/mg with 2,2 IU/mg SD. The result received in the NMI – 63,1 IU/mg was within the average plus one SD. All six assays were validated [5].

* Rifamycin sodium

The NMI laboratory estimated the potency of rifamycin sodium by means of the diffusion methods and the turbidimetric method.

Six laboratories participated in the examination conducted by means of the diffusion method [4]. The estimated average potency of rifamycin was 856 IU/mg with 5,5 IU/mg SD. The result obtained in the NMI – 857 IU/mg. All six assays were validated.

Four laboratories took part in the examination conducted by means of the turbidimetric method. The estimated average potency of rifamycin was 856 IU/mg with 12,0 IU/mg SD. The result of the NMI – 849 IU/mg was within the average minus one SD. All six assays were validated, still making seven dilutions in the geometric progression:

- the results from four to seven of the dilution were validated for the examination one and two,
- the results from one to four of the dilution were validated for the examination three and four,
- the results from two to four of the dilution were validated for the examination five,
- the results from three to five of the dilution were validated for the examination six.

mg. Wynik uzyskany w NIL – 849 IU/mg mieścił się w granicach średniej minus 1 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych, niemniej wykonując 7 rozcieńczeń w postępie geometrycznym:

- dla badania 1 i 2 zwalidowano wyniki od 4 do 7 rozcieńczenia,
- dla badania 3 i 4 zwalidowano wyniki od 1 do 4 rozcieńczenia,
- dla badania 5 zwalidowano wyniki od 2 do 4 rozcieńczenia,
- dla badania 6 zwalidowano wyniki od 3 do 5 rozcieńczenia.

Metoda walidacji wybranych, co najmniej 3 kolejnych stężeń ze wszystkich wykonanych stężeń zgodna jest z Ph. Eur.

* Polimyksyny B siarczan

W badaniu w 2010 roku uczestniczyło 5 laboratoriów. Średnia moc polimyksyny została określona na 205 000 IU/fiolkę z odchyleniem standardowym 5724 IU/fiolkę. Wynik uzyskany w NIL – 207 427 IU/fiolkę mieścił się w granicach średniej plus 1 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych.

* Dihydrostreptomycyna

W badaniu w 2011 roku uczestniczyło 11 laboratoriów. Średnia moc dihydrostreptomycyny została określona na 19 450 IU/fiolkę z odchyleniem standardowym 702 IU/fiolkę. Wynik uzyskany w NIL – 19 270 IU/fiolkę mieścił się w granicach średniej minus 1 SD. Wszystkich 6 oznaczeń zostało pozytywnie zwalidowanych.

Chemiczne substancje porównawcze z deklarowaną mocą antybiotyków stosowane są w badaniach jakości produktów leczniczych do momentu konieczności opracowania nowej serii wzorca, która zastępuje wzorzec dotychczas używany. W niektórych laboratoriach stare wzorce pozostają i mogą nadal być wykorzystywane.

W badaniach przeprowadzonych w Narodowym Instytucie Leków [9] wykazano, że wzorce antybiotyków: oksytetracykliny, doksycykliny, kolistyny i spiramycyny, przechowywane przez ponad 40 lat w zamrażarce laboratoryjnej (około -20°C) były stabilne. Dysponowano nawet 54-letnim wzorcem spiramycyny – z 1955 r. Wszystkie badane substancje w pełni zachowały swoją moc biologiczną – była ona zbliżona do deklarowanej, a zawartość produktów rozkładu oznaczanych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) nie była zwiększona istotnie statystycznie.

Wydaje się, że wiele wzorców antybiotyków, w których określaniu mocy uczestniczył Narodowy Instytut Leków, może być stosowanych przez wiele lat w rutynowych badaniach jakości produktów leczniczych metodą mikrobiologiczną.

The method of validation of at least three selected consecutive concentrations is in accordance with the Ph. Eur.

* Polymyxin B sulphate

Five laboratories participated in the examination in 2010. The estimated average potency of polymyxin was 205 000 IU/vial with 5724 IU/vial SD. The result obtained in the NMI – 207 427 IU/vial was within the average plus one SD. All six assays were validated.

* Dihydrostreptomycin

11 laboratories participated in the examination in 2011. The estimated average potency of dihydrostreptomycin was 19 450 IU/vial with 702 IU/vial SD. The result of the NMI – 19 270 IU /vial was within the average minus one SD. All six assays were validated.

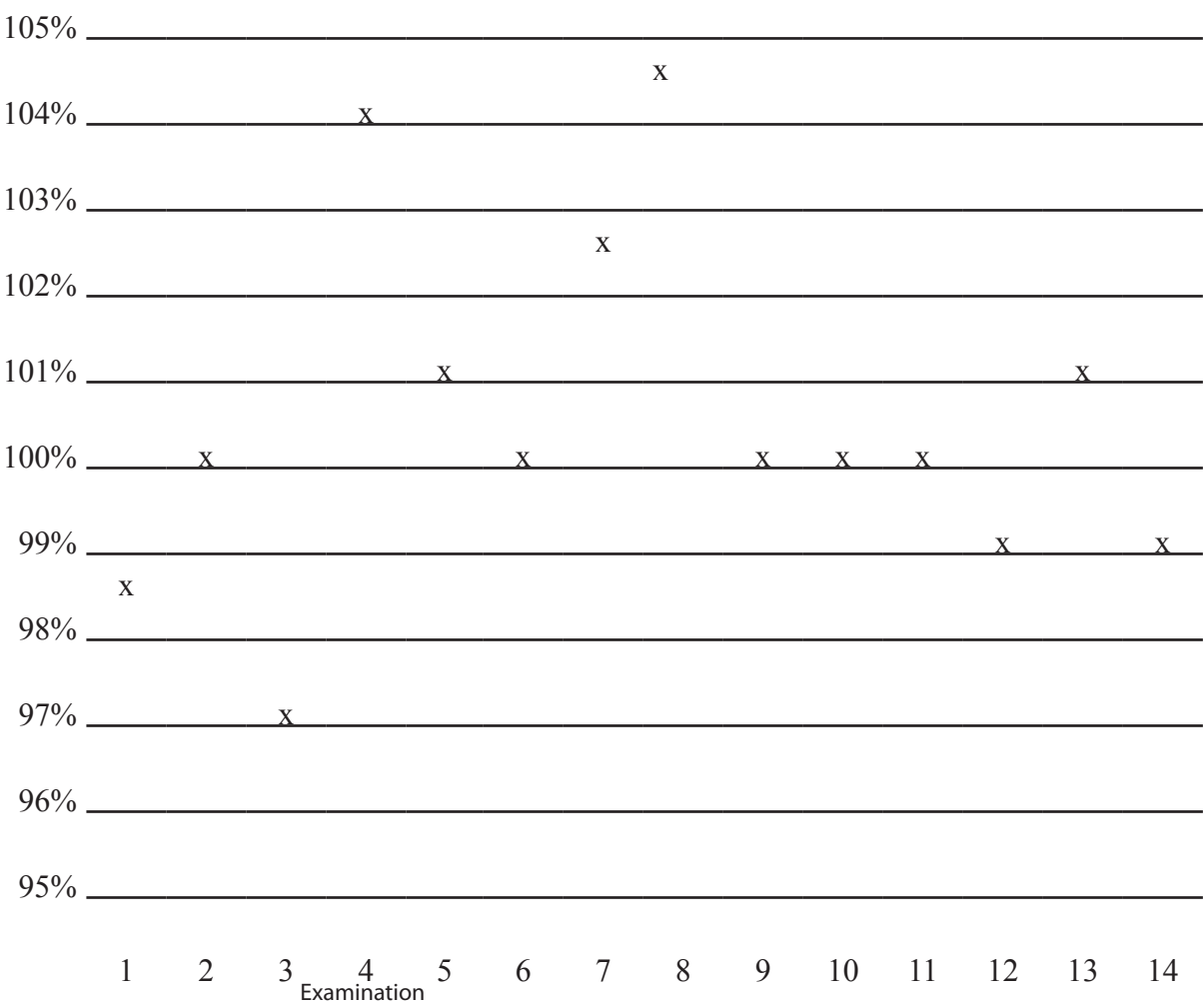
Reference chemical standards with a declared potency of antibiotics are used in proficiency tests of quality of medicinal products until a new batch of module is worked out to replace the one used so far. In some laboratories, the old modules are preserved and can still be used.

The examinations conducted in the National Medicines Institute [9] showed that the modules of antibiotics: oxytetracycline, doxycycline, colistin and spiramycin stored for over 40 years in a laboratory freezer (about -20°C) were stable. There was even a fifty-four-year-old module of spiramycin from 1955 available. All examined substances retained their full biological potency, which was close to the declared one, and the product decomposition content estimated by means of high performance liquid chromatography method (HPLC) did not show any statistically significant increase.

It seems that many modules of antibiotics, whose potency was assessed by the National Medicines Institute, can be used for many years in routine estimations of quality of medicinal products by means of the microbiological method.

Summary

1. All inter-laboratory proficiency tests, except for the ones that assessed the potency of erythromycin (estimation from 200) were conducted in standardized conditions:
 - the third passage of strain and the suspension of density five measured according to McFarland standards with Densimat bioMerieux were always used for the suspension of micro-organisms (except for the suspension of spore),
 - specific timing and conditions of diffusion for the examined antibiotic were observed,
 - basic solutions of the module and of the examined substance were made in glass A class flasks,
 - when double spheres of inhibition occurred for the estimation of e.g. amphotericin B and nystatin, the outside sphere was interpreted.



Ryc. 2

Podsumowanie

1. Wszystkie międzylaboratoryjne badania biegłości, z wyjątkiem oznaczania mocy erytromycyny (badanie w 2000 roku) wykonywano z zastosowaniem wystandaryzowanych warunków:
 - dla zawiesiny drobnoustrojów zawsze korzystano z 3 pasaży szczepu i używano zawiesiny o gęstości 5 według skali McFarlanda mierzonej na densimacie firmy bioMerieux (z wyjątkiem zawiesiny spor),
 - przestrzegano określonych dla badanego antybiotyku czasu i warunków dyfuzji,
 - podstawowe roztwory wzorca i substancji badanej wykonywano w kolbach szklanych klasy A,
 - w przypadku podwójnych stref zahamowania uzyskiwanych dla oznaczeń, np. amfoterycyny B i nystatyny odczytywano strefy zewnętrzne
2. Wszystkie wyniki, z wyjątkiem jednego oznaczenia dla erytromycyny były pozytywnie zwalidowane.
3. Wszystkie określone przez NIL moce badanych antybiotyków mieściły się w granicach 95–105% średniego wyniku uznanego przez EDQM (ryc.2).
4. W przypadku oznaczania mocy ryfamycyny sodowej,

Fig. 2

2. All assays, except for the assay for erythromycin, were validated.
3. The estimated potency of the antibiotics examined by the NMI was within 95-105 percent of the average result accepted by the EDQM (Figure 2).
4. While estimating the potency of rifamycin sodium, by means of both the diffusion method and the turbidimetric method, it was stated that the turbidimetric method is more laborious than the diffusion method and that there is little likelihood that the results can be validated with all concentrations.

gdzie zastosowano zarówno metodę dyfuzyjną jak i turbidymetryczną stwierdzono, że metoda turbidymetryczna jest bardziej pracochłonna niż metoda dyfuzyjna, a możliwość zwalidowania wyników przy wykorzystaniu wszystkich wykonanych stężeń wydaje się mało prawdopodobna.

Piśmiennictwo / References

1. Tyski S, Pajchel G. *Zasady i metody kontroli leków antybiotykowych dopuszczonych do obrotu w Polsce*. Mikrobiologia Medycyna 1999;1:35–40.
2. Zapaśnik M, Pajchel G, Tyski S. *Determination of antimicrobial agents content in multiantibiotic drugs*. Acta Poloniae Pharmaceutica 1999;56(suplement):71–76.
3. European Pharmacopoeia, monografia 2.7.2. “Microbiological assay of antibiotics”, ver. 01/2009:20702.
4. Charton E, Daas AGJ, Sandrin J, Miller JHMcB. *Collaborative studies for the establishment of reference substances for the microbiological assay of antibiotics*. Pharmeuropa 2001; 13:703–714.
5. Charton E, Daas AGJ, Sandrin J, Miller JHMcB. *Collaborative studies for the establishment of reference substances for the microbiological assay of antibiotics*. Pharmeuropa Bio 2003–2;1–8.
6. Rautmann G, Daas A, Buchheit K-H. *Collaborative study for the establishment of the second international standard for amphotericin B*. Pharmeuropa Bio & Scientific Notes, 2010–1;1–13.
7. Rautmann G, Charton E, Daas A, Buchheit K-H. *Collaborative study for the establishment of the third international standard for nystatin*. Pharmeuropa Bio & Scientific Notes, 2010–2;68–85.
8. European Pharmacopoeia, monografia 5.3. “Statistical analysis of results of biological assays and tests”, ver. 01/2008:50300.
9. German R, Bukowska B, Pajchel G, Grzybowska W, Tyski S. *Extremely long time stability study of selected antibiotic standards*. J. Pharm. Biomed. Anal. 2010;51:758–763.

Adres do korespondencji / Mailing address:

Wanda Grzybowska
Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii
Narodowy Instytut Leków
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa
tel / fax:: 22-851-52-15
e-mail: wanda@il.waw.pl