

DOI: 10.38045/ohrm.2023.SE.02

PROCEDEU DE DETERMINARE RAPIDĂ A SPECIILOR DE *CANDIDA* ÎN MEDICAMENTE

Nicolae PUȘCAȘ, Greta BĂLAN

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

Autor corespondent: Nicolae Pușcaș, e-mail: nicolae.puscas@usmf.md

Cuvinte-cheie: *Candida* spp., determinare rapidă, procedeu, medicamente.

Introducere. Contaminarea produselor farmaceutice cu microorganisme inadmisibile este un risc major în industria farmaceutică, deoarece poate afecta integritatea produsului și siguranța pacienților.

Material și metode. Cercetările au fost efectuate utilizând materiale și reactivi standarde înregistrate în Republica Moldova. Izolarea și identificarea levurilor din genul *Candida* au fost efectuate paralel cu metodele clasice. Pentru testarea procedurii elaborate au fost utilizate atât tulpini de referință din genul *Candida*, cât și tulpini clinice.

Rezultate. A fost elaborat un procedeu care permite determinarea rapidă a levurilor din genul *Candida* care dă posibilitate de a obține un rezultat preliminar după 9 ore de la inocularea materialului examinat, în comparație cu metodele obișnuite. Procedeu este sensibil, econom și simplu în utilizare, accesibil pentru laboratoarele microbiologice de diverse niveluri.

Concluzii. Rezultatele obținute în monitorizarea microbiologică a levurilor din genul *Candida* au un potențial de aplicare ca un nou principiu de control a calității medicamentului, de perfecționare în continuare a micrometodelor, test-sistemelor diagnostice autonome, mijloacelor de tip nou pentru indicarea și identificarea rapidă a microorganismelor implicate în patologia infecțioasă, care vor permite elaborarea algoritmului complex de monitorizare microbiologică.

Keywords: *Candida* spp., rapid determination, procedure, drugs.

PROCEDURE FOR RAPID DETERMINATION OF *CANDIDA* SPECIES IN DRUGS

Introduction. The contamination of drugs with unauthorized microorganisms poses a significant risk in the pharmaceutical industry, as it has the potential to compromise product integrity and jeopardize patient safety.

Material and methods. The research was conducted using standard materials and reagents registered in the Republic of Moldova. The isolation and identification of *Candida* genus yeasts were performed concurrently using classical methods. The developed procedure was tested using both reference strains and clinical strains of *Candida* yeasts.

Results. A procedure has been developed for the rapid determination of *Candida* yeasts. The method enables obtaining a preliminary result just 9 hours after inoculation of the examined material, a notable improvement compared to conventional methods. The procedure is characterized by its sensitivity, cost-effectiveness, simplicity, and accessibility, making it suitable for microbiological laboratories at various levels.

Conclusions. The results derived from the study conducted in the microbiological monitoring of *Candida* yeasts hold the potential for application as a novel principle underlying drug quality control. This can contribute to the advancement of micromethods, autonomous diagnostic test systems, and new types of indicators for the rapid identification of microorganisms implicated in infectious pathology. These findings serve as a foundation for developing a comprehensive microbiological monitoring algorithm.

INTRODUCERE

Contaminarea și cross-contaminarea medicamentelor de uz uman cu microorganisme pot prezenta o amenințare pentru sănătatea publică, deoarece microorganismele diminuează din stabilitatea produselor și inspiră neîncrederea pacientului în beneficiile oferite de medicament. Alterarea microbiană a produselor farmaceutice poate duce la deteriorarea fizico-chimică atât a ingredientelor active, cât și aditive ale preparatului și, în cele din urmă, se pot forma constituenți cu o eficiență redusă sau chiar toxici. Contaminanții microbieni, în special ai preparatelor antimicrobiene, pot facilita amplificarea fondului plasmidic de rezistență al tulpinilor, astfel contribuind la dezvoltarea rezistenței achiziționate la antimicrobiene. În plus, toxinele microbiene acumulate în preparat prezintă, de asemenea, riscuri



pentru sănătatea pacientului. Deseori, focare masive de infecții, atribuite utilizării medicamentelor, au dus la retragerea acestora din uz. Microorganismele cu un potențial periculos comun, depistate în produsele farmaceutice, includ atât bacterii, cât și diverse micromicete (1).

În ultimii ani tot mai multe produse farmaceutice sunt retrase de pe piață, ceea ce ne indică încă odată cât de importantă este calitatea acestor preparate, inclusiv calitatea microbiologică. Produsele de metabolism ale microorganismelor care contaminatează produsul pot contribui la degradarea substanței active și la acumularea de produse pirogene, alergene, precum și la reducerea proprietăților farmacocinetice și a efectului curativ al medicamentului. Întrucât medicamentele sunt folosite și de persoane imunocompromise, pentru a preveni infecțiile induse de medicamente, standardele în vigoare impun limite ale contaminării microbiene. Multe dintre medicamente permit dezvoltarea unor specii de microorganisme, din aceste considerente o preocupare majoră este operarea aseptică pe tot parcursul tehnologic al produsului până la administrare (2).

Pentru atingerea obiectivului de calitate al unui medicament, este necesar ca acesta să fie verificat la toate etapele de producere, la toți parametrii care pot influența calitatea acestuia. Una dintre etapele de control este evaluarea calității microbiologice a medicamentelor care este deosebit de importantă având în vedere faptul că contaminarea microbiană poate compromite proprietățile acestora (3).

Medicamentele etichetate nesteril, indiferent de forma lor de dozare și de calea de administrare, trebuie să respecte criteriile de puritate microbiologică. Controlul medicamentelor este un mecanism preventiv care are ca scop combaterea lansării produselor dăunătoare pe piața de consum. Deci, controlul microbiologic al calității este o parte esențială a procesului tehnologic de obținere a medicamentului (4).

Actualmente, pentru a asigura calitatea unui medicament nu este suficient să se testeze produsul finit la sterilitate sau contaminare microbiană. Accentul se pune pe minimizarea riscului de contaminare pe parcursul întregului proces tehnologic, iar identificarea unei posibile contaminări este scopul monitorizării microbiologice (4, 5).

Reieșind din cele expuse, perfecționarea și elaborarea unor procedee noi de determinare rapidă a microorganismelor din produsele medicamentoase este binevenită și ar facilita controlul calității medicamentului.

MATERIAL ȘI METODE

Cercetările au fost efectuate utilizând materiale și reactivi standarde înregistrate în Republica Moldova. Izolarea și identificarea levurilor din genul *Candida* au fost efectuate paralel cu metodele clasice. Pentru testarea procedeeului elaborat au fost utilizate atât tulpini de referință din genul *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 38248, *Candida krusei* ATCC 6258), tulpini de *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, cât și tulpini clinice.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În cadrul cercetărilor a fost elaborat un procedeu nou pentru indicarea rapidă a levurilor din genul *Candida* (MSD-Cand).

Acest procedeu include un mediu de cultură cu următoarele ingrediente: bulion peptonat uscat, glucoză, gelatină, mediul 199, dehidrogenofosfat de sodiu, hidrogenofosfat de potasiu, roșu fenol și ciprofloxacina. Ca bază nutritivă servește bulionul peptonat, glucoza, gelatina și mediul 199, ce includ practic toate componentele necesare pentru creșterea și multiplicarea levurilor din genul *Candida*.

Ciprofloxacina este factorul de selectivitate, deoarece inhibă creșterea și multiplicarea altor microorganisme, asigurând specificitatea mediului de cultură.

Indicarea levurilor din genul *Candida* are loc în condițiile pH-ului format de dihidrogenofosfatul de sodiu, de hidrogenofosfatul de potasiu și de produsele scindării glucozei cu ajutorul indicatorului roșu

fenol. Mediul este fixat la fundul unui recipient cu volumul de 10,0 ml, care servește și ca dispozitiv pentru multiplicarea și indicarea levurilor din genul *Candida*. Pentru indicarea levurilor în flacon se aplică 2,0 ml de apă distilată sterilă, în care se dizolvă mediul, apoi se însămânțează prelevatul.

Flaconul se incubează la 37°C până la 9-24 ore. În prezența levurilor din genul *Candida* în materialul de examinat, culoarea amestecului din flacon se schimbă din roșu în galben.

Pentru prepararea mediului de cultură au fost elaborate nouă variante ale componenței lui. În urma cercetărilor repetate s-a constatat că varianta optimă a componenței mediului este cea care conține toate opt componente (tab. 1).

Tabelul 1. Influența ingredientelor mediului de cultură la indicarea levurilor din genul *Candida*.

Nr. d/o	Ingredientele mediului	Variantele compoziției mediului și rezultatele indicării								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Bulion peptonat uscat	+	-	+	+	+	+	+	+	+
2.	Glucoză	+	+	-	+	+	+	+	+	+
3.	Gelatină	+	+	+	-	+	+	+	+	+
4.	Hidrogenofosfat de sodiu	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5.	Dihidrogenofosfat de potasiu	+	+	+	+	+	-	+	+	+
6.	Mediul 199	+	+	+	+	+	+	-	+	+
7.	Roșu de fenol	+	+	+	+	+	+	+	-	+
8.	Ciprofloxacina	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Indicarea levurilor		◇	▣	▣	◇	▣	▣	x	x	◇

Notă: “+” – Sprezența ingredientului, “-” - lipsa ingredientului, x - indicarea levurilor după 24 ore de incubare la 37°C; ▣ - nu permite indicarea levurilor; ◇ - indicarea levurilor timp de până la 9 ore de incubare la 37°C.

Sensibilitatea mediului de cultură a fost stabilită în funcție de componența cantitativă a ingredientelor. Pentru aceasta, s-au elaborat cinci variante ale compoziției cantitative și de cultură și s-a stabilit varianta care include ingrediente în raport optim pentru indicarea rapidă a levurilor din genul *Candida* (fig. 1).

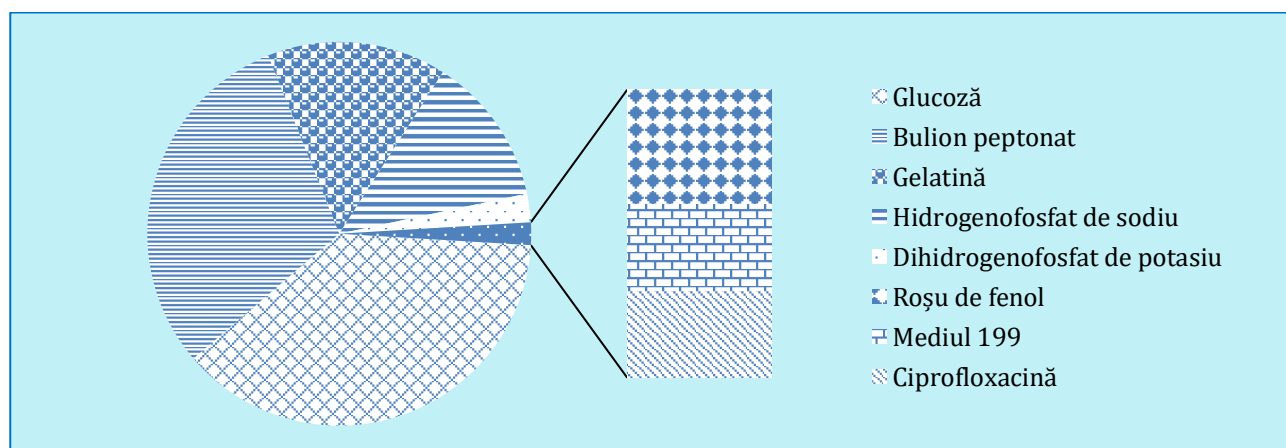


Figura 1. Raportul ingredientelor din mediul de cultura.

Trebuie menționat faptul că la prepararea mediului de cultură necesar pentru efectuarea unei analize, ingredientele se utilizează în cantități minime, ceea ce face mediul econom. Timpul indicării levurilor din genul *Candida* depinde de concentrația inițială a celulelor microbiene într-un ml/gr/material de analizat (tab. 2).

Indicarea celulelor unice de levuri din genul *Candida* este posibilă după 9-24 ore de incubare, iar a concentrațiilor de 10^3 - 10^4 c.m./ml timp de 4-5 ore de incubare la temperatura de 37°C.

Tabelul 2. Timpul indicării levurilor din genul *Candida* în funcție de concentrația lor inițială în materialul de examinat.

Concentrația (c.m./ml, g)	Timpul indicării, ore									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
10¹	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
10²	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
10³	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
10⁴	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++
10⁵	-	-	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++
10⁶	-	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
10⁷	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
10⁸	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10⁹	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Notă: “-” – culoare inițială roșie (rezultat negativ); “+” – culoare galben-deschis (rezultat slab pozitiv); “++” – culoare galbenă (rezultat pozitiv); “+++” – culoare galben-închis (rezultat evident pozitiv).

Tabelul 3. Selectivitatea mediului MSD-Cand.

Nr. d/o	Specia microorganismelor în asociație	Nr. exp.	Indicarea levurilor, ore			P	
			6 % ± ES _p	9 % ± ES _p	24 % ± ES _p	6;9 ore	9;24 ore
1.	<i>C. albicans</i> (10 ²) <i>S. aureus</i> (10 ⁶)	40	0	100±0,0	100±0,0	-	-
2.	<i>C. albicans</i> (10 ²) <i>P. aeruginosa</i> (10 ⁶)	40	0	97,5±1,42	97,5±1,42	-	<0,05
3.	<i>C. albicans</i> (10 ²) <i>E. coli</i> (10 ⁶)	40	0	100±0,0	100±0,0	-	-
4.	<i>C. albicans</i> (10 ³) <i>S. aureus</i> (10 ⁶)	40	10,0±0,71	97,5±1,42	100±0,0	<0,001	<0,05
5.	<i>C. albicans</i> (10 ³) <i>P. aeruginosa</i> (10 ⁶)	40	12,5±0,86	100±0,0	100±0,0	<0,001	-
6.	<i>C. albicans</i> (10 ³) <i>E. coli</i> (10 ⁶)	40	17,5±0,94	95,0±1,53	100±0,0	<0,001	<0,05
7.	<i>C. albicans</i> (10 ⁴) <i>S. aureus</i> (10 ⁶)	40	60,0±1,22	97,5±1,42	100±0,0	<0,001	<0,05
8.	<i>C. albicans</i> (10 ⁴) <i>P. aeruginosa</i> (10 ⁶)	40	70,0±1,26	100±0,0	100±0,0	<0,05	-
9.	<i>C. albicans</i> (10 ⁴) <i>E. coli</i> (10 ⁶)	40	65,0±1,25	100±0,0	100±0,0	<0,001	-
10.	<i>C. albicans</i> (10 ⁵) <i>S. aureus</i> (10 ⁶)	40	90,0±1,41	100±0,0	100±0,0	<0,001	-
11.	<i>C. albicans</i> (10 ⁵) <i>P. aeruginosa</i> (10 ⁶)	40	95,0±1,53	100±0,0	100±0,0	<0,05	-
12.	<i>C. albicans</i> (10 ⁵) <i>E. coli</i> (10 ⁶)	40	95,0±1,53	100±0,0	100±0,0	<0,05	-

Pentru determinarea selectivității mediului MSD-Cand, au fost efectuate experiențe în serie cu patru loturi de microorganisme în asociație și în 40 de repetiții (tab. 3). În urma cercetărilor efectuate s-a stabilit că mediul MSD-Cand dispune de selectivitate înaltă față de *C. albicans* în funcție de concentrația inițială a candidelor și a microorganismelor din asociație. Datele din tabelul 3 demonstrează că indicarea *C. albicans* la o concentrație de 10⁵ c.m./ml din asociațiile microbiene *C. albicans* 10⁵ c.m./ml +

S. aureus 10⁶ c.m./ml; *C. albicans* 10⁵ c.m./ml + *P. aeruginosa* 10⁶ c.m./ml; *C. albicans* 10⁵ c.m./ml + *E. coli* 10⁶ c.m./ml este posibilă până la 6 ore de incubare la temperatura de 37°C. Indicarea *C. albicans* la o concentrație de 10², 10³, 10⁴ în 1ml din asociațiile microbiene cu *S.aureus* 10⁶ c.m./ml; *P. aeruginosa* 10⁶ c.m./ml; *E.coli* 10⁶ c.m./ml se efectuează după 9 ore.

Veridicitatea statistică a indicilor aprecierii selectivității mediului MSD-Cand în asociația microorganismelor *C. albicans* 10⁵ c.m./ml + *S. aureus* 10⁶ c.m./ml; *C. albicans* 10⁵ c.m./ml + *P. aeruginosa* 10⁶ c.m./ml; *C. albicans* 10⁵ c.m./ml + *E. coli* 10⁶ c.m./ml a fost stabilită în comparație cu asociațiile în care concentrația *C. albicans* este de 10², 10³, 10⁴ c.m./ml (P<0,001).

Veridicitatea statistică între indicii indicării *C. albicans* în asociațiile microbiene timp de 6-9 ore (P6;9) și 9-24 ore (P9;24), unde (0,05>P<0,001), a fost confirmată și se poate menționa că mediul MSD-Cand dispune de selectivitate față de *C. albicans*, inhibând creșterea și multiplicarea celorlalte microorganisme din asociație.

Pentru determinarea sensibilității mediului MSD-Cand s-au efectuat în serie experimente cu șapte tulpini de levuri din genul *Candida* în concentrații de 10⁴; 10⁵ c.m. în 1 ml, în 12-19 repetiții. Paralel s-a efectuat însămânțarea pe mediile agar Sabouraud cu glucoză și bulion Sabouraud cu glucoză (tab. 4).

Tabelul 4. Sensibilitatea indicării levurilor din genul *Candida* cu mediul MSD-Cand.

Nr. d/o	Specia microbiană	Nr. de repetiții	Concentrația microorganismelor c.m./ml suspensie și indicarea (după culoare) timp de 6 ore de incubare la temperatura de 37°C					
			MSD-Cand		Agar Sabouraud		Bulion Sabouraud	
			10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵
1.	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	15	93,3±1,61	100±0,0	0	0	0	0
2.	<i>C. albicans</i> ATCC 38248	12	100±0,00	100±0,0	0	0	0	0
3.	<i>C. albicans</i> *	16	93,7±1,53	100±0,0	0	0	0	0
4.	<i>C. albicans</i> *	13	84,6±1,42	100±0,0	0	0	0	0
5.	<i>C. albicans</i> ATCC 36232	18	100±0,00	100±0,0	0	0	0	0
6.	<i>C. tropicalis</i> ATCC 1369	12	88,9±1,63	100±0,0	0	0	0	0
7.	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	19	94,7±1,25	100±0,0	0	0	0	0
Total		102	93,6±0,41	100±0,0	0	0	0	0

Notă: *- tulpini clinic.

Experimental s-a stabilit că mediul MSD-Cand este mult mai sensibil decât mediile agar Sabouraud cu glucoză și bulion Sabouraud cu glucoză, și permite indicarea levurilor din genul *Candida* timp de 6 ore de incubare la temperatura de 37°C la o concentrație de 10⁴ c.m./ml în 93,6% din cazuri; la o concentrație de 10⁵ c.m./ml – în 100% de cazuri, în comparație cu 24-72 de ore la utilizarea mediilor bulion Sabouraud și agar Sabouraud cu glucoză.

Mediul de cultură obținut, în formă de micropeliculă uscată și fixată la fundul recipientului, se păstrează la temperatura 4-7°C timp de doi ani (termen de observare), fără să-și modifice proprietățile inițiale.

Procedul propus va permite determinarea rapidă a levurilor în produsele medicamentoase la toate etapele de producere, inclusiv în materia primă, în procesul de fabricare și în preparatul final.

CONCLUZII

1. Procedul elaborat constă din mediu de cultură micropelicular ce dispune de selectivitate și sporește semnificativ indicarea levurilor din genul *Candida*.

2. Procedul permite indicarea levurilor din genul *Candida* timp de la 4-5 ore până la 9-24 ore, în funcție de concentrația inițială a celulelor într-un ml, g de produs.
3. Procedul elaborat este econom, simplu în utilizare, accesibil pentru laboratoarele microbiologice de diverse niveluri.
4. Termenul de păstrare al MSD-Cand este de 24 de luni (termen de observare).

REFERINȚE

1. Karin H, Henderik W, Frijlink K. A systematic review and meta-analysis of microbial contamination of parenteral medication prepared in a clinical versus pharmacy environment. *Eur J Clin Pharmacol.* 2019;75:609-617.
2. Gargiulo DA, Mitchell SJ, Sheridan J, Short TG, Swift S, Torrie J, Webster CS, Merry AF Microbiological contamination of drugs during their administration for anesthesia in the operating room. *Anesthesiology.* 2014;124(4):785-794.
3. Scheepers H, Neerup Handlos V, Walser S, Schutjens M, Neef C. Impact of the Council of Europe Resolution on quality and safety assurance requirements for medicinal products prepared in pharmacies for the special needs of patients. *Eur J Hosp Pharm Sci Pract.* 2017;24:218-223.
4. Austin P, Elia M. Improved aseptic technique can reduce variable contamination rates of ward-prepared parenteral doses. *J Hosp Infect.* 2013;83(2):160-163.
5. Sandle T. Microbiological monitoring of pharmaceutical water systems. *Eur Pharm Rev.* 2017;22(2):25-7.