

MODELAREA MATEMATICĂ A DETERMINĂRII POTENȚEI ERITROMICINEI DIN MASTIKER

MATHEMATICAL MODELING FOR ERYTHROMYCIN POTENCY DETERMINATION OF MASTIKER

Viviana Ciuca¹, Victorita Burghilea¹,

V. V. Safta², Despina Nita¹, Luciana Paraschiv¹

¹ NS Pasteur Institute SA, ² Polytechnic University of Bucharest

Cuvinte cheie :Eritromicina, metoda microbiologica, Soft Combistats , potenta estimata.

Key words: Erythromycin, Microbiological method, Combistats Soft, estimated potency.

Rezumat

Mastiker E este o suspensie antibacteriana pentru administrare intramamară in mastite la vaci. Substanța activă este eritromicina (erythromycin), un antibiotic din grupa macrolide. Caracteristica principală a produsului comercial este valoarea biologică a eritromicinei. Potența eritromicinei este estimată prin compararea inhibării creșterii microorganismelor sensibile produse de concentrații cunoscute de antibioticul de examinat și o substanță de referință. Studiul de validare își propune să demonstreze ca determinarea potenței eritromicinei, este o metodă analitică adecvată, reproductibilă și îndeplinește cerințele de calitate ale produsului Mastiker. Diametrele zonelor de inhibiție, direct proporționale cu logaritmul concentrației de antibiotic utilizat pentru testare, se măsoara și se calculeaza folosind metode statistice (Combistats Soft). Testul este conceput în așa fel încât modelul matematic pe care se bazează ecuația potenței poate fi dovedit a fi valid. Metoda aleasă a fost cea a liniilor paralele. În cazul în care un model paralel-line este ales, cele două linii de raspuns, ale preparatului în curs de examinare și preparatului standard, trebuie să fie paralele; acestea ar trebui să fie rectilinii. Aceste condiții sunt verificate prin teste de valabilitate pentru o anumită probabilitate ($P = 0,05$). Testul este valid dacă limitele de încredere ($p = 0,95$) sunt între 50-200% din potența estimată și potența estimată este între 95-105% din potența declarată. Potența declarată trebuie să fie de minim 50.000 UI/g. Procedura de validare include detalii privind protocolul de lucru al determinării potenței eritromicinei, criteriile de validare, rezultate experimentale, date statistice, comparații interlaboratoare.

Abstract

Mastiker E is an antibacterial suspension for intramammary infusion in cattle mastitis. The active drug is erythromycin, a macrolide antibiotic. The main characteristic of commercial product is erythromycin potency. The potency of erythromycin is estimated by comparing the inhibition of growth of sensitive micro-organisms produced by known concentrations of the antibiotic to be examined and a reference substance. The validation study aims to demonstrate the determination of the potency of erythromycin, it is an appropriate analytical method, reproducible and meets the quality requirements of Mastiker product. The paper establishes the performance characteristics of the method considered and identify the factors that influence these characteristics. The diameters of inhibition zones, directly proportional to the logarithm of the concentration of the antibiotic used for the assay, measured and calculated using statistical methods (Combistats Soft). The assay is designed in such a way that the mathematical model on which the potency equation is based can be proved to be valid. A parallel-line model is chosen. The two log dose response lines of the preparation under examination and the standard preparation are parallel; they are rectilinear over the range of doses used in the calculation. These conditions are verified by validity tests for a given probability ($P = 0.05$). The test is not valid unless the confidence limits ($P = 0.95$) are not less than 50% and not more than

200% of the estimated potency. The estimated potency is not less than 95% and not more than 105% of the stated potency. The stated potency is not less than 50.000 IU/g. The validation procedure includes details on protocol working to determine the potency of erythromycin, validation criteria, experimental results, mathematical modeling for determining the potency, inter-laboratory comparisons.

Introducere

Mastiker E este o suspensie antibacteriană pentru administrare intramamară în mastite la vaci.

Substanța activă este eritromicina (erythromycin), un antibiotic din grupa macrolide cu un spectru de acțiune mai larg decât al penicilinei, astfel: coci Gram-positivi (*Streptococcus spp.*, *Stafilococcus spp.*, inclusiv cei penicilino-rezistenți, pneumococi, enterococi), coci Gram-negativi (gonococi, meningococi – activitate slabă *in vivo* din cauza difuziunii reduse în lichidul cefalo-rahidian), clostridii (*C. tetani*, *perfringens*, *botulinum*), *B. subtilis*, *Sarcina lutea*, *Corinebacterium spp.*, de asemenea și unii bacilli Gram-negativi (*Brucella*, *Pasteurella*, *Haemophylus*), spirochete (*Leptospira*), mycoplasme, rickettsii, virusuri mari, unele protozoare (*Entamoeba*, *Toxoplasma*, *Trichomonas*) (1, 3, 5, 6, 10, 12).

Eritromicina nu este activă contra enterobacteriaceelor (*Salmonella*, *Aerobacter*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*), fungilor (1, 3, 5, 12).

Eritromicina acționează ca bacteriostatic sau bactericid în funcție de doză, printr-un mecanism care constă în blocarea construcției lanțurilor polipeptidice în ribosomi și inhibarea consecutivă a sintezei proteinelor (1, 3, 5, 12).

Concentrația în produs este de 50000 UI / g.

Estimarea eficacității eritromicinei se face prin comparația directă între Mastiker probă și eritromicină standard, care este calibrat și folosit ca referință.

Dozarea corectă medicamentelor și a eritromicinei în cazul nostru este o etapă decisivă a controlului final, critică pentru asigurarea calității produsului (4, 7, 8, 11).

Studiul de validare își propune să demonstreze că determinarea potenței eritromicinei este o metodă de analiză adecvată,

reproductibilă și îndeplinește cerințele de calitate ale produsului Mastiker (7, 13).

1. Materiale și Metode

Testul microbiologic de determinare a potenței eritromicinei se bazează pe o comparație a inhibării creșterii microorganismului sensibil produsă de concentrații cunoscute ale antibioticului de examinat cu cele produse de concentrații cunoscute ale unui preparat standard cu activitate cunoscută (7, 8, 11, 13).

Metoda cilindru-placă (difuzie în agar) depinde de difuzia antibioticului dintr-un cilindru vertical printr-un strat de agar solidificat într-o placă Petri, astfel încât creșterea microorganismului adăugat este inhibată în zona din jurul cilindrului care conține soluția de antibiotic (7, 8, 11, 13).

Au fost utilizate plăci Petri, 20 x 100 mm și cilindru din oțel inoxidabil cu diametrul de: 8mm exterior, interior 6mm, 10mm înălțime.

Mediile de cultura folosite au fost :

- Antibiotic Medium No.IV (Himedia),
- Antibiotic Medium No. VII (Himedia).

Microorganismul test utilizat a fost:

- *Micrococcus luteus* ATCC 9341

o suspensie bacteriana preparata așa cum este descris în instrucțiunile de laborator. Standardul antimicrobian a fost furnizat de Sigma.

Potența eritromicinei standard este de **916 UI/mg** activitate microbiologica raportata la substanta uscata, așa cum se menționează în Farmacopeea Europeană, și a fost verificată fata de substanța de referință, Erythromycin CRS.

Potența eritromicinei, materie primă pentru Mastiker, furnizata de Century Pharmaceutical India, e de **998 UI/mg**, activitate microbiologica raportata la substanta uscata.

Solventul utilizat în extracția eritromicinei și prepararea soluției stoc a fost Metanol: apă 4: 1.

Soluția tampon utilizată în extracția eritromicinei și prepararea diluțiilor de lucru a fost 0.05 M phosphate buffer pH = 8.

Prepararea soluției standard:

- predilutie 40 mg / 25 ml,
- diluții de lucru: 25 IU, 50 IU, 100 IU /ml.

Prepararea soluției:

- proba: 3g Mastiker / 100ml extract,
- predilutie 37,5mg / 25ml,
- diluții de lucru: 25 IU/, 50IU/, 100 IU/ml.
- pH-ul mediului final (± 0.1 pH unit) = 7,9.
- temperatura de incubare = 30-37°C.
- variația temp. la termostatare = $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

S-a observat creșterea microorganismului după incubare.

În testul de difuzie în agar, parametrul utilizat este diametrul zonei de inhibiție formată în jurul discului, după incubare.

Au fost măsurate diametrele zonelor de inhibiție circulare formate, cu o precizie corespunzătoare (cel puțin 0,1 mm) și s-a determinat potența eritromicinei folosind metode statistice (8).

Cele trei diluții de probă și standard au fost aplicate conform schemei de randomizare.

Diametrele zonelor de inhibiție direct proporționale cu logaritmul concentrației de eritromicina au fost calculate folosind metode statistice cu Softul CombiStats, versiunea 5.0/11 martie 2013, Direcția Europeană pentru calitatea produselor medicamentoase, Consiliul European (2, 9, 11).

CombiStats Soft este în conformitate cu monografia Microbiological assay of antibiotics și

monografia Statistical analysis of results of biological assays, Ediția a-9-a (2, 9).

Datele noastre experimentale au fost analizate cu metoda liniilor paralele, și calculate cu 95% limita de încredere ($P = 0,95$).

Relația dintre logaritmul concentrației de eritromicina și diametrul zonelor de inhibiție a fost reprezentat grafic printr-o linie dreaptă ce corespunde intervalului de concentrații utilizate.

Testul s-a efectuat cu opțiunea "Randomised blocked" deoarece fiecare placă poate fi identificată ca o sursă de variație.

A fost utilizat, în mod constant, un pas de diluare cu un factor = 2, în creștere.

În testele cu răspunsuri cantitative, reziduurile observate sunt în mod normal utilizate pentru a estima variația reziduală.

Testul este valid dacă limitele de încredere ($P = 0,95$) sunt între 50-200% din potența estimată, iar potența estimată este între 95-105% din potența declarată.

Potența declarată trebuie să fie de minim 50.000 UI/g (2, 9, 13).

Procedura de validare include detalii privind:

- protocolul de lucru pentru determinarea potenței eritromicinei,
- criteriile de validare,
- rezultatele experimentale,
- modelarea matematică pt. determinarea potenței și
- comparații inter-laboratoare.

2. Rezultate și Discuții

2.1. Validarea Mastiker Seria Nr 3, Combistats Version 5.0

ComStat Version 5.0. Tuesday, 15 November 2016, 10:52:27 [+02:00]. Page 1 of 2



Substance	Erytromycin
Method	agar diffusion
Assay number	1
Technician	Viviana Ciuca
Date of assay	08.11.2016

Remarks: Mastiker, batch no.3

Standard			
Id.	Erytromycin		
Ass. pot.	916 IU/mg		
Pre-dil. 1	40mg/25ml		
Doses	S1	S2	S3
(1)	231	245	276
(2)	235	257	265
(3)	229	255	270
(4)	224	252	268
(5)	230	250	272
(6)	237	248	280

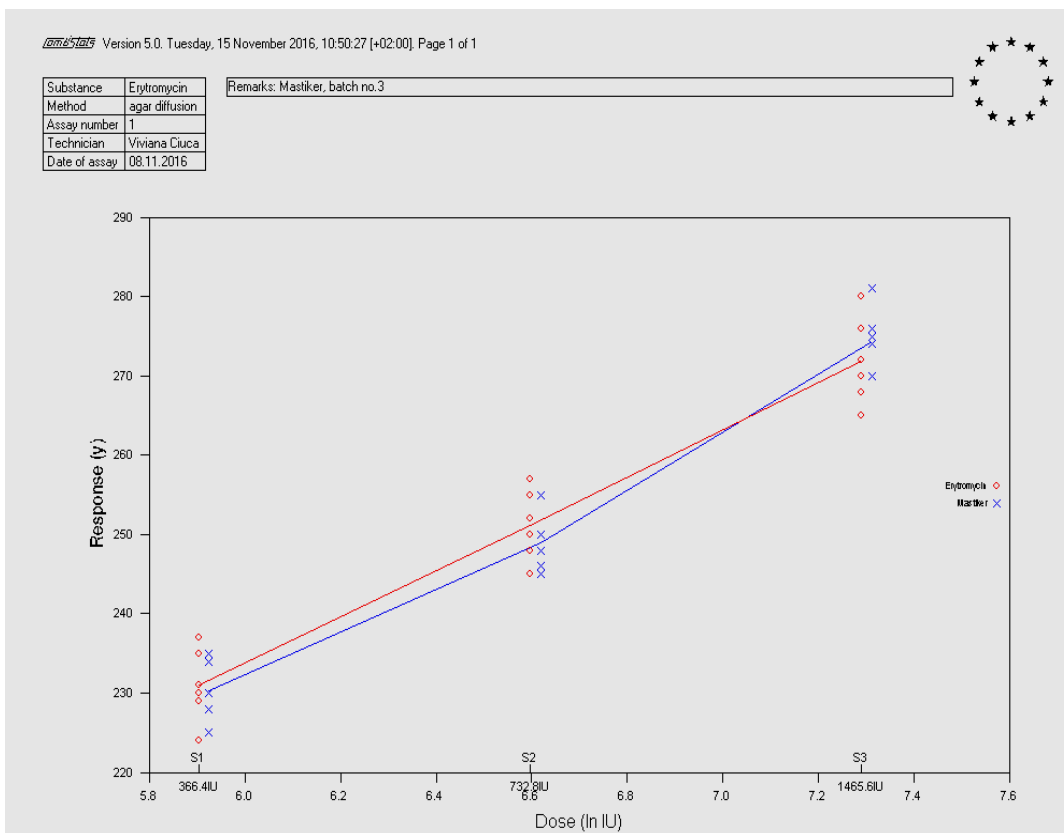
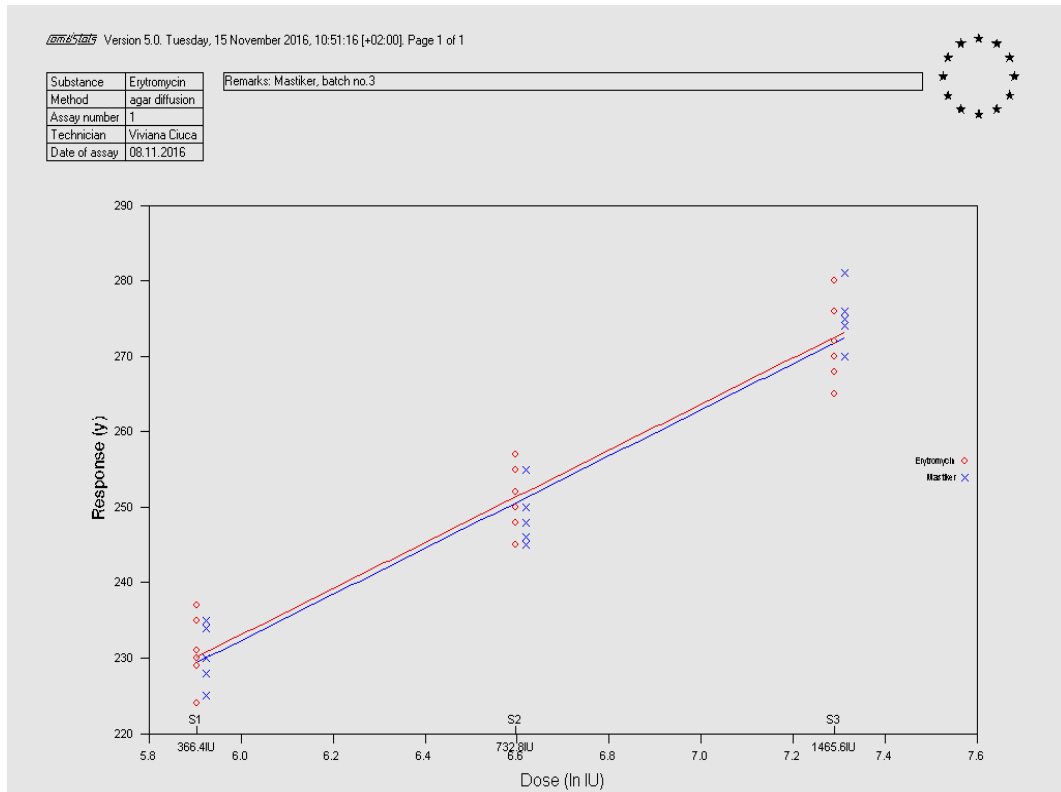
Sample 1			
Id.	Mastiker		
Ass. pot.	998IU/mg		
Pre-dil. 1	37.5mg/25ml		
Doses	T1	T2	T3
(1)	230	250	281
(2)	225	255	270
(3)	228	245	274
(4)	230	250	276
(5)	234	248	275
(6)	235	246	270

Model: Parallel lines
 Design: Randomised block
 Transformation: $y' = y$
 Variance: Observed residuals
 Dilution step (Increasing): 2

Common slope(factor) = 30.5972 (28.2627 to 32.9317)
 Correlation |r|: 0.973475

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.111111	0.111111	0.005	0.943
Regression	1	10795.0	10795.0	501.214	0.000 (****)
Non-parallelism	1	15.0417	15.0417	0.698	0.411
Non-linearity	2	44.6944	22.3472	1.038	0.369
Standard	1	0.250000	0.250000	0.012	0.915
Sample 1	1	44.4444	44.4444	2.064	0.163
Quadratic curvature	1	25.6806	25.6806	1.192	0.285
Lack of quadratic fit	1	19.0139	19.0139	0.883	0.356
Treatments	5	10854.9	2170.98	100.799	0.000 (****)
Blocks	5	33.8889	6.77778	0.315	0.899
Residual error	25	538.444	21.5378		
Total	35	11427.2	326.492		

Sample 1			
Id.	Mastiker		
(IU/mg)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	876.836	973.525	1080.81
Rel. to Ass.	87.9%	97.5%	108.3%
Rel. to Est.	90.1%	100.0%	111.0%



Tabelul 1 include rezultatele metodei de determinare a potenței eritromicinei pentru trei serii consecutive de Mastiker.

Testul este valid dacă limitele de încredere ($P = 0,95$) sunt între 50-200% din potența

estimată, iar potența estimată este între 99-105% din potența declarată.

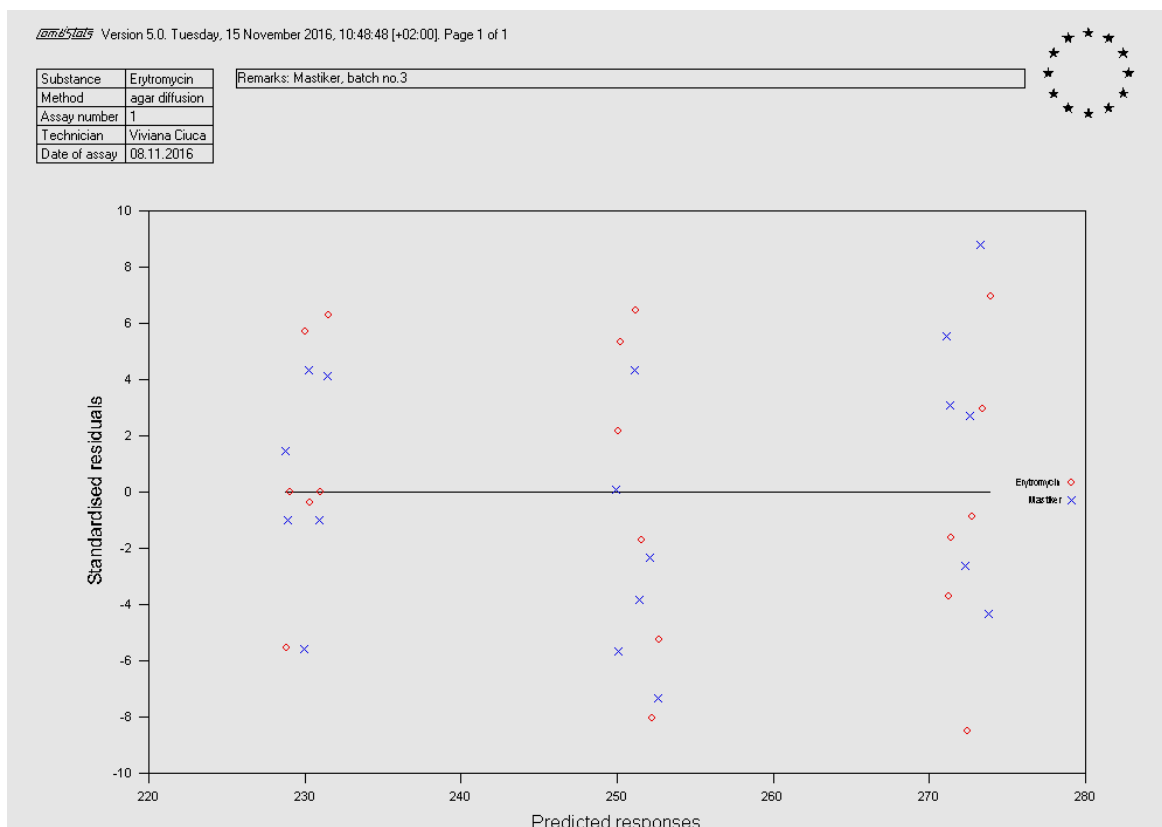
Potența declarată nu este mai mică de **50.000UI / g.**

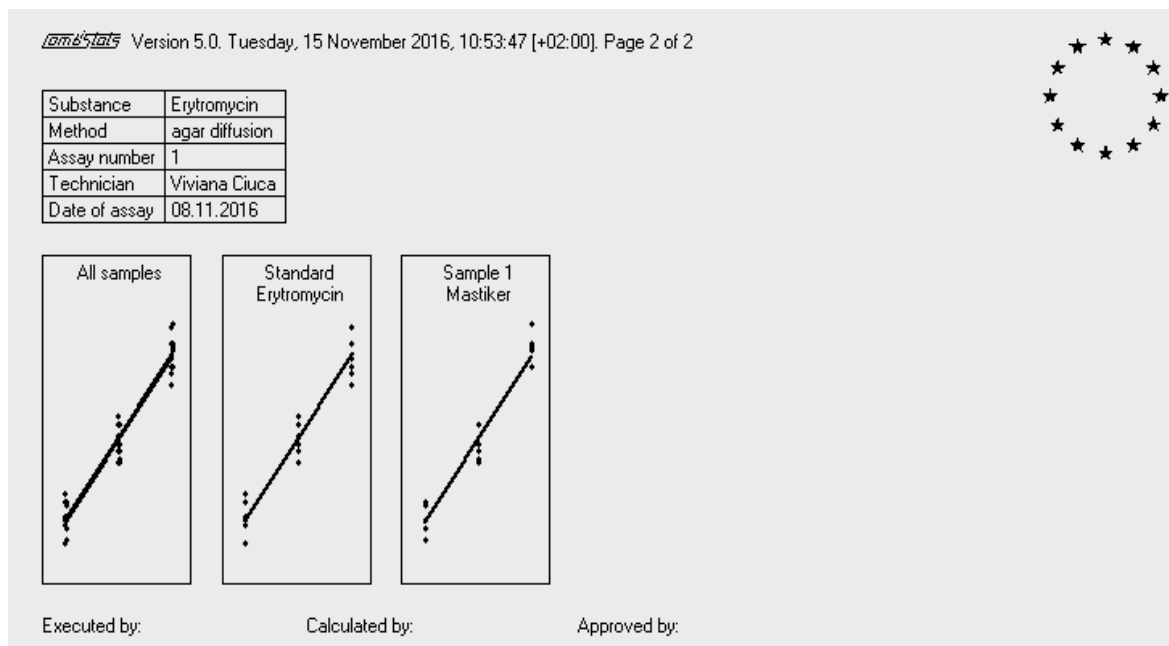
Tabel 1.

Validarea metodei pe trei serii consecutive

POS.	Produs	Seria	LIMITE	REZULTATE	
				Control Calitate Laborator- Pasteur Bucuresti	Control Calitate Laborator- Pasteur Filipesti
065	Mastiker E	3	50%≤LC≤200% 95%≤EP≤105%	LC = 87.9 – 108.3% EP = 97.5%	LC = 85.1 – 110.8% EP = 97.9%
065	Mastiker E	4	50%≤LC≤200% 95%≤EP≤105%	LC = 88.1 – 103.0% EP = 96.8%	LC = 80.7 – 113.0% EP = 97.5%
065	Mastiker E	5	50%≤LC≤200% 95%≤EP≤105%	LC = 84.7– 109.8% EP = 97.3%	LC = 86.8– 119.1% EP = 98.1%

LC = limita de confidență ,
EP = potența estimată





3. Concluzii

Determinarea potenței eritromicinei din Mastiker, prin compararea diametrelor zonelor circulare de inhibiție produse de o serie de diluții ale produsului Mastiker, cu cele produse de un standard de referință calibrat în unități internaționale, este o metodă analitică adecvată, reproductibilă și îndeplinește cerințele de calitate ale produsului.

Precizia testului este de așa natură încât limitele erorii de reper al potenței estimate ($P=0,95$) nu este mai mic de 95% și nu mai mult de 105% din potența estimată.

Testul este considerat valid, rezultatele obținute pentru fiecare parametru de validare se încadrează în criteriile de admisibilitate (2, 9, 11)

Bibliografie

1. **Anghelescu M** (1998). Terapia cu antibiotice. Ed. Medicală, București 70-73.
2. **Daas A** (2013). The Combistats User Manual, EDQM – Council of Europe.
3. **Cristina RT** (2006). Introducere în farmacologia și terapia veterinară, Editura Solness, Timișoara, pp. 385-425
4. **Cristina RT, Teușdea V** (2008). Ghid de farmacie și terapeutică veterinară Brumar Timisoara, pp. 23-30.
5. **Crivineanu M** (2005). Farmacologie veterinară. Ed. Fundis, București, pp. 116-117.
6. Drugs A to Z - Erythromycin. Available at: <https://www.drug.com>
7. **Glick D, Kersey RC, Fink FC** (2006). Microbiological assay of antibiotics. In: Methods of Biochemical Analysis, Volume 1 (Ed. D Glick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470110171.ch3
8. **European Pharmacopoeia** Monographs 9th Edition – Microbiological assay of antibiotics.
9. **European Pharmacopoeia** Monographs 9th Edition – Statistical analysis of results of biological assays and tests.
10. **Macrolides**. Available at: <http://en.wikipedia.org/wiki/Macrolide>
11. **Sovasia N, Arshad H** (2016). Microbial Assay of Antibiotics. PharmaTutor Magazine (ISSN 2347-7881). On line Article, Reference Id: PHARMATUTOR-ART-1560. Available at: <http://www.pharmatutor.org/articles/microbial-assay-antibiotics>
12. **Stroescu V** (1998). Bazele farmacologice ale practicii medicale. Ed. Medicală, București pp: 1288-1291
13. **The International Pharmacopoeia** (2015). Fifth Edition, Microbiological assay of antibiotics