



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

РегЛек – ЕАЭС



Совершенствование подхода к микробиологическому анализу лекарственных средств на основе гармонизации в фармакопее ЕАЭС требований к их качеству.

д.ф.н. Гунар О.В. начальник
лаборатории микробиологии

26 мая 2021год

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«**Научный центр экспертизы средств медицинского применения**»
Министерства здравоохранения Российской Федерации



Микробиологический анализ

подтверждает качество и безопасность ЛС,
о необходимости доказательства которых
требуется ФЗ №61

**«Об обращении лекарственных средств»,
а также часть государственной политики по
развитию фармацевтической
промышленности на период до 2030 года,**

**в которой говорится о национальной
лекарственной безопасности.**



Опасность загрязнения лекарственных средств микроорганизмами



1 Изменение физико-химических свойств ЛС

2 Передача и распространение устойчивых форм микроорганизмов

3 Снижение или отсутствие терапевтического действия препарата

4 Заболевания, побочные реакции, вызванные токсигенными, аллергенными, канцерогенными свойствами микроорганизмов и их метаболитов



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

РегЛек – ЕАЭС



Испытания стерильности ЛП проводят в соответствии с
ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» ГФ РФ текущего изд.

Анализ микробиологической чистоты ЛС – по
ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» ГФ РФ.



ОФС.1.2.4.0003.15

Стерильность

ОФС.1.2.4.0002.18

**Микробиологическая
чистота**

**Микробиологические
методы**

ГФ РФ XIV изд.

ОФС.1.2.4.0012.15

**Определение
содержания
витаминов**

ОФС.1.2.4.0011.15

**Эффективность
антимикробных
консервантов**



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

РегЛек – ЕАЭС



Гармонизация требований и методов анализа качества ЛС по микробиологическим показателям с ведущими мировыми фармакопеями и фармакопеями государств-членов ЕАЭС



Региональная Фармакопея ЕАЭС

с 01 марта 2021 года

• **ОФС.1.2.4.0003.15**
Стерильность



• **2.1.6.1. Стерильность**

• **ОФС.1.2.4.0002.18**
**Микробиологическая
чистота**



• **2.3.1.2. Требования к микробиологической чистоте ЛП, ФС и вспомогательных веществ для их производства;**

• **2.3.1.4. Требования к микробиологической чистоте растительных ЛС**

• **2.1.6.6. Микробиологические испытания НЛС общее количество жизнеспособных аэробных микроорганизмов**

• **2.1.6.7. Микробиологические испытания НЛС на наличие отдельных видов микроорганизмов**

• **2.1.6.9. Микробиологические испытания ЛП растительного происхождения для приема внутрь и сырья, используемого для их получения**

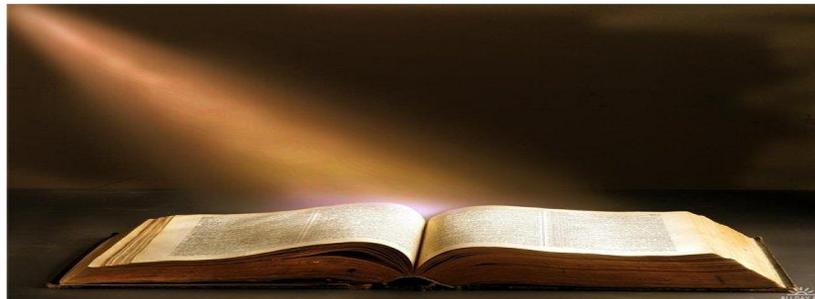
ОФС.1.1.0021.18
**Валидация микробиологических
методик**



Критерии микробиологического качества для ЛП и ФС, утвержденные ГФ РФ XIV изд. и в Фармакопее ЕАЭС, имеют цифровую аббревиатуру, однако нет жесткого требования их использования.

2.3.1.2. Требования к микробиологической чистоте лекарственных препаратов, фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ для их производства.

2.3.1.4. Требования к микробиологической чистоте фармацевтических субстанций растительного происхождения, лекарственных растительных препаратов и экстрактов, используемых для их получения.



2

- Для применения местно (на слизистую рта, десны и др.), наружно (на неповрежденные кожные покровы), интравагинально
- Для введения в полости уха, носа
- Респираторно (для ингаляций)
- Трансдермальные пластыри

За исключением тех лекарственных препаратов, которые должны быть стерильными

- **Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^2 КОЕ** в 1 г (мл) препарата или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу)
- **Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^1 КОЕ** в 1 г (мл) или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу)
- Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) препарата или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу)
- Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл) препарата или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу)
- Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в (мл) препаратов, используемых респираторно
- Отсутствие *Candida albicans* в 1 г (мл) интравагинальных препаратов

3

А. Для приема внутрь или введения ректально за исключением тех ЛП, которые должны быть стерильными

Твердые (неводные) препараты для приема внутрь

- Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г
- Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г
- Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г

Препараты для введения ректально

- Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл)
- Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)

Растворы для приема внутрь

- Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^2 КОЕ в 1 мл
- Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^1 КОЕ в 1 мл
- Отсутствие *Escherichia coli* в 1мл

<p>А. Стерильных лекарственных препаратов, которые не подвергаются стерилизации</p>	<p>Субстанции должны быть стерильными</p>
<p>Б.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Стерильных лекарственных препаратов, которые подвергаются стерилизации в упаковке; – Стерильных лекарственных препаратов, при производстве/изготовлении которых для обеспечения стерильности используется стерилизующая фильтрация; – Нестерильных лекарственных препаратов, относящихся к категории 2 	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов- не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^1 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл)



К категориям 1.2.Б и 5.2.Б могут быть отнесены термолабильные субстанции, которые используются в производстве стерильных лекарственных препаратов, не подвергающихся стерилизации в окончательной упаковке. Такие субстанции не могут быть подвержены термической стерилизации ввиду особенностей их строения и физико-химических свойств.

В этом случае, в процессе производства ЛП допускается использование стерилизующей фильтрации раствора субстанции или раствора субстанции со вспомогательными веществами.

Стерилизующую фильтрацию проводят согласно ОФС «Стерилизация».



- ❑ По требованиям ОФС «Микробиологическая чистота» для анализа требуется образец массой (объемом) **от 10 до 45 г (мл)**.
- ❑ Зарубежные фармакопеи, такие как Европейская, Японская, Британская, Международная, Фармакопея США, предусматривают возможность уменьшения количества анализируемого образца:
 - ✓ в случае, когда количество вещества ограничено, или размер серии крайне мал (менее 1000 г (мл)), для анализа может быть отобран **1% от серии**.
 - ✓ если количество в дозированной форме (таблетке, капсуле, инъекциях) не более 1 мг или количество на г (мл) (для недозированных препаратов) менее чем 1 мг, образец для анализа может составлять не меньше содержимого **10 единиц или 10 г (мл)** продукта;
 - ✓ если общий размер серии менее 200 единиц (например, ЛС используется в клинических испытаниях), количество образца для анализа может быть уменьшено **до 1-2 единиц**.



Методический подход к анализу микробиологической чистоты
отдельных групп
нестерильных лекарственных средств, на примере ЛС:

- биотехнологического производства,
- препаратов таргетной терапии,
- гомеопатических матричных настоек,
- отдельных фармацевтических субстанций.



Факторы, обосновывающие необходимость снижения количества образца для анализа микробиологической чистоты

№	Факторы, влияющие на количество образца	Критерии
1	Характеристики процесса производства	Сложный высокочувствительный процесс производства, например, биотехнологический
2	Статус НЛС	Например, орфанные ЛП. Список высокочувствительных нозологий (ФЗ от 21.11.2011 N 323-ФЗ (ред. от 22.12.2020) "Об основах охраны здоровья граждан в РФ», Приказ МЗ РФ от 15.02.2013 №69н (ред.от 10.04.2015))
3	Объем серии	Малый - менее 1 кг (л)
4	Количество субстанции в ГЛС	Малое - менее 1%



Требования к качеству и количеству анализируемого образца

Применение	Критерии приемлемости	Количество образца	
		по ГФХIV	Минимально количество
ЛП для приема внутрь и субстанции для их изготовления	ГФ РФ (категория 2.2, 3А) - не более 10^3 КОЕ/г аэробных микроорганизмов - не более 10^2 КОЕ/г дрожжевых, плесневых грибов - отсутствие <i>E. coli</i>	10 г	1,4 г
Субстанции для производства стерильных ЛС	ГФ РФ (категория 1.2Б) - не более 10^2 КОЕ /г аэробных микроорганизмов - отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи 1г - отсутствие <i>P.aeruginosa</i> , <i>St.aureus</i> – в 1г	20 г	2,4 г
Гомеопатические матричные настойки	ГФ РФ (категория 3.2) - не более 10^4 КОЕ/мл аэробных микроорганизмов - не более 10^2 КОЕ/мл др. и плесневых грибов - энтеробактерий, устойчивых к желчи- 10^2 КОЕ/мл - отсутствие <i>E.coli</i> , <i>St.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> в 1мл - отсутствие <i>Salmonella</i> в 25 мл Индивидуальные нормы(по модифицированной методике) : - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 1 мл	45 мл	2,5 мл



Разработка методики определения микробиологической чистоты с учетом особенностей НЛС и условий проведения испытания





Валидационное исследование методики оценки микробиологической чистоты с использованием уменьшенного количества образца

Параметры	Критерии	Результаты
Правильность	Критерий Стьюдента (t) менее 4,3	0-3,3
	Процент восстановления более 70%	70-100%
Повторяемость	Коэффициент вариации не должен превышать 35%	3-12%
Устойчивость	Критерий Фишера (F) не должен превышать 19,0	Находится в диапазоне 1,0-11,6
Линейность	Коэффициент корреляции (R^2) должен быть больше 0,9	При внесении и выделении микроорганизмов $R^2 \geq 0,9$
Специфичность	Необходимо показать, что разработанной методикой возможно выделить специфические бактерии.	Доказана возможность выделения <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>Salmonella spp.</i>



Апробация и валидация разработанной методики

выполнена на 45 наименованиях ЛП, для которых обосновано снижение количества образца, по параметрам, указанным в ОФС. Показано, что все параметры отвечают заданным критериям приемлемости.

Доказана применимость разработанной методики!!!

Получены патенты на изобретения:

№ 2596399 «Способ определения микробиологической чистоты фарм. субстанции, произведенной биотехнологическим путем»

№ 2596395 «Способ определения микробиологической чистоты лекарственных средств таргетной терапии»



Особенности оценки стерильности отдельных групп лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов (БМКП).

Параметр сравнения	Стандартная методика испытания (ГФ ОФС «Стерильность», ЕФ ст. 2.6.1)	Методика анализа клеточных продуктов (ЕФ текущего изд. , ст. 2.6.27)
Объем образца		
$V \geq 10$	1/2 содержимого контейнера, но не менее 1 мл (для упаковок более 40 мл – не менее 20 мл)	1% от общего объема
$1 \leq V < 10$		100 мкл
$V < 1$	Все содержимое контейнера	Неприменимо
Методика посева	– Мембранная фильтрация – Прямой посев	-Прямой посев - Альтернативные методики
Питательные среды	Жидкая тиогликолевая среда и соево-казеиновый бульон	Минимум две подходящие питательные среды
Условия инкубации	Аэробные	Аэробные и анаэробные
Температура инкубации	Тиогликолевая среда–30- 35°C; соево-казеиновый бульон – 20-25°C	От 20-25 до 35-37°C в зависимости от используемой питательной среды и способа детекции результатов
Время инкубации	14 суток	14 суток – визуально, 7 суток при автоматической детекции роста



Определение стерильности биомедицинских клеточных продуктов (БМКП)

- Фармакопея США (статья <1046>)
- Европейская фармакопея 9 изд. (статья 2.6.27),
- Отдельные руководства (например, 21 CFR 610.12)

При оценке стерильности используют:

культуральные методы (прямого посева на питательные среды), описанные в утвержденной нормативной документации, а также **альтернативные методики на основе автоматических систем** при условии их валидации



Виды альтернативных микробиологических методик по сущности технологии

Согласно ст.5.1.6 Европейской фармакопеи методики бывают:

- основанные на детекции роста клетки (АТФ-билюминесценция, колориметрическое определение измерение потребленного или образовавшегося газа, электрохимические методы);
- прямого определения (проточная и твердофазная цитометрия);
- основанные на компонентном анализе клетки (амплификация нуклеиновых кислот, анализ состава жирных кислот).

Альтернативный метод	Примеры оборудования
Электрохимические методы (импенданс-технология)	<ul style="list-style-type: none"> •VacTrac (Sy-Lab, Австрия), •Rabit «Don Whitley Scientific Limited» (Великобритания), •Bactometer (Biomerieux, Франция)
АТФ – билюминесценция	<ul style="list-style-type: none"> •Milliflex® Rapid System (Merck), •AkuScreen (Celsis, США)
Измерение образовавшегося газа	<ul style="list-style-type: none"> •VacT/ALERT (Biomerieux, Франция), •BACTEC (Becton Dickinson, США)
Микрокалориметрия	TAM III, TAM 48 и др. «TA Instruments»
Проточная цитометрия	<ul style="list-style-type: none"> •BactiFlow (Biomerieux, Франция), •CyAn™ ADP (Becton Dickinson, США), •FACSCalibur (Becton Dickinson, США)
Твердофазная цитометрия	•ChemScan RDI (Biomerieux, Франция)
Эпифлуоресцентная микроскопия	•Milliflex® Quantum Rapid Detection System (Merck Германия)



Альтернативные методы определения стерильности ЛП и БМКП

Наиболее близким к фармакопейным методам испытания является способ, основанный на обнаружении диоксида углерода в среде культивирования



Описанный принцип реализован в системах:

ВаcT/ALERT (Biomérieux, Франция),
BACTEC (Becton Dickinson, США),
VersaTREK (Thermo Fisher Scientific, США).

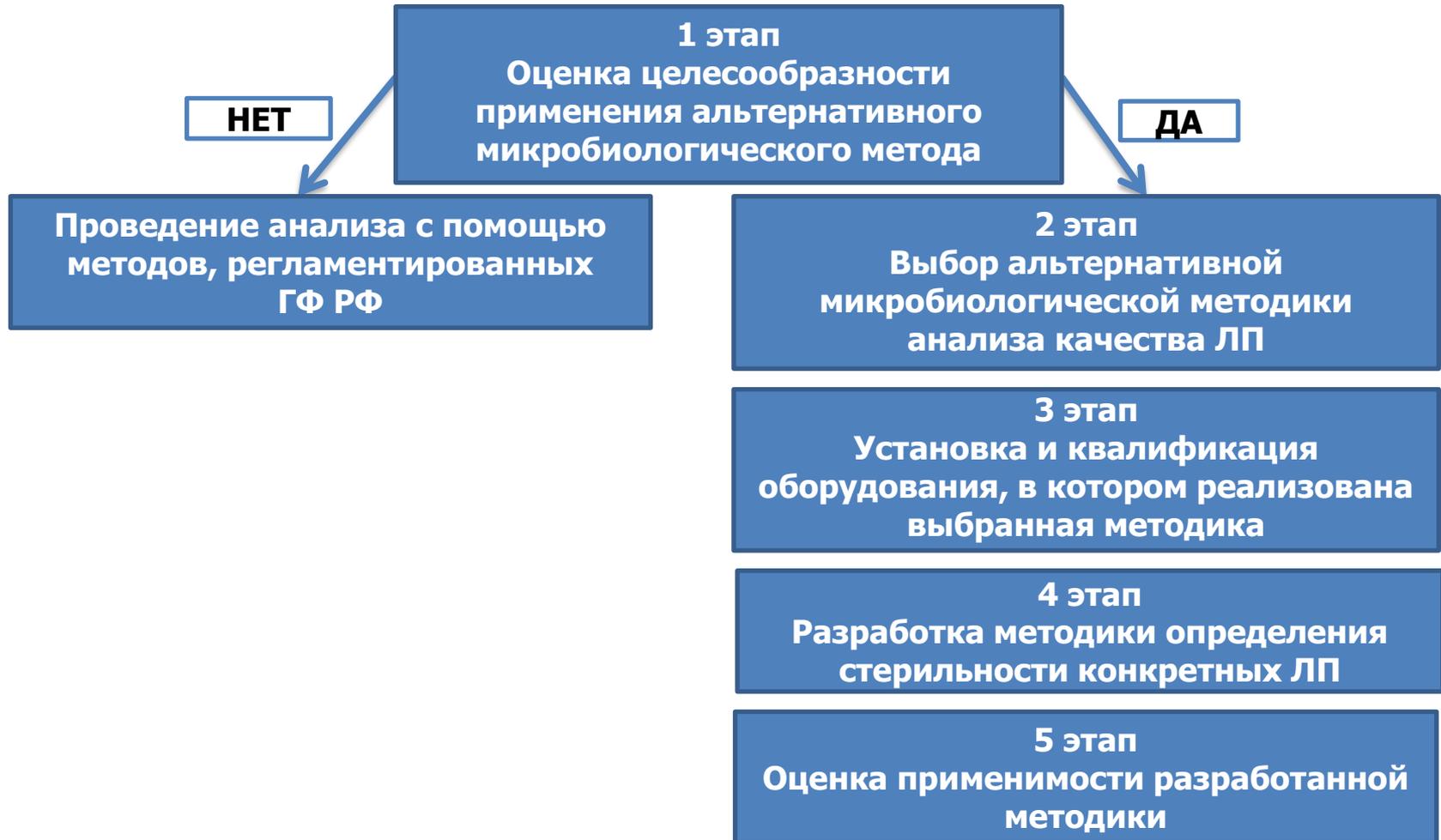


Сравнение автоматизированных систем и стандартного способа

Метод / система для определения	Вероятность выявления контаминации	Вероятность получения ложноположительных результатов	Среднее время и диапазон определения, ч
Стандартный культуральный метод посева	72%	7,3%	87 (24 – 264)
ВасТ/ALERT, Франция	82%	0,0%	24 (12 – 54)
ВАСТЕС, США	93%	0,8%	33 (12 – 80)



Схема выбора и внедрения альтернативных методов определения стерильности ЛП





Основные факторы, влияющие на проведение испытаний качества ЛП с помощью системы ВасТ/ALERT:

- Количество образца для анализа.
- Продолжительность инкубационного периода.



Результаты валидации альтернативной методики оценки стерильности ЛП

Параметры	Критерии	Результаты
1.Правильность	$\geq 70\%$	$\geq 86,7\%$
2.Внутрилабораторная прецизионность	Коэффициент вариации $\leq 35\%$	$\leq 28,3\%$
3.Предел обнаружения	Минимальное КОЕ должно быть не выше, чем для фармакопейного метода	≤ 27 КОЕ/10 мл (для фармакопейного метода ≤ 91 КОЕ/10 мл)
4.Устойчивость	Коэффициент вариации $\leq 35\%$	$\leq 28,3\%$



Благодарю за внимание!

РегЛек – ЕАЭС

