

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Утверждено
Решением Ученого совета
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России
«27» декабря 2022 года (протокол № 5)

Методические рекомендации
«Порядок проведения испытания биологических лекарственных
препаратов на стерильность»

Москва 2022 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Главный эксперт лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП канд. биол. наук	19.09.2022	З.Е.Бердникова
Эксперт 1 категории лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП	19.09.2022	А.С.Тихонова
Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП д-р мед. наук, проф.	19.09.2022	А.А. Мовсесянц
Начальник лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП канд. биол. наук	19.09.2022	С.М.Суханова

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	644
ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	645
ВВЕДЕНИЕ.....	648
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	649
1 Общие положения	649
2 Порядок и условия проведения испытания.....	649
3 Методы испытания стерильности	650
4 Правила отбора образцов препарата на стерильность	653
5 Питательные среды	654
6 Приготовление питательных сред.....	654
7 Стерильность питательных сред	655
8 Определение ростовых свойств питательных сред	655
9 Подготовка тест-штаммов микроорганизмов	655
10 Приготовление инокулята.....	656
11 Определение нейтрализующих свойств тиогликолевой среды.....	657
12 Условия хранения питательных сред.....	657
13 Жидкости, используемые для растворения, разведения препарата и промывания мембранных фильтров.....	658
14 Проверка пригодности методики испытания (определение антимикробного действия).....	658
15 Испытание на стерильность методом прямого посева. Порядок разработки методики испытания на стерильность	662
16 Особенности испытания живых бактериальных вакцин	665
17 Испытания на стерильность методом мембранной фильтрации. Порядок разработки методики испытания на стерильность	666
18 Учет и интерпретация результатов испытания на стерильность	669

19 Требования к содержанию раздела нормативной документации по показателю «Стерильность» при проведении испытания методом прямого посева.....	671
20 Требования к материалам регистрационного досье по показателю «Стерильность» при проведении испытания методом прямого посева....	673
21 Требования к содержанию раздела нормативной документации по показателю «Стерильность» при проведении испытания методом мембранной фильтрации	674
22 Требования к материалам регистрационного досье по показателю «Стерильность» при проведении испытания методом мембранной фильтрации	674
23 Требования к предоставляемым сведениям по питательным средам в разделе НД и материалах регистрационного досье.....	676
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	679
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	680
Приложение 1	681
Приложение 2	683
Приложение 3	684
Приложение 4	685
Приложение 5	687

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

Настоящие методические рекомендации разработаны в соответствии с требованиями следующих нормативных документов:

– Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 77 «Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

– Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

– ОФС 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд. Т.1; М.; 2018 р.

– Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств. Приложение №1 Асептическое производство Приказ Минпромторга России от 14 июня 2013 г. № 916.

– Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды, ч.2 Требования к контролю и мониторингу для подтверждения постоянного соответствия ГОСТ Р ИСО 14644-2 (EN ISO 14644-2)

ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем документе используются следующие термины и определения:

- Лекарственный препарат – вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий.
- Биологические лекарственные препараты – лекарственные препараты, действующее вещество которых произведено или выделено из биологического источника и для определения свойств и качества которых необходима комбинация биологических и физико-химических методов
- Исходное сырье – материалы, применяемые в технологическом производственном процессе (штаммы, вирусной посевной материал, культура клеток, банк-клеток и другие, а также вспомогательные вещества и консерванты)
- Внутрипроизводственный контроль – испытания, проводимые в процессе производства
- Тест-штамм микроорганизма – эталонная чистая культура микроорганизма данного вида, которая имеет характерные физиологические, морфологические и биохимические свойства.
- Конидии или – это неподвижные споры бесполого

конидиоспоры	размножения грибов
Метод	– это способ установления качества лекарственного препарата. Совокупность теоретических и практических приемов, правил, требований и операций с помощью которых достигаются объективные результаты испытания
Методика	– детали приемы и особенности, применяемые к выбранному методу, доведение его до инструкции или алгоритма. Совокупность способов и приемов исследования, порядок их применения и интерпретация полученных с их помощью результатов.
ОФС	– общая фармакопейная статья
НД	– нормативная документация
Питательные среды	– биологические препараты, содержащие соединения сложного или простого состава, предназначенные для выявления, накопления, культивирования, дифференциальной диагностики, транспортировки и хранения микроорганизмов.
Разведение культуры	– величина, указывающая во сколько раз была разведена суспензия культуры (например, 10^6 , 10^7 и т.д.) в отношении исходной, соответствующей 10 единицам по стандартному образцу мутности (ФСО 3.1.00085).
Стандартный образец мутности	– предназначен для стандартизации бактериальных взвесей визуальным методом и обеспечения единства определения концентрации микробных клеток в бактериальных взвесах при микробиологических исследованиях. СО мутности аттестован с использованием 5-го Международного стандартного образца мутности ВОЗ (№76/522), одна международная единица которого

Ростовые свойства питательной среды	<p>соответствует мутности взвеси коклюшных бактерий, содержащей $1,1 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл.</p> <p>– способность питательной среды обеспечивать эффективный и типичный рост микроорганизмов, подтвержденный с использованием тест-штаммов.</p>
Нейтрализующие свойства среды	<p>– способность питательной среды нейтрализовать действие консервантов, т.е. обеспечивать 100 %-ное прорастание засеянной культуры.</p>
Микроорганизмы	<p>– (микробы) - мельчайшие, преимущественно одноклеточные организмы, видимые только в микроскоп: бактерии, микроскопические грибы и водоросли, простейшие.</p>

ВВЕДЕНИЕ

Испытание на стерильность – это тест, проводимый *in vitro* на наличие посторонних бактерий и грибов.

Отсутствие контаминации является одним из основных показателей биологической безопасности лекарственных препаратов, поскольку микробное загрязнение может привести не только к снижению эффективности препаратов, но и вызвать нежелательные реакции у пациентов.

Гарантией выпуска качественной продукции, является строгое соблюдение правил надлежащей производственной практики, включающей использование высокочувствительных методов, позволяющих получать достоверные, воспроизводимые результаты по выявлению микроорганизмов в исследуемых образцах.

В настоящее время в соответствии с требованиями ГФ РФ выявление возможного микробиологического загрязнения БЛП бактериями и грибами проводят методами, изложенными в ОФС «Стерильность». Учитывая расширение спектра производства современных БЛП и их особенности, обусловленные использованием сырья биологического происхождения и свойствами препаратов, содержащих белковые компоненты, являющиеся благоприятной средой для роста и размножения микроорганизмов-контаминантов, подтверждение их микробиологической безопасности требует особого внимания в системе оценки качества и относится к наиболее сложному и ответственному контролю. Указанные факторы, включая возможное наличие в составе БЛП вспомогательных веществ, консервантов и стабилизаторов, влияющих на правильность оценки качества, обуславливают необходимость разработки на основе фармакопейного метода специальной методики (методик) выявления контаминации для каждого препарата.

Целью подготовки настоящих рекомендаций послужила необходимость разработки методических подходов к порядку проведения испытания на стерильность различных по своим свойствам БЛП.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Общие положения

Методические рекомендации устанавливают порядок проведения испытания на стерильность для субстанций, вспомогательных веществ, промежуточных продуктов, готового препарата до розлива (полуфабрикат), готовой формы БЛП и их растворителей, к которым предъявляется требование стерильности. Рассматриваются особенности и методические приемы разработки адекватной методики испытания БЛП. Выделены наиболее характерные свойства препаратов и факторы, связанные с природой или составом испытуемого материала, которые необходимо учитывать при выборе метода, и верификации методики испытания (определение антимикробного действия) с целью дальнейшего ее использования при проведении контроля на стерильность в соответствующих условиях испытания.

Настоящие рекомендации разработаны и подготовлены в ИЦ МИБП и могут служить в качестве руководства по проведению испытания на стерильность БЛП.

2 Порядок и условия проведения испытания

Испытание на стерильность проводят в асептических условиях в зоне класса чистоты «А», используя боксы биологической безопасности (ламинарные установки), изоляторы, классифицированные чистые помещения, предназначенные только для испытания стерильности¹.

Чистые помещения и чистые зоны должны быть аттестованы и классифицированы. Класс чистоты необходимо регулярно подтверждать при аттестации, методами, установленными нормативными правовыми актами Российской Федерации. (Указания по проведению испытаний для

¹ Использование указанных помещений для проведения испытания живых бактериальных вакцин и работы с живыми культурами вакцинных штаммов не рекомендовано.

подтверждения постоянного соответствия заданному классу чистоты приведены в стандарте ГОСТ Р ИСО 14644-2 (EN ISO 14644-2).

Мероприятия, направленные на обеспечение асептических условий и предотвращающие возможную контаминацию микроорганизмами и механическими частицами, не должны отрицательно воздействовать на испытываемые образцы и жизнеспособность выявляемых микроорганизмов.

Процедуру испытания, включая правила проведения испытания на стерильность методом прямого посева и методом мембранной фильтрации, поведение персонала в чистых помещениях, порядок уборки, дезинфицирующей обработки и мониторинг чистых помещений выполняют в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность», Приказа Минпромторга России от 14 июня 2013 г. N 916.

Процедуры проводят с использованием стерильных материалов и инструментов при соблюдении всех правил асептики.

Условия проведения испытания, обеспечивающие получение достоверных результатов, необходимо регулярно контролировать согласно требованиям асептического производства, руководствуясь Правилами организации и контроля качества стерильных лекарственных средств. (Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств. Приложение №1 Асептическое производство Приказ Минпромторга России от 14 июня 2013 г. N 916)

3 Методы испытания стерильности

Испытание на стерильность БЛП проводят в соответствии с требованиями действующего издания Государственной фармакопеи Российской Федерации методом прямого посева или методом мембранной фильтрации. Выбор метода зависит от физико-химических свойства препарата и его природы.

Метод мембранной фильтрации является предпочтительным для испытания большинства препаратов, в том числе, обладающих выраженным

антимикробным действием и его используют во всех случаях, когда природа препарата, его физико-химические свойства позволяют фильтровать его через мембранные фильтры. Использование метода мембранной фильтрации также целесообразно при испытании препаратов, расфасованных в емкости большого объема (более 10 мл), поскольку позволяет тестировать все содержимое первичной упаковки.

Принцип метода состоит в пропускании испытуемой пробы через мембранные фильтры для удержания микроорганизмов-контаминантов. После добавления питательных сред, стимулирующих рост микроорганизмов, удержанных на мембране и инкубации не менее 14 суток, проводят учет результатов.

Испытание данным методом выполняют с использованием фильтрационных установок открытого или закрытого типа, позволяющих в асептических условиях переносить и фильтровать испытуемый препарат через мембранные фильтры с внешним диаметром 47 мм и диаметром пор 0,45 мкм. Использование замкнутой системы, исключая воздействия оператора и внешней среды на испытуемый материал и мембранные фильтры более предпочтительно, поскольку значительно уменьшает риск случайного загрязнения. Испытание водных, масляных и слабых спиртовых растворов проводят, как правило, с использованием фильтров из нитратцеллюлозы.

Мембранные фильтры с гидрофобным краем и низкой сорбционной способностью, обеспечивающие эффективную отмывку мембраны и минимальную адсорбцию целесообразно использовать при испытании препаратов, содержащих антибиотики или их следы и обладающих антимикробным действием.

Для контроля условий тестирования, фильтруют предварительно проверенный стерильный раствор, например растворитель, с последующим воспроизведением всех вышеописанных операций.

Метод прямого посева исследуемого образца непосредственно в питательную среду используют, как правило, для препаратов или

материалов, испытание которых невозможно или экономически нецелесообразно выполнить методом мембранной фильтрации, не обладающих антимикробным действием или антимикробное действие которых можно устранить.

При этом для правильной интерпретации результатов испытания методом прямого посева материалов, вызывающих помутнение питательной среды (образцы, содержащие сорбент, микробные клетки и др.), когда визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов или возникают сомнения при предварительном учете результатов, на 5-7 сутки инкубации проводят пересев на аналогичную питательную среду (соотношение, как правило, 1:10 или 1:20) с последующей инкубацией посевов не менее 14 сут со дня первичного посева.

Наиболее рациональным подходом является разработка методик испытания БЛП на основе каждого из двух методов - прямого посева и мембранной фильтрации, позволяющая производителю расширить возможность выбора в зависимости от производственной необходимости, целесообразности использования в различных контрольных точках производственного цикла, а также наличия вспомогательных материалов.

При проведении испытания методом прямого посева или мембранной фильтрации параллельно проводят соответствующие отрицательные контроли. Стерильность всех используемых в испытаниях растворителей, жидкостей для смачивания и промывки мембранных фильтров должна быть предварительно подтверждена при проведении входного контроля. Схема проведения испытания стерильности приведена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Схема проведения испытания на стерильность

4 Правила отбора образцов препарата на стерильность

Для проведения испытания на стерильность готового препарата количество контролируемых емкостей первичных упаковок (образцов) определяют с учетом общего количества единиц в серии (выборка). Минимальное количество образцов рассчитывают в соответствии с

Приложением 2. Для посева на каждую питательную среду используют образцы в количестве, указанном в Приложении 3.

При проведении внутрипроизводственного контроля, количество контрольных точек, частота отбора проб, объем испытываемой пробы исходных, вспомогательных и промежуточных продуктов, количество препарата до розлива (полуфабрикат) и в процессе асептического розлива должны быть обоснованы результатами валидации производственного процесса, обеспечивающими и подтверждающими надежность контроля стерильности на всех этапах асептического производства.

5 Питательные среды

Для испытания на стерильность БЛП используют жидкие питательные среды: тиогликолевую среду – для выявления аэробных и анаэробных бактерий и соево-казеиновую среду – для выявления грибов и аэробных бактерий. Согласно ОФС «Стерильность» для выявления грибов также может быть использована жидкая среда Сабуро, однако для проведения испытания некоторых БЛП данная среда может быть не применима и ее использование не рекомендовано.

При испытании БЛП, в том числе, содержащих ртутные консерванты, допустимо использование тиогликолевой среды в качестве универсальной для выявления аэробных и анаэробных бактерий и грибов, при условии соответствия её ростовых и нейтрализующих свойств в отношении тест-штаммов микроорганизмов, указанных в Приложении 4. Инкубацию посевов в этом случае проводят при двух температурных режимах.

6 Приготовление питательных сред

Питательные среды готовят в лабораторных условиях, используя сухие питательные среды промышленного производства или отдельные компоненты. Питательные среды стерилизуют при температуре 121 °С в

течение 15 мин, если нет других указаний в нормативной документации.
Приложении 1

Питательные среды, приготовленные в лабораторных условиях проверяют на стерильность, а также на соответствие требуемому значению рН и ростовым свойствам в отношении тест-штаммов, указанных в Приложении 4.

7 Стерильность питательных сред

Каждая партия питательной среды должна быть проверена на стерильность. Образцы питательных сред после стерилизации в количестве 3-5% инкубируют при температуре $(32,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ и $(22,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ в течение не менее 14 сут. Рост микроорганизмов должен отсутствовать.

8 Определение ростовых свойств питательных сред

Ростовые свойства питательных сред определяют для каждой серии сухой или готовой к применению среды промышленного производства и для каждой партии питательной среды, изготовленной в лабораторных условиях из сухой среды или из компонентов. Каждый вид микроорганизма в количестве не более 100 КОЕ вносят в отдельную порцию испытуемой среды. Инкубируют в соответствии с условиями, указанными в Приложении 4. Если в течение необходимого времени инкубации в инокулированных средах визуально отмечают рост микроорганизмов, среду считают пригодной для использования.

9 Подготовка тест-штаммов микроорганизмов

Используют тест-штаммы бактерий и грибов из специализированных коллекций, указанные в Приложении 4, которые должны быть типичными по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам. Число пассажей рабочих культур не должно превышать пяти. Перед испытанием культуры аэробных бактерий высевают на скошенный соево-казеиновый

агар, среду №1 или другую аналогичную плотную питательную среду. Культуры грибов *C.albicans* и *A. brasiliensis* высевают на скошенный агар Сабуро (или среду №2). Культуры анаэробов *Clostridium novyi* и *C. sporogenes*² высевают на среды для анаэробных микроорганизмов (например, жидкую тиогликолевую) и инкубируют при соответствующей температуре.

10 Приготовление инокулята

Выросшие 24-часовые культуры тест-штаммов бактерий (в том числе, *C.sporogenes*, выращенную в анаэробных условиях) и *C. albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным 0,9% раствором натрия хлорида. Готовят взвесь каждого тест-штамма, соответствующую 10 ЕД по фармакопейному стандартному образцу мутности (ФСО).

Концентрацию клеток *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis* доводят до 1×10^7 КОЕ/мл *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. sporogenes*, *A. faecalis* – до 1×10^9 КОЕ/мл. Культуру *C.novyi*, выращенную на жидкой среде культивирования для анаэробных микроорганизмов (2 пересева), после центрифугирования 3000 об/мин в течение 20 мин разводят стерильной жидкостью следующего состава:

- натрия хлорид - 8,5 г,
 - кислота тиогликолевая - 0,3 мл,
 - вода очищенная - 1000 мл,
- pH после стерилизации $7,1 \pm 0,2$

Для смыва конидий *A. brasiliensis* используют стерильный 0,9% раствор натрия хлорида, содержащий 0,05% твина-80. Количество конидий в 1 мл смыва определяют с помощью камеры Горяева или посевом подходящего разведения на агар Сабуро или среду №2.

Стандартизованные взвеси бактерий и грибов доводят стерильным 0,9% раствором натрия хлорида методом последовательных разведений до

² Возможен высеv культуры на среды для аэробов при условии инкубации в анаэроstate

концентрации не более 100 КОЕ/мл для посева в жидкие и полужидкие питательные среды для определения их ростовых свойств.

Для подтверждения полученной концентрации инокуляты бактерий, в том числе, *C. sporogenes* (при условии инкубации последнего в анаэроостате), высевают на соево-казеиновый агар (среду №1 или специализированную среду для клостридий соответственно) по 0,1 мл из взвеси с концентрацией 10^3 КОЕ/мл, *C. novyi* – на специальную среду для клостридий. Инокуляты грибов высевают на агар Сабуро (или среду №2).

11 Определение нейтрализующих свойств тиогликолевой среды

При проведении испытаний БЛП, содержащих мертиолят (тиомерсал), для определения нейтрализующих свойств тиогликолевой среды используют тест-штамм *Alcaligenes faecalis* 415 (см.п. 10) Предварительно перед посевом культуры в каждую емкость в середину столбика с тиогликолевой средой вносят по 0,5 мл свежеприготовленного 0,01% раствора тиомерсала*.

*0,01% раствор тиомерсала: растворяют 0,1 г тиомерсала в 100 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида и перед использованием разводят в 10 раз стерильным 0,9% раствором натрия хлорида. 0,1% раствор хранят не более 3-х месяцев во флаконе из темного стекла при температуре (2-8) °С.

Тиогликолевую среду признают пригодной по нейтрализующим свойствам, если не позднее 5 сут инкубации посевов при температуре (32,5±2,5) °С визуально обнаруживается рост тест-штамма *A. faecalis* 415.

12 Условия хранения питательных сред

Приготовленные в лабораторных условиях питательные среды хранят при температуре от 2 °С до 25 °С в защищенном от света месте в течение не более 1 мес или в течение иного срока и условий хранения, подтвержденных в ходе валидационных испытаний. В случае, если при хранении тиогликолевой среды, содержащей резазурин, верхний слой среды (более 1/3 объема) окрасится в розовый цвет, среду можно регенерировать нагреванием

на кипящей водяной бане в течение 10-15 мин до исчезновения розовой окраски с последующим быстрым охлаждением. Если окраска не исчезает после нагревания, среду считают непригодной к применению. Регенерацию среды можно проводить только один раз.

Питательные среды промышленного производства, готовые к использованию, хранят в плотно закупоренных емкостях при условии сохранения их стерильности и ростовых свойств в течение срока годности.

Сухие питательные среды промышленного производства хранят в соответствии с инструкцией по применению.

13 Жидкости, используемые для растворения, разведения препарата и промывания мембранных фильтров

Растворение или/и разведение испытуемого образца или препарата проводят любым стерильным раствором, не обладающим антимикробным действием, например: 0,9 % раствор натрия хлорида рН ($7,1 \pm 0,2$), вода для инъекций, жидкость №1, жидкость №2, жидкость №3, а также, растворитель, прилагаемый к препарату (Приложение 5). Указанные жидкости могут быть использованы также для промывания мембранных фильтров.

14 Проверка пригодности методики испытания (определение антимикробного действия)

Для правильной оценки качества препарата по показателю «Стерильность» необходимо предварительно провести проверку пригодности выбранной методики, включая определение антимикробного действия в рамках фармакопейного метода.

Во избежание недостоверной оценки результатов испытания для каждого наименования испытуемого образца, готового препарата до розлива (полуфабриката) или готовой формы препарата необходимо проверить наличие антимикробного действия и повторно подтвердить при изменении состава препарата или технологического процесса. Определение

антимикробного действия субстанции, вспомогательного вещества или готового препарата с различной дозировкой проводят, используя наибольшую.

Антимикробное действие препарата, его растворителей и других жидкостей, используемых для разведения испытуемой пробы или для промывки мембранных фильтров должно быть изучено с использованием тех же тест-штаммов бактерий и грибов, что и при оценке ростовых свойств питательных сред, указанных в Приложении 4, рекомендуемых российской или зарубежными фармакопеями, полученных из специализированных музейных коллекций, типичных по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам, тем же методом и в тех же условиях, что и испытание на стерильность. Число пассажей рабочих культур микроорганизмов не должно превышать пяти. Испытание проводят с каждым видом тест-штамма микроорганизма отдельно.

Мембранная фильтрация

После процедуры смачивания мембранных фильтров, переносят и фильтруют требуемое количество испытуемого препарата, рассчитанное по таблицам Приложений 2 и 3. Далее мембранные фильтры промывают стерильной жидкостью (Приложение 5), в последнюю порцию которой вносят инокулят тест-штамма микроорганизма не более 100 колониеобразующих единиц (КОЕ) жизнеспособных микробных клеток.

Положительным контролем служат посеvy каждого тест-штамма, при этом вместо препарата фильтруют стерильный растворитель в том же объеме.

При оценке пригодности методики необходимо подобрать промывочную жидкость для смачивания и отмывки фильтров, определить количество циклов отмывки одного (каждого) мембранного фильтра, установить объем промывочной жидкости, обеспечивающий устранение антимикробного действия.

В зависимости от используемой установки (открытого или закрытого типа) фильтр помещают в питательную среду или питательную среду вносят

в канистру на мембранный фильтр.

Прямой посев

Для каждого тест-штамма рекомендуется использовать по 4 емкости с необходимым объемом питательной среды. В первые две емкости вносят соответствующий объем испытуемого образца, а в две другие аналогичное количество стерильного растворителя, подходящего для данного препарата (положительный контроль). Затем в каждую из четырех емкостей отдельно вносят суспензии, содержащей не более 100 КОЕ соответствующего тест-штамма микроорганизма. Содержимое осторожно, избегая интенсивной аэрации, перемешивают до равномерного распределения в питательных средах. Положительным контролем могут служить результаты определения ростовых свойств питательных сред.

Инкубация посевов

Посевы образцов, выполненные любым из двух методов, инкубируют на тиогликолевой среде при температуре $(32,5 \pm 2,5)$ °С, на жидкой соево-казеиновой среде или жидкой среде Сабуро инкубируют при температуре $(22,5 \pm 2,5)$ °С в течение не более 5 сут.

Учет результатов проверки пригодности методики испытания (определение антимикробного действия)

Учет результатов проводят визуально, в специально отведенном оборудованном месте, в прямом проходящем свете, на уровне глаз при достаточной освещенности, на фоне черного/белого экрана, сравнивая рост тест-штаммов микроорганизмов в положительном контроле и в посевах с испытуемым образцом.

Если в посевах в присутствии испытуемого образца в указанные сроки наблюдают рост всех использованных тест-штаммов микроорганизмов, визуально сравнимый с ростом в положительном контроле, делают вывод о том, что препарат в условиях испытания не обладает антимикробным действием. В этом случае испытание на стерильность проводят по данной методике.

В случае если в положительном контроле наблюдают рост тест-штаммов, а в посевах с испытуемым образцом визуально сравнимый рост одного или нескольких тест-штаммов отсутствует, считают, что испытуемый образец обладает антимикробным действием, которое следует устранить

Вместе с тем, удовлетворительный результат испытания не может служить доказательством стерильности всей партии, а свидетельствует лишь о том, что в анализируемом образце в условиях испытания не обнаружено бактерий и грибов.

Стерильность партии готового препарат обеспечивается аттестацией (валидацией) всего цикла асептического производства, включая процессы и процедуры стерилизации и методов контроля асептических условий производства.

В случае выявления изменений физических свойств готового препарата (помутнение, появление хлопьев, осадка), образцы должны быть исследованы для выяснения причин обнаруженных отклонений, включая показатели качества «Стерильность» и «Герметичность».

Способы устранения антимикробного действия образца

В случае обнаружения антимикробного действия образца должен быть подобран адекватный способ его устранения. Для устранения антимикробного действия консервантов, входящих в состав БЛП, химические инактиваторы не используются, а устранение их воздействия может быть достигнуто несколькими способами:

А) Увеличивают разведение препарата, используя больший объем подобранного растворителя, увеличивают объем питательной среды, изменяя соотношение при прямом посеве, при условии, что объем препарата не должен превышать 10 % от объема среды.

Экспериментально установленное соотношение объемов питательной среды и посевного материала, обеспечивающее устранение антимикробного действия препарата, должно соблюдаться при испытании препарата на

стерильность при условии сохранения надлежащих ростовых свойств питательной среды.

Б) При наличии в составе препарата ртутного консерванта испытание проводят с использованием только тиогликолевой среды, отвечающей требованиям по нейтрализующим свойствам.

В) Используют метод мембранной фильтрации.

В этом случае устранение антимикробного действия препарата может быть достигнуто следующими способами: испытываемую пробу разводят подобранным растворителем, используя больший объем растворителя, увеличивают количество циклов отмывки мембранных фильтров и объем промывочной жидкости, используют несколько промывочных жидкостей или используют большее количество мембранных фильтров. Как правило, для препаратов, обладающих антимикробным действием, фильтр промывают не менее 3 раз. Максимально допустимый промывочный цикл не должен превышать 5 циклов по 100 мл на один мембранный фильтр, даже если при проверке пригодности методики установлено, что антимикробное действие полностью не устранено.

Г) Для устранения антимикробного действия некоторых ЛС могут быть применены специфические инактиваторы, нейтрализующие антимикробное действие, но не угнетающие рост микроорганизмов.

15 Испытание на стерильность методом прямого посева. Порядок разработки методики испытания на стерильность

Предварительно, для оценки качества изучаемого препарата по показателю «Стерильность», следует оценить возможность и целесообразность использования того и/или другого фармакопейного метода (прямой посев, мембранная фильтрация) и разработать на основе этого метода адекватную методику.

Испытание методом прямого посева проводят путем внесения испытываемого материала в питательные среды в соотношении, установленном

при определении антимикробного действия, как правило, 1:10 или 1:20. Соотношение количества испытуемой пробы и питательной среды должно быть определено при проверке пригодности методики испытания (определение антимикробного действия) препарата.

При проведении испытания рекомендовано учитывать следующие факторы:

– для контроля сывороточных препаратов и препаратов крови не рекомендуется использование жидкой среды Сабуро с низким значением pH $5,6 \pm 0,2$, поскольку при внесении образца в питательную среду могут наблюдаться изменения внешнего вида среды (цвет, образование хлопьев, осадка) не связанные с качеством испытуемого материала, которые указывают на возможное отрицательное влияние условий испытания на природу препарата и на жизнеспособность присутствующих микроорганизмов-контаминантов. В этом случае, методику испытания препарата по показателю «Стерильность» с использованием жидкой среды Сабуро следует считать не адекватной, питательную среду непригодной для испытания данного препарата, а результаты испытания не достоверными и не действительными.

Разрабатываемая методика испытания может предусматривать использование питательных сред, разлитых в различные по объему стерильные емкости (пробирки, флаконы, закупоренные резиновыми, силиконовыми или другими видами пробок³). Помимо этого, использование емкостей большего объема, экономически более целесообразно, поскольку одновременно позволяет значительно сократить количество емкостей с питательными средами и исключить одну из критических стадий испытания - открывание питательных сред для внесения испытуемого материала.

Для снижения риска получения ложноположительного результата, может быть рекомендовано использование питательных сред, разлитых в

³ использование питательных сред, закупоренных ватно-марлевыми пробками, увеличивает риск получения ложноположительных результатов и исключается при проведении испытания в изоляторе.

стеклянные флаконы закрытые резиновыми пробками и завальцованные алюминиевыми колпачками, что исключает необходимость открывать флаконы для внесения испытуемого материала, повышает надежность и уверенность в получении достоверных результатов тестирования. Внесение препарата в этом случае проводят через «окошко» алюминиевого колпачка.

Поскольку возможные микроорганизмы – контаминанты могут осесть на дно первичной упаковки, перед отбором испытуемого материала содержимое необходимо осторожно перемешивают.

Лиофилизированные образцы предварительно растворяют подобранным растворителем и далее проводят испытание с учетом результатов валидации по установленной методике.

Процедура посева может быть выполнена несколькими способами:

– содержимое каждого испытуемого образца готового препарата высевают в отдельную емкость с питательной средой.

– готовят общую объединенную пробу (смесь содержимого всех образцов взятых в испытание) в отдельной стерильной емкости (флаконе).

– готовят общую объединенную пробу непосредственно в шприце большого объема 20 мл, 50 мл и далее высевают в питательные среды из шприца или флакона (не открывая резиновую пробку), через «окошко» в центре алюминиевого колпачка. Содержимое осторожно перемешивают до равномерного распределения препарата в питательной среде.

- Для исключения возможности получения ложноотрицательных результатов, обусловленных негативным, травмирующим воздействием на возможно присутствующий контаминант, испытуемую пробу следует вносить у края раздела среды, избегая вспенивания и аэрации.

- Для препаратов, вызывающих помутнение питательной среды, когда визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов или возникают сомнения в процессе инкубации при предварительном учете результатов, проводят посев по схеме (рисунок 1) проводят пересев.

16 Особенности испытания живых бактериальных вакцин

Препараты живые бактериальные вакцины для парентерального введения, представляют собой живую культуру аттенуированного штамма соответствующего патогенного микроорганизма бактерий или риккетсий. В связи с тем, что культура вакцинного штамма, используемого при изготовлении той или иной вакцины, в процессе инкубации вызывает специфический рост, сопровождающийся появлением мутности, осадка, хлопьев и других изменений жидкой питательной среды, что не соответствует установленным критериям испытания по показателю «Стерильность», оценку микробиологического загрязнения данных препаратов проводят по показателю «Отсутствие посторонних бактерий и грибов», которое должно быть направлено на обнаружение контаминации микроорганизмами, отличающимися от производственных штаммов.

Оценку наличия посторонних бактерий и грибов в живых бактериальных вакцинах проводят методом прямого посева. Метод мембранной фильтрации для испытания этих вакцин не применим. Для посева, как правило, используют тиогликолевую среду, посеvy инкубируют при температуре $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ и $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 14 сут, на 5-7 сутки от начала посева проводят пересев. По окончании испытания на 14 сут, готовят и микроскопируют мазки, окрашенные по Граму, и далее, при необходимости, используют специфические флуоресцирующие диагностические иммуноглобулины. По окончании всех перечисленных процедур проводят окончательный учет и интерпретацию результатов испытания.

Для получения достоверных результатов необходимо разработать порядок учета, интерпретации результатов, позволяющие дифференцировать типичный рост вакцинного штамма от роста микроорганизмов-контаминантов.

При разработке методики и оценке её пригодности, необходимо учитывать особенности живых вакцин, сложности определения наличия/отсутствия антимикробного действия и способы его устранения.

17 Испытания на стерильность методом мембранной фильтрации.

Порядок разработки методики испытания на стерильность

Изучение природы препарата, состава, наличия вспомогательных веществ, а также его способности проходить через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм позволяет оценить возможность использования метода мембранной фильтрации.

Процедура испытания включает следующие основные стадии: смачивание мембранных фильтров, подготовка образцов и фильтрация содержимого всех емкостей через фильтры, отмывка мембранных фильтров соответствующим стерильным раствором, добавление питательных сред и инкубирование посевов. Каждому из перечисленных положений, следует уделить пристальное внимание, поскольку выполнение перечисленных процедур может потребовать решения ряда проблем. Например, при испытании специальных материалов или препаратов может потребоваться значительное количество мембранных фильтров, сложных растворов и жидкостей, что делает данное испытание трудоемким и экономически не целесообразным и, как следствие, возникает необходимость использовать метод прямого посева. Кроме того, достоверность полученных результатов испытания на стерильность во многом определяется правильностью и полнотой оценки антимикробного действия.

При разработке методики следует учитывать следующие положения:

– Лиофилизированные образцы предварительно растворяют стерильными жидкостями, рекомендованными ГФ РФ, а также могут быть растворены стерильным растворителем в соответствии с инструкцией по применению или другой жидкостью, выбранной производителем, не обладающей антимикробным действием, например: 0,9 % раствором натрия

хлорида рН ($7,1 \pm 0,2$), водой для инъекций, жидкость №1, жидкость №2, жидкость №3. Правильно выполненная процедура восстановления лиофилизированного образца, подобранным растворителем, гарантирует успешное проведение фильтрации и тестирование испытуемой пробы.

Указанные жидкости могут быть использованы также для предварительного смачивания и отмывки мембранных фильтров, Для полного растворения некоторых лиофилизированных препаратов время восстановления может быть значительно увеличено и растворитель перед использованием должен быть нагрет до температуры не выше (44-45) °С.

Первую стадию процедуры испытания – предварительное смачивание мембранных фильтров, проводят с использованием жидкостей, не обладающих антимикробным действием, подобранных при определении антимикробного действия.

Следующую стадию испытания - фильтрация испытуемого материала, рекомендуется проводить при «стандартной» «скорости».

Процесс фильтрации некоторых препаратов (препаратов крови и др.) может сопровождаться нежелательным явлением - пенообразованием, которое не устраняется в процессе отмывки мембранных фильтров. Возникающий эффект затрудняет проведение следующей операции - внесение питательных сред в канистры. Как правило, для таких препаратов, в том числе препаратов крови устанавливают предельно низкую «скорость» фильтрации, что позволяет полностью исключить или уменьшить пенообразование.

Рекомендуется определить необходимость разведения испытуемого материала перед фильтрацией для лучшего прохождения через мембранные фильтры и увеличения «скорости» фильтрации в соотношении, установленном при проверке пригодности методики испытания (определение антимикробного действия).

Процедура разведения может быть выполнена несколькими способами:

- готовят разведение общей объединенной пробы в отдельной стерильной емкости в установленном соотношении и далее фильтруют;

- в резервуар канистры вносят раствор для разведения или промывочную жидкость. Содержимое каждого образца отдельно поочередно переносят в канистры на 2 мембранных фильтра, доводят объем, соблюдая установленное соотношение или, приблизительно, до 100мл, получают пробу, разведенную непосредственно в резервуаре канистры и далее фильтруют.

Описанный способ упрощает процедуру разведения препарата и позволяет исключить использование отдельной емкости (флакона) для разведения препарата.

Процедура фильтрации может быть выполнена разными способами:

- фильтруют содержимое каждого образца препарата отдельно, поочередно.

- готовят общую объединенную пробу (смесь содержимого всех образцов взятых в испытание) в отдельной стерильной емкости (флакон закрытый резиновой пробкой и завальцованный алюминиевым колпачком) и далее фильтруют.

Следует рассмотреть ситуацию, когда процедура фильтрации отдельных субстанций, материалов или препаратов, в том числе препаратов крови, по причине особенностей их состава, может быть затруднена или полностью не выполнена. В этом случае необходимо определить максимально допустимый объем (мл) пробы, фильтруемый через один (каждый) мембранный фильтр.

В случае, если образец не фильтруется, испытываемая проба или ее часть остается в канистре на мембране, рекомендуется модифицировать методику испытания путем разведения испытываемой пробы, подбором подходящего растворителя и установления соотношения при разведении и проводить фильтрацию в других условиях, позволяющих провести ее успешно.

Отобранная испытуемая проба или количество образцов готового препарата, необходимое для испытания стерильности может быть профильтровано с использованием двух, четырех и более мембранных фильтров, количество которых определяют экспериментально при разработке методики с учетом особенностей испытуемого материала, дозировки и упаковки лекарственной формы препарата.

Следующим фактором, способным повлиять на результаты тестирования, является процедура отмывки мембранных фильтров. После фильтрации рекомендовано освободить мембранные фильтры от испытуемой пробы и восстановить значение рН на фильтре путем однократного промывания мембранных фильтров небольшим количеством промывочной жидкости, независимо от наличия или отсутствия антимикробного действия.

Как правило, после проведения испытания, для подтверждения надлежащих условий проведения испытания, необходимо фильтровать растворитель с последующим воспроизведением всех этапов контроля стерильности методом мембранной фильтрации.

18 Учет и интерпретация результатов испытания на стерильность

В период инкубации все посева периодически просматривают в специально оборудованном месте в прямом проходящем свете на уровне глаз при достаточном освещении на фоне черного/белого экрана и на 14 сут проводят окончательный учет результатов испытания.

– При испытании методом прямого посева новых препаратов или вызывающих помутнение питательной среды, особое внимание следует обратить на изменения состояния питательных сред после внесения испытуемой пробы и на 1-2 сут инкубации для установления необходимости проведения пересева на 5-7 сут инкубации на аналогичные питательные среды.

– При испытании методом мембранной фильтрации, так же необходимо просматривать питательные среды и поверхности мембранных

фильтров, поскольку, несмотря на то, что испытуемый препарат был удален при фильтрации, отдельные компоненты препаратов, например, гидроокись алюминия могут образовывать плотный осадок в виде, «пласта» на поверхностях мембранных фильтров, целостность которого в период инкубации может нарушиться и отдельные его фрагменты, находящиеся в толще питательной среды затрудняют интерпретацию результатов.

– Наличие роста микроорганизмов оценивают визуально по выявлению мутности, осадка, хлопьев и других макроскопических изменений в питательных средах при просмотре посевов.

– Испытуемый препарат считают удовлетворяющим требованиям испытания на стерильность при отсутствии роста микроорганизмов во всех образцах.

– При обнаружении микроорганизмов, выявленный рост подтверждают микроскопическим исследованием мазков, окрашенных по Граму и проводят повторное испытание на удвоенном количестве образцов. В этом случае, необходимо провести расследование причин несоответствия, подтвердить правильность выполнения всех подготовительных процедур, включая режимы стерилизации материалов, питательных сред, растворов и рабочие параметры используемого оборудования.

Результаты испытания на стерильность могут быть признаны недостоверными в случае, если выполняется одно или несколько условий, приведенных ниже:

1. В процессе проведения испытания на стерильность получены неудовлетворительные результаты микробиологического контроля окружающей среды (воздушная среда, поверхности, персонал и др.).

2. Выявлены ошибки, допущенные в ходе испытания.

3. Обнаружен рост микроорганизмов в отрицательном контроле (растворитель, питательные среды).

4. Ростовые свойства питательной среды неудовлетворительны.

5. Выявлены ошибки, допущенные в процессе стерилизации материалов.

В случае признания результатов испытания недостоверными, контроль повторяют на том же количестве образцов, что и первоначально.

– При отсутствии роста микроорганизмов при повторном испытании считают, что препарат соответствует требованиям испытания на стерильность.

– Если в результате повторного испытания обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность.

– Все выявленные в процессе испытания микроорганизмы подлежат обязательной макроскопической характеристике и микроскопической идентификации мазков, окрашенных по Граму, с указанием основных морфологических признаков: форма микроорганизмов (кокки, палочки, споры и др.) цвет, консистенция колоний, отношение к окраске по Граму, наличие или отсутствие спорообразования.

– Идентификация дает возможность выявить возможный источник контаминации, основываясь на информации о преимущественном распространении микроорганизмов во внешней среде.

Если контаминация микроорганизмами будет обнаружена и доказана фармакопейным методом, то полученный результат считается окончательным, чтобы считать испытуемый образец не соответствующим требованиям испытания на стерильность.

19 Требования к содержанию раздела нормативной документации по показателю «Стерильность» при проведении испытания методом прямого посева

В разделе нормативной документации для воспроизведения методики испытания и проведения экспертизы качества по показателю «Стерильность» методом прямого посева следует привести полное описание методики,

сведения об антимикробном действии препарата, способах его устранения и указать:

- наименование используемых питательных сред;
- количество испытуемого материала или образцов препарата, необходимое для проведения испытания, с учетом объема серии, дозировки и упаковки;
- наименование растворителя и условия растворения лиофилизированного образца;
- количественное соотношение испытуемой пробы и питательной среды;
- обоснование пересева (при необходимости) на 5-7 сутки инкубирования в случае посева мутных или вызывающих помутнение питательной среды препаратов;
- количественное соотношение взятой пробы и питательной среды при пересеве;
- изменения внешнего вида питательной среды в зоне посева и при пересеве в период инкубирования при предварительном и окончательном учете результатов испытания;
- в случае наличия отклонений от процедуры учета, изложенной в ОФС «Стерильность» приводится подробное описание порядка учета и интерпретации результатов испытания.
- при испытании живых бактериальных вакцин помимо особенностей проведения испытания, приводят порядок учета и интерпретации результатов, позволяющие дифференцировать рост посторонних бактерий и грибов от роста культуры вакцинного штамма. В этом случае испытание проводится по показателю «Отсутствие посторонних бактерий и грибов».

20 Требования к материалам регистрационного досье по показателю «Стерильность» при проведении испытания методом прямого посева

Материалы регистрационного досье по показателю «Стерильность» при проведении испытания методом прямого посева должны содержать первичные данные производителя по определению антимикробного действия препарата и материалы, подтверждающие пригодность методики испытания заявленным методом прямого посева в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» с учетом всех сведений, полученных в процессе разработки методики, включая:⁴

- количество испытуемого материала или образцов препарата с учетом дозировки и упаковки;
- наименование растворителя, условия растворения лиофилизированного образца;
- используемые питательные среды и требования к их качеству;
- общий объем испытуемой пробы и количество используемых для посева емкостей (флаконов, пробирок) с питательными средами;
- наименование и количество (КОЕ) вносимого тест-штамма микроорганизма (при определении антимикробного действия);
- соотношение объема образца и питательной среды;
- обоснование необходимости пересева на 5-7 сутки инкубирования;
- соотношение объема взятой пробы и питательной среды при пересеве;
- описание внешнего вида питательной среды в зоне посева и при пересеве в период инкубирования;
- подробное описание порядка учета и интерпретации результатов испытания.

⁴ Оценку пригодности методики испытания субстанции, готового препарата или вспомогательного вещества с различной дозировкой проводят с использованием наибольшей концентрации с учетом общего объема

21 Требования к содержанию раздела нормативной документации по показателю «Стерильность» при проведении испытания методом мембранной фильтрации

В разделе нормативной документации для воспроизведения методики испытания и проведения экспертизы качества по показателю «Стерильность» методом мембранной фильтрации следует привести полное и достаточно детальное описание методики, сведения об антимикробном действии препарата, способах его устранения и указать:

- наименование используемых питательных сред;
- количество испытуемого материала или образцов препарата, необходимое для проведения испытания, с учетом объема серии, дозировки и упаковки;
- условия растворения лиофилизированного образца и наименование растворителя;
- необходимость разведения испытуемой пробы перед фильтрацией;
- максимально допустимый объем испытуемого материала, фильтруемый через один мембранный фильтр;
- наименование и объем промывочной жидкости (количество циклов отмывки), используемый для смачивания и отмывки одного (каждого) мембранного фильтра;
- описание порядка учета и интерпретации результатов испытания.

22 Требования к материалам регистрационного досье по показателю «Стерильность» при проведении испытания методом мембранной фильтрации

Материалы регистрационного досье по показателю «Стерильность» должны содержать экспериментальные доказательства пригодности методики испытания стерильности заявленным методом мембранной фильтрации, наиболее важные, критические сведения, полученные в

процессе разработки методики, результаты изучения антимикробного действия препарата, включая:

- количество испытуемого материала или образцов препарата с учетом дозировки и упаковки;
- наименование растворителя и условия растворения лиофилизированного образца;
- условия фильтрации содержимого всех емкостей или общей объединенной пробы и обоснование необходимости ее разведения перед фильтрацией;
- наименование промывочной жидкости;
- количество используемых мембранных фильтров (фильтроэлементов);
- процедуру отмывки мембранных фильтров, обеспечивающую устранение антимикробного действия (при его наличии);
- наименование и количество (КОЕ) вносимого тест-штамма микроорганизма (при определении антимикробного действия);
- используемые питательные среды и требования к их качеству;
- условия инкубирования посевов и описание учета результатов испытания.

В случае установления возможности проведения испытания БЛП двумя методами, заявленными производителем и внесенными в текст НД, следует предоставлять валидационные материалы по каждому методу испытания. При использовании для оценки стерильности не фармакопейных методов, методов фирмы, замены питательных сред, тест-штаммов микроорганизмов или других изменений, в регистрационном досье предоставляют первичные данные по валидации, подтверждающие, применимость методики в отношении полноты выявления и предела обнаружения микроорганизмов.

23 Требования к предоставляемым сведениям по питательным средам в разделе НД и материалах регистрационного досье

Раздел «Питательные среды» в НД и других документах регистрационного досье, как правило, отсутствует, однако, при экспертизе качества БЛП для оценки воспроизводимости и адекватности аналитической методики, включая изучение наличия антимикробного действия, сведения по питательным средам и порядке их применения вносят в соответствующие разделы.

В раздел нормативной документации при описании аналитической методики для возможности пошагового воспроизведения включают следующую информацию:

- наименование и состав ПС с указанием производителя (при необходимости)⁵;
- требования к компонентам (для сред лабораторного изготовления), специфическим добавкам (ТУ, ГОСТ, содержание аминного азота и т.п.);
- указывают возможность использования альтернативных готовых сред, компонентов/добавок, а также изменения концентраций отдельных ингредиентов (экстракты, пептоны, агар, антибиотики), особенно, биологического происхождения, поскольку их состав может варьировать. Для компонентов лабораторного приготовления (экстракты, гидролизаты) приводят подробное описание всех подготовительных операций и основных требований к качеству;
- описание способа приготовления (в случае если имеются отличия или отсутствуют данные в документе производителя) с указанием особых требований (порядок внесения компонентов, фильтрование, нагревание, кипячение, корректировка pH), режима и вида стерилизации для соответствующего объема фасовки (флаконы, пробирки) и вида герметизации (завальцовка, пробки);

⁵ При наличии полной информации в Фармакопее указывают ссылку на статью

– рекомендуемые условия хранения (температура, защищенность от света, влажность) и срок годности приготовленной из сухой коммерческой или из отдельных ингредиентов партии среды расфасованной в соответствующий вид упаковки (пробирки, флаконы, чашки Петри);

– критерии пригодности, которым должна соответствовать ПС для своего целевого назначения. Приводят наименования тест-штаммов микроорганизмов (культур клеток) с указанием коллекции и депозитных номеров, тестовых культур клеток и продолжительность инкубации посевов, порядок учета результатов (наличие и характер роста, внешний вид, размер и цвет колоний, изменение цвета среды, необходимость микроскопии, окрашивания мазков и т.д.).

В материалы регистрационного досье включают сведения:

– подтверждающие оценку пригодности питательной среды для оценки качества соответствующего БЛП (отсутствие отрицательного влияния на природу препарата и др.) в рамках фармакопейного метода.

– подтверждающие пригодность выбранной методики (в рамках фармакопейного метода) оценки качества БЛП с помощью питательной среды, с подтвержденными в тех же условиях специфическими свойствами (ростовые, дифференцирующие, ингибирующие или др.) в отношении соответствующих тестовых культур. Приводят результаты соответствующих отрицательных контролей;

– в случае использования дополнительных тест-штаммов должны быть представлены материалы по подтверждению ростовых свойств среды с их использованием;

– в случае замены питательных сред/ингредиентов/добавок, а также использования тест-штаммов других коллекций, типичных по своим свойствам, указанных в фармакопейном методе (методике), должны быть представлены материалы по валидации метода/методики и подтверждению её пригодности для оценки качества БЛП в той же степени, что и официально утвержденная методика, или в более высокой степени.

Валидация должна включать определение правильности, прецизионности, специфичности, предела обнаружения, предела количественного определения, линейности и устойчивости (надежности). Результаты должны оцениваться с помощью адекватных статистических методов. При необходимости, могут быть регламентированы особые требования в отношении качества питательных сред, обеспечивающих надежность методики в условиях соответствующего производства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящие методические рекомендации могут служить руководством по разработке методик проведения испытания по показателю «Стерильность» различных по своим свойствам БЛП. Методические рекомендации также могут быть использованы для оценки качества живых бактериальных вакцин по показателю «Отсутствие посторонних бактерий и грибов».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. ОФС 1.2.4.0003.15 Стерильность (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 №749). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I.
2. Испытание на стерильность иммунобиологических лекарственных препаратов в России. История вопроса и современные требования / С.М. Суханова, З.Е. Бердникова, Н.Е. Захарова, В.А. Меркулов // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Т. 18. – N 1. – С. 5-15.
3. ОФС 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 №749). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. II.
4. Суханова, С.М. Разработка подходов к проведению испытания гетерологичных сывороточных препаратов по показателю «Стерильность» методом мембранной фильтрации / С.М. Суханова, З.Е. Бердникова // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – Т. 17. – N 2. – С. 103-109.
5. Проблемы «стерильности» живых бактериальных вакцин / С. М. Суханова, Л.В. Саяпина, З.Е. Бердникова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – Т. 3. – С. 87-93.
6. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания (МУК 4.2.2316-08). – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с.
7. Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза (утв. решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3.11.2016 г. №77). – 2017. – 366 с.
8. Руководство по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата (утв. решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07.09.2018г. №151).

Приложение 1

Приготовление питательных сред

Тиогликолевая среда

- L-цистин – 0,5 г
 - Натрия хлорид – 2,5 г
 - Глюкоза моногидрат – 5,5 г
 - Агар микробиологический (влажность не более 15 %) – 0,75 г
 - Дрожжевой экстракт (водорастворимого) – 5,0 г
 - Панкреатический гидролизат казеина – 15,0 г
 - Натрия тиогликолят – 0,5 г
- или кислота тиогликолевая – 0,3 г
- Раствор резазурина натрия (1:1000), свежеприготовленный – 1,0 мл
 - Вода очищенная – 1000,0 мл
- pH после стерилизации $7,1 \pm 0,2$.

Добавляют в воду очищенную L-цистин, агар микробиологический, натрия хлорид, глюкозу, водорастворимый дрожжевой экстракт и панкреатический гидролизат казеина и нагревают до полного растворения. После этого вносят натрия тиогликолят или тиогликолевую кислоту и, если необходимо, доводят pH среды 1M раствором натрия гидроксида до необходимого значения. Фильтруют (при необходимости) для получения прозрачной среды. Добавляют раствор резазурина, перемешивают, разливают в подходящие емкости и стерилизуют. Допускается при необходимости использование альтернативной тиогликолевой среды не содержащей агар и резазурин.

Жидкая соево-казеиновая среда

- Панкреатический гидролизат казеина – 17,0 г
- Папаиновый гидролизат соевой муки – 3,0 г
- Натрия хлорид – 5,0 г
- Калия фосфат двузамещенный – 2,5 г

- Глюкоза – 2,5 г
 - Вода очищенной – 1000,0 мл
- pH после стерилизации $7,3 \pm 0,2$

Компоненты растворяют в воде (если необходимо, при нагревании). Охлаждают при комнатной температуре. Если требуется, добавляют 1М раствор натрия гидроксида, чтобы после стерилизации значение pH среды было $7,3 \pm 0,2$. Фильтруют для получения прозрачной среды, разливают в подходящие емкости и стерилизуют.

Жидкая среда Сабуро

- Пептон ферментативный – 10,0 г
 - Глюкоза моногидрат – 40,0 г
 - Вода очищенной – 1000,0 мл
- pH после стерилизации $5,6 \pm 0,2$

Пептон и глюкозу добавляют в воду очищенную и полностью растворяют при слабом нагревании. Охлаждают до комнатной температуры и доводят pH до требуемого значения. Если необходимо, фильтруют, разливают в подходящие емкости и стерилизуют. Допускается замена отдельных компонентов в составе сухих и готовых к применению сред промышленного производства на аналогичные по свойствам, при условии соответствия питательных сред требованиям по ростовым свойствам.

Приложение 2

Минимальное количество образцов препарата, необходимое для проведения испытания на стерильность в зависимости от объема серии

Количество образцов в серии*	Минимальное количество образцов для посева на каждую питательную среду
Парентеральные лекарственные средства:	
• Не более 100	10 % или 4, выбирают большее
• От 100 до 500	10
• Более 500	2 % или 20, выбирают меньшее
• Парентеральные лекарственные средства большого объема (более 100мл)	2 % или 10, выбирают меньшее
• Биологические лекарственные препараты большого объема (более 10мл)	2 % или 10, выбирают меньшее
• Антибиотики, твердые формы, ангро, (более 5 г)	6
Неинъекционные лекарственные средства (в том числе глазные):	
• Не более 200	5 % или 2 выбирают большее
• Более 200	10
• Препараты в однодозовой упаковке	См. графу «Парентеральные лекарственные средства»
Твердые формы, ангро:	
• Не более 4 упаковок	Каждую
• Свыше 4, но не более 50	20 % или 4
• Свыше 50	2 % или 10

* если количество образцов в серии неизвестно, то используют максимальное количество, указанное в колонке.

Приложение 3

Минимальное количество (объем) препарата, для посева на каждую питательную среду

Количество препарата в первичной упаковке	Минимальное количество препарата для посева на каждую питательную среду
• Менее 1 мл	весь объем первичных упаковок, объединенных до 1 мл
• 1 – 40 мл	½ содержимого, но не менее 1 мл
• 40 – 100 мл	20 мл
• более 100 мл	10 % содержимого, но не менее 20 мл
• Антибиотики (жидкости)	1 мл
• Другие препараты, растворимые в воде или ИПМ	содержимое упаковки, но не менее 200 мг
Нерастворимые препараты, мази и кремы, поддающиеся эмульгированию или суспендированию	содержимое упаковки, но не менее 200 мг
Твердые	
• Менее 50 мг	все содержимое
• 50 - 300 мг	½ содержимого, но не менее 50 мг
• 300 мг – 5 г	150 мг
• более 5 г	500 мг

Приложение 4

Тест-штаммы микроорганизмов, используемые для определения ростовых свойств питательных сред и проверки антимикробного действия препарата*

Питательные среды	Тест-штаммы микроорганизмов	Условия инкубации		
		Температура	Время	
Жидкая тиогликолевая среда	Аэробные бактерии:	(32,5±2,5)°C	3 сут	
	<i>Bacillus subtilis</i> ГКПМ 010011, АТСС 6633, NCTC 10400, DSM 347 или <i>Bacillus cereus</i> ГКПМ 010014, АТСС 10702, NCTC 8035, DSM 487			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ГКПМ 201108, АТСС 6538, NCTC 10788			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ГКПМ 190155, АТСС 9027, NCTC 12924, СІР 82.118			
	<i>Alcaligenes faecalis</i> 415** ГКПМ 242484			2 сут
	Анаэробные бактерии:			3 сут
	<i>Clostridium sporogenes</i> 272 ГКПМ 300524, АТСС 19404, NCTC 12935, DSM 1446			
	<i>Clostridium novyi</i> 198** ГКПМ 300205			
	Грибы**:			(22,5±2,5)°C
<i>Candida albicans</i> ГКПМ 303903; ГКПМ 303901, АТСС 10231 РКПГУ 401/NCTC 885-653; NCPF 3179				
Жидкая соево-казеиновая	Аэробные бактерии:	(22,5±2,5)°C	3 сут	
	<i>Bacillus subtilis</i> ГКПМ 010011,			

среда	ATCC 6633, NCTC 10400, DSM 347 или <i>Bacillus cereus</i> ГКПМ 010014, ATCC 10702, NCTC 8035, DSM 487		
	Грибы: <i>Candida albicans</i> , ГКПМ 303903; ГКПМ 303901, ATCC 10231 РКПГУ 401/NCTC 885-653; NCPF 3179	(22,5±2,5)°C	5 сут
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642, ATCC 16404, РКПГФ 106, ВКМ F-1119, ВКМ F-3882, NCPF 2275		
Жидкая среда Сабуро	Грибы: <i>Candida albicans</i> , ГКПМ 303903; ГКПМ 303901, ATCC 10231 РКПГУ 401/NCTC 885-653; NCPF 3179	(22,5±2,5)°C	5 сут
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642, ATCC 16404, РКПГФ 106, ВКМ F-1119, ВКМ F-3882, NCPF 2275		

*могут быть использованы и другие тест-штаммы микроорганизмов из различных коллекций, типичные по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. При необходимости набор тест-штаммов может быть увеличен.

** обозначены тест-штаммы для случаев использования тиогликолевой среды в качестве универсальной при испытании БЛП.

Приложение 5

Жидкости, используемые для растворения, разведения препарата и промывания мембранных фильтров

Жидкость №1 Растворяют 1 г ферментативного пептона в 1000 мл воды, фильтруют или центрифугируют для осветления, разливают и стерилизуют. Значение рН после стерилизации рН (7,1±0,2).

Жидкость №2 Добавляют 1 мл твина-80 к 1000 мл жидкости №1, разливают в сосуды и стерилизуют. Значение рН после стерилизации рН (7,1±0,2).

Жидкость №3 Растворяют 5 г ферментативного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твина-80 в 1000 мл воды, разливают и стерилизуют. Значение рН после стерилизации рН (7,1±0,2).