

<https://doi.org/10.29296/25419218-2020-04-01>

© Коллектив авторов, 2020
УДК 615.456/.457.07

К вопросу о создании условий определения стерильности лекарственных средств в микробиологической лаборатории

О.В. Гунар, А.В. Доренская, В.Ш. Вотякова

Научный центр экспертизы средств медицинского применения

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гунар Ольга Викторовна – начальник лаборатории микробиологии Научного центра экспертизы средств медицинского применения (НЦЭСМП), доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 342-89-01. E-mail: gunar@expmed.ru. *ORCID: 0000-0002-4825-8356*

Доренская Анна Викторовна – ведущий эксперт лаборатории микробиологии НЦЭСМП, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (906) 597-74-72. E-mail: dorenskaya@expmed.ru. *ORCID: 0000-0003-2410-8895*

Вотякова Венера Шамилевна – инженер-лаборант лаборатории микробиологии НЦЭСМП. Тел.: +7 (917) 538-05-88. E-mail: votikovavs@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Соответствие качества лекарственных средств по показателю «Стерильность» гарантирует безопасность применения лекарственных препаратов для инъекций и инфузий, глазных капель и пленок, фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, включая биологические лекарственные препараты и их растворители, которые в соответствии с нормативной документацией и фармакопейными статьями должны быть стерильными.

Рассмотрены необходимые условия для организации и проведения испытания стерильности лекарственных средств. Создание, функционирование и поддержание описанных условий находится в зоне ответственности производственных, контрольных и экспертных микробиологических лабораторий. Среди необходимых условий выделены следующие: специальное асептическое помещение с определенным подтвержденным классом чистоты; микробиологический мониторинг; доказанная стерильность всех используемых расходных материалов, растворов и питательных сред; используемые методики испытаний с доказанной применимостью.

Активно обсуждается вопрос, возникающий при обнаружении контаминированного образца. Выявленный факт требует расследования причин сложившейся ситуации и возможного дальнейшего признания препарата некачественным по показателю «Стерильность».

Материалы включены в проект ОФС «Условия определения стерильности лекарственных средств», который в настоящее время находится на рассмотрении и утверждении в установленном порядке для дальнейшего включения в Государственную Фармакопею РФ.

Ключевые слова: качество лекарственных средств, стерильность.

Для цитирования: Гунар О.В., Доренская А.В., Вотякова В.Ш. К вопросу о создании условий определения стерильности лекарственных средств в микробиологической лаборатории. Фармация, 2020; 69 (4): 5–9. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-04-01>

TO THE QUESTION OF CREATING CONDITIONS FOR DETERMINING THE STERILITY OF DRUGS IN THE MICROBIOLOGICAL LABORATORY

O.V. Gunar, A.V. Dorenskaya, V.Sh. Votikova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow, 127051, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Gunar Olga Viktorovna – Head of Laboratory of Microbiology of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (SCEEMP), Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (916) 342-89-01. E-mail: gunar@expmed.ru. *ORCID: 0000-0002-4825-8356*

Dorenskaya Anna Viktorovna – Leading Expert of Laboratory of Microbiology of SCEEMP, PhD. Tel.: +7 (906) 597-74-72. E-mail: dorenskaya@expmed.ru. *ORCID: 0000-0003-2410-8895*

Votikova Venera Shamilevna – Labengineer of Laboratory of Microbiology of SCEEMP. Tel.: +7 (917) 538-05-88. E-mail: votikovavs@expmed.ru

SUMMARY

Correspondence of the quality of drugs in terms of «Sterility» guarantees the safety of the use of drugs for injection and infusion, eye drops and films, pharmaceutical substances and excipients, including biological drugs and their solvents, which must be sterile in accordance with regulatory documents and pharmacopeia articles.

In the article, the authors consider the necessary conditions for the organization and conduct of the sterility test of drugs. The creation, operation and maintenance of the described conditions is in the area of responsibility of production, control and expert microbiological laboratories. Among the necessary conditions, the following are highlighted: a special aseptic room with a certain confirmed purity class; microbiological monitoring; proven sterility of all consumables, solutions and culture media used; test methods used with proven applicability.

Actively discusses the issue that arises when a contaminated sample is detected. The revealed fact requires an investigation of the causes of the situation and a possible further recognition of the drug as poor in terms of «Sterility».

The materials are included in the draft General Pharmacopeia Monograph «Conditions for determining the sterility of drugs», which is currently under consideration and approval in the prescribed manner for further inclusion in the State Pharmacopeia of the Russian Federation.

Key words: quality of medicines, sterility.

For reference: Gunar O.V., Dorenskaya A.V., Votikova V.Sh. To the question of creating conditions for determining the sterility of drugs in the microbiological laboratory. *Farmatsiya*, 2020; 69 (4): 5–9. <https://doi.org/10/29296/25419218-2020-04-01>

Среди многочисленных показателей качества определенных лекарственных средств (ЛС) особого внимания заслуживает показатель «Стерильность». Именно этот параметр качества является обязательной характеристикой безопасности лекарственных препаратов (ЛП) для инъекций и инфузий, глазных капель и пленок, фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, включая биологические ЛП и их растворители, которые в соответствии с нормативной документацией и фармакопейными статьями должны быть стерильными [1].

Испытание стерильности ЛС может быть выполнено с помощью, так называемых фармакопейных методик прямого посева или мембранной фильтрации, описанных в ОФС «Стерильность» Государственной фармакопеи РФ (ГФ РФ) текущего издания. Кроме того, в настоящее время в Российской Федерации доступны различные модифицированные (альтернативные) методики при условии их валидации по параметрам, утвержденным в ОФС «Валидация микробиологических методик» [1].

Таким образом, имея набор рутинных и(или) альтернативных валидированных методик, специалист-микробиолог производственной, экспертной или контрольной лаборатории может подтвердить качество и безопасность испытуемого образца по показателю «Стерильность». По полученному результату судят о стерильности всей, порой многотоннажной серии ЛП. Возникает задача: получить достоверный, безошибочный результат анализа, который возможно достичь только в определенных контролируемых лабораторных условиях.

В настоящей работе рассмотрены и обоснованы условия анализа стерильности для получения достоверных результатов испытания качества ЛС.

Для достижения указанной цели с помощью системного подхода были обобщены несколько обязательных условий, которые необходимы для получения достоверных результатов испытания стерильности ЛС.

Асептическое помещение определенного подтвержденного класса чистоты. Правила надлежащей производственной практики (GMP), функционирующие в развитых странах, рекомендуют проводить испытание стерильности ЛС в строго определенных рабочих пространствах с поддержанием и регулярным подтверждением асептических условий, в частности класса чистоты А (например, ламинарная установка), расположенная в помещении класса чистоты В [2]. Воздух, подаваемый в зоны классов А и В, должен быть однонаправленным и проходить через систему специальных высокоэффективных фильтров (например, HEPA).

В некоторых случаях работу по анализу стерильности ЛС целесообразно выполнять в изоляторе, который обеспечивает максимальную защиту оператора от потенциально опасных веществ, находящихся в камере, и в полной мере снижает риск микробиологической контаминации исследуемых образцов. Приобретение изолятора позволяет оптимизировать материальные затраты на создание и обслуживание чистых помещений, избегая реконструкции имеющихся лабораторных помещений, так как изолятор допустимо устанавливать в контролируемых условиях класса чистоты D [3] или неклассифицируемой зоны.

Класс чистоты лабораторного помещения, ламинарной установки или изолятора следует подтверждать не реже одного раза в год. На основе анализа рисков может быть установлена альтернативная частота проведения этих работ в конкретной лаборатории.

Важной составляющей функционирования помещения для испытания стерильности ЛС является воздух. При подаче отфильтрованного воздуха в рабочее помещение необходимо поддерживать положительный перепад давления относительно зон с более низким классом чистоты. Для смежных зон с разными классами чистоты (например, А и В) разница в давлении может составлять 10–15 Па [2]. Для обеспечения чистоты помещений в оснащённом состоянии специалисты каждого подобного подразделения разрабатывают индивидуальную документированную программу очистки и дезинфекции рабочих помещений. Для этих целей применяют несколько типов дезинфицирующих средств и проводят их периодическое обихованное чередование [3].

Микробиологический мониторинг. Это комплексное и динамическое наблюдение за микроорганизмами, присутствующими в окружающей рабочей среде лаборатории микробиологии с учетом их свойств, особенностей циркуляции и в случае необходимости выявления причин появления. Микробиологический мониторинг – это своего рода профилактическое мероприятие, используемое для стандартной работы микробиологической лаборатории в контролируемых условиях и необходимое для оценки качества жизнеспособных микроорганизмов, присутствующих в чистом помещении [4, 5].

Для целей мониторинга, как правило, разрабатывают программу, которая имеет статус обязательного к исполнению документа и содержит следующую информацию: виды выполняемого мониторинга в зависимости от класса помещения; ответственность персонала за те или иные выполняемые операции; описание помещений, точек отбора и план их размещения, включая установленные критические точки (например, место открытого продукта, зона частого вмешательства оператора и т.д.); периодичность отбора и время взятия проб; ссылки на методики отбора проб, анализа, учета и оценки результатов, с указанием используемого оборудования (например, калиброванных и поверенных пробоотборников микроорганизмов и аэрозольных частиц); описание мер, которые должны быть приняты при превышении допустимых пределов по содержанию микроорганизмов и частиц, установленных в зависимости от класса чистоты помещения [6–8].

Рабочую среду помещений и зон определенных классов чистоты контролируют с помощью микробиологического мониторинга и путем из-

мерения, фиксации и учета аэрозольных частиц. Для всех видов мониторинга первостепенное значение имеют точки отбора проб и периодичность отбора. Эту информацию фиксируют в программе мониторинга. На основе анализа рисков и результатов, полученных при первичной (установочной) классификации/аттестации чистых помещений и(или) зон проводят выбор точек отбора проб. При функционировании лабораторных помещений отслеживают тенденции изменений установленных параметров рабочей среды.

Микробиологический мониторинг окружающей среды при анализе стерильности ЛС проводят в рабочих (динамических) условиях в процессе каждого выполнения испытания ЛС, доказывая тем самым, что анализ проходил в контролируемых условиях [5]. Мониторинг следует проводить в соответствии с видом контролируемого помещения (ламинарной установки или изолятора). Практически он включает комбинацию процедур отбора проб воздуха для оценки содержания микроорганизмов и взвешенных аэрозольных частиц, проб с рабочих поверхностей и рук персонала и т.д. Главным моментом при оценке результатов мониторинга являются те действия, которые должен выполнить персонал при возникновении нештатных ситуаций, когда установленные пределы по количеству микроорганизмов и аэрозольных частиц в воздухе превышены. Кроме того, целесообразно подробно осветить вопросы профилактических мер, касающиеся уборки и дезинфекции помещений и оборудования, антисептические мероприятия, выполняемые персоналом лаборатории перед проведением рабочих процедур, а именно переодевание, обработка рук и т.д. [8].

Важным условием правильной работы помещения являются температурный режим и перепад давления, который фиксируют после регистрации с помощью поверенных термометров и манометров, установленных снаружи помещения. В случаях, когда в помещении функционирует валидированная непрерывная система мониторинга, показывающая отклонения с помощью световых и звуковых сигналов, фиксация носит облегченный характер.

Таким образом, окружающая среда лабораторного помещения должна соответствовать заранее установленным в соответствии с правилами GMP требованиям по содержанию микроорганизмов и взвешенных аэрозольных частиц в воздухе рабочего пространства, температуре, влажности, перепаду давления.

Доказанная стерильность всех используемых расходных материалов, растворов и питательных сред. Каждая серия (партия) используемой питательной среды должна быть стерильна, а также соответствовать требованиям ОФС «Стерильность» по ростовым свойствам, что подтверждают до проведения испытания. Допускается проводить контроль качества питательных сред одновременно с выполнением анализа, однако, если среда признана непригодной, результаты испытания стерильности ЛС считают недостоверными [1]. Доставку образцов, стерильных материалов и питательных сред до места анализа стерильности осуществляют в соответствии с документированной процедурой, исключающей возможность контаминации.

Методика испытания с доказанной применимостью в условиях конкретной лаборатории. Стандартные методики анализа качества ЛС по показателю «Стерильность» – прямой посев и мембранная фильтрация – имеют ряд особенностей, которые следует учитывать при проведении испытания и учете результатов. Для выбора подходящей методики испытания специалистам-микробиологам нужно иметь информацию об антимикробном действии ЛС, о физико-химических свойствах образца, его растворимости и возможных взаимодействиях с растворителями и(или) питательными средами, а также необходимых способах пробоподготовки [1, 5, 6]. Во избежание ложноотрицательных результатов для установления контаминации препарата проводят оценку применимости методики, как указано в ОФС «Стерильность».

Главный вопрос при выполнении теста «Стерильность» возникает при первичном выявлении контаминированного образца, когда в питательных средах фиксируют видимые признаки роста микроорганизмов, а именно: в проходящем свете обнаружены опалесценция, помутнение, осадок и прочие атрибуты микробного роста. Такая ситуация требует расследования причин ее возникновения и, возможно, в дальнейшем брака препарата. Когда результат первоначального испытания признан недействительным по причинам, не связанным с исследуемым образцом, необходимо подтвердить, что в ходе испытания были допущены одна или несколько из перечисленных ошибок:

- получены неудовлетворительные результаты микробиологического мониторинга окружающей среды (воздушной среды, поверхностей и рук персонала и др.);

- выявлены методические ошибки при поведении теста;
- обнаружен рост микроорганизмов при проверке стерильности растворителя/разбавителя («отрицательный» контроль);
- используемая питательная среда нестерильна и(или) ее ростовые свойства неудовлетворительны;
- выявлены ошибки в ходе процесса стерилизации материалов;
- показана идентичность микроорганизмов, выделенных из испытуемого образца, проб после микробиологического мониторинга окружающей среды и(или) в питательной среде без препарата («отрицательном» контроле).

Для идентификации выделенных микроорганизмов-контаминантов, как правило, необходимо и достаточно использовать микробиологические и биохимические способы, указанные в ОФС «Микробиологическая чистота» действующего издания ГФ РФ. Если в качестве единственного критерия для признания недействительными результатов испытания стерильности ЛС выбрана позиция по идентичности микроорганизмов, для идентификации обнаруженных микроорганизмов необходимо использовать молекулярно-генетические методы идентификации, являющиеся более чувствительными, чем биохимические. Только молекулярно-генетическое исследование микроорганизмов, выделенных из испытуемого образца, используемых материалов и окружающей среды, позволит с высокой вероятностью подтвердить их идентичность, не допустив ошибочно признать стерильный препарат несоответствующим требованиям, т.е. нестерильным. Установление истинной причины обнаруженной контаминации возможно только с помощью современных молекулярно-генетических методов, способных доказать общее происхождение выделенных изолятов [10].

Любая методика определения стерильности ЛС подразумевает либо отсутствие микробного роста, либо выявление микроорганизмов исключительно в испытанных образцах. При этом интерпретация результатов основана на предположении, что содержимое всех и каждой единицы (ампулы, флакона и др.) в серии, если бы они были протестированы на самом деле, также соответствует либо не соответствует установленным требованиям. В связи с этим ключевую роль в обеспечении необходимой степени достоверности полученных данных играет разработка надле-

жащего плана отбора проб. В соответствии с правилами GMP в случае асептического производства в план включают образцы, приготовленные в начале, в середине, в конце производственного цикла и после существенных вмешательств в технологический процесс.

Вероятность выявления контаминации в ходе испытания стерильности, как правило, увеличивается с возрастанием количества микробных клеток в исследуемом образце, а также варьируется в зависимости от вида присутствующего микроорганизма [9, 11, 12]. Для установления несоответствия серии ЛС требованиям стерильности необходимо и достаточно, чтобы в числе исследуемых образцов нестерильной была хотя бы одна единица. Если микробная контаминация неоднородно распределена в серии, случайный отбор образцов не позволяет определить загрязнение с необходимым уровнем точности, что также необходимо учесть при составлении плана отбора проб [8].

Перевозку и хранение образцов осуществляют таким образом, чтобы обеспечить их целостность, а также, чтобы условия, время и температура хранения не влияли на правильность результатов испытания.

Заключение о качестве всей серии ЛС на основании удовлетворительного результата испытания стерильности можно сделать только при соблюдении следующих условий: подтвержденной однородности серии; доказанной стабильности производства; эффективности плана отбора проб.

Таким образом, достоверные результаты анализа качества ЛС по показателю «Стерильность» могут быть получены при системном подходе к изучению, соблюдению и фиксации данных всех перечисленных условий испытания. Материалы включены в проект ОФС «Условия определения стерильности лекарственных средств», находящийся на рассмотрении и утверждении в установленном порядке для дальнейшего включения в Государственную Фармакопею РФ.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. [Электронное издание] Режим доступа: <https://femb.ru/femb/pharmacopea.php> [The State Pharmacopoeia of The Russian Federation, XIV-ed. [Electronic resource]. Access mode: <https://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (in Russian)].
2. Приказ Министерства промышленности и торговли от 14 июня 2013 г. №916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств». [Order of the Ministry of Industry and Trade of June 14, 2013 №916 «On approval of the Rules for the organization of production and quality control of medicines» (in Russian)].
3. Sandle T. Designing and Implementing an Environmental Monitoring Program. Biocontamination Control for Pharmaceuticals and Healthcare, 2019. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/environmental-monitoring> (circulation date 12.12.2019).
4. Sandle T. Microbiology laboratory techniques. Pharmaceutical Microbiology, 2016. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/environmental-monitoring> (circulation date 12/12/2019).
5. Правила GMP – электронная система обучения. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://e-learning.favea.org/instructions/presentation> (дата обращения 12.12.2019). [Rules of GMP – electronic learning system. [Electronic resource]: Access mode: <https://e-learning.favea.org/instructions/presentation> (circulation date 12.12.2019). (in Russian)].
6. European Pharmacopoeia Online. European Directorate for the Quality of Medicines, 2017. [Electronic resource]. Access mode: <https://online.edqm.eu/> (circulation date 12/12/2019).
7. Salaman-Byron A.L. Limitations of microbiological environmental monitoring methods in cleanrooms. Research & Development, 2018. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/349192-Limitations-of-Microbial-Environmental-Monitoring-Methods-in-Cleanrooms/> (circulation date 12/12/2019).
8. Sandle T. Viable Environmental Monitoring Methods. Biocontamination Control for Pharmaceuticals and Healthcare, 2019. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/environmental-monitoring/> (circulation date 12/12/2019).
9. United States Pharmacopoeia. Vol 40<1113> Microbiological characterization, identification and typing of strains. Rockville, Maryland, USA. 2015.
10. Riley B. Rapid Microbiology Methods in the Pharmaceutical Industry. American pharmaceutical review, 2006 [Electronic resource] Access mode: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/113094-Rapid-Microbiology-Methods-in-the-Pharmaceutical-Industry/> (circulation date 12/12/2019).
11. Гунар О.В., Сахно Н.Г. Количественное определение микроорганизмов-контаминантов лекарственных средств с использованием системы «Milliflex® quantum». Фармация. 2019; 68 (3): 5–11. [Gunar O.V., Sakhno N.G. Quantitative detection of microbial contaminants of drugs, by using the «Milliflex® quantum system». Farmatsiya. 2019; 68 (3): 5–11 (in Russian)].
12. Dalmaso G., Denoya C. Qualification of environmental monitoring program. Technical marking, 2015. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/349192-Limitations-of-Microbial-Environmental-Monitoring-Methods-in-Cleanrooms/> (circulation date 12/12/2019).

Поступила 15 мая 2020 г.

Received 15 May 2020

Принята к публикации 16 июня 2020г.

Accepted 16 June 2020