

Питательные среды в фармакопейном анализе: применение, действующие требования, вопросы стандартизации

С. М. Суханова, Н. Е. Захарова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Ключевую роль в обеспечении безопасности, качества и эффективности лекарственных препаратов, и в первую очередь биологических лекарственных препаратов, играют питательные среды (ПС) с заданными свойствами. Необходимость формирования четких критериев пригодности ПС обусловлена их использованием не только в процессе производства, но и при анализе качества. Расширение спектра производства сложных высокотехнологичных лекарственных средств, действующее вещество которых получено из биологического источника и для определения свойств и качества которых необходимы биологические методы, влечет за собой повышение требований к качеству ПС. Цель работы — изучение требований к питательным средам, используемым при производстве лекарственных средств, для определения направлений разработки национального стандарта. В настоящее время ПС исключены из Государственного реестра лекарственных средств и не имеют стандартов, использование которых позволило бы производителю подтвердить соответствие ПС конкретным требованиям безопасности, эффективности и качества. В статье приведены результаты анализа требований Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. и девяти ведущих зарубежных фармакопей к ПС различного назначения (производственные, вспомогательные и для анализа качества). Отмечено, что большинство стран регламентируют в основном требования к ПС, используемым для анализа чистоты лекарственных средств. Перечень требований (тест-штаммы, условия инкубации и хранения, подготовка к использованию, оценка пригодности), подходы к их установлению и изложению различны. В работе отражены основные проблемы и риски, связанные с оценкой качества ПС в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. Определены современные отечественные и мировые тенденции, направленные на повышение качества ПС, используемых при производстве лекарственных препаратов, и обоснована целесообразность создания соответствующего национального стандарта. Предложены направления разработки и стандартизации требований к качеству различных групп сред, используемых при производстве и контроле лекарственных средств, которые могут быть использованы при подготовке ОФС Питательные среды.

Ключевые слова: питательные среды; фармакопейные стандарты качества; биологические лекарственные препараты; оценка качества; стерильность; тиогликолевая среда

Для цитирования: Суханова СМ, Захарова НЕ. Питательные среды в фармакопейном анализе: применение, действующие требования, вопросы стандартизации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(3):136–144. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-136-144>

Контактное лицо: Захарова Наталья Евгеньевна; Zaharova@expmed.ru

Culture Media in Pharmacopoeial Analysis: Use, Current Requirements, Standardisation

S. M. Sukhanova, N. E. Zakharova*

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

Culture media with predetermined specific characteristics play a key role in ensuring safety, quality and efficacy of medicinal products, especially biologicals. It is necessary to formulate clear criteria for culture media suitability, because they are used not only in manufacture, but also in quality control of medicinal products. The expansion of the range of complex high-technology medicinal products containing biologically derived substances as active ingredients, whose quality and properties are tested by biological methods, calls for more stringent requirements for the quality of culture media. The aim of the study was to analyse requirements for the culture media used in the production of medicinal products — in order to identify approaches to the development of a national standard. Currently, culture media are not included into the State Register of Medicinal Products, and there are no standards that could be used by manufacturers to confirm that a culture medium complies with specific safety, efficacy and quality requirements. The paper summarises the results of the analysis of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed., and nine leading world pharmacopoeias' requirements for culture media used for various purposes (manufacture, auxiliary purposes, and quality control). Most countries have adopted requirements mainly for those culture media that are used in purity tests. The analysis revealed differences both in the lists of

requirements (test strains, incubation and storage conditions, preparation for use, suitability assessment), and the approaches to the establishment and presentation of requirements. The paper discusses the main challenges and risks associated with the quality control of culture media in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed. It outlines current national and international ways of improving the quality of culture media used in the production of medicinal products, and substantiates the need to develop an appropriate national standard. The paper suggests approaches to the development and standardisation of requirements for the quality of various types of media used in the production and control of medicines. These approaches could be used in the preparation of the general chapter Culture media.

Key words: culture media; pharmacopoeial quality standards; biological products; quality control; sterility; thioglycollate medium

For citation: Sukhanova SM, Zakharova NE. Culture media in pharmacopoeial analysis: use, current requirements, standardisation. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(3):136–144. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-136-144>

Corresponding author: Natalia E. Zakharova; Zaharova@expmed.ru

Питательные среды (ПС) — однокомпонентные или многокомпонентные субстраты, широко применяемые в различных отраслях науки и производства для культивирования и изучения микроорганизмов или культур клеток высших организмов. Их используют в санитарной и клинической микробиологии для диагностики заболеваний и изучения объектов окружающей среды, в пищевой и фармацевтической промышленности при производстве и контроле качества продукции, в криминалистике. В последние годы в связи с расширением спектра производства, прежде всего, сложных биологических лекарственных препаратов (БЛП), к которым относятся иммунобиологические, биотехнологические и генотерапевтические лекарственные препараты, значимость ПС существенно возросла [1–3]. Выпуск БЛП невозможен без использования ПС как в процессе производства, так и при оценке качества. Качество этих «критических реагентов» (critical reagents)¹, обеспечивает и определяет качество лекарственных препаратов. Учитывая, что приоритетом государственного регулирования является безопасность, качество и эффективность лекарственных средств (ЛС)², использование при производстве отвечающих соответствующим требованиям ПС является актуальной задачей.

Цель работы — изучение требований к питательным средам, используемым при производстве лекарственных средств, для определения направлений разработки национального стандарта.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи.

1. Изучить нормативную базу, определяющую в Российской Федерации требования к ПС различного назначения.

2. Провести анализ требований фармакопеи Российской Федерации и ведущих зарубежных фармакопей к ПС, используемым при производстве ЛС.

3. Определить направления разработки и стандартизации национальных требований к ПС, используемым при производстве ЛС.

До введения в действие XII изд. Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) ПС для контроля микроб-

ной загрязненности (так называемые «номерные среды» — № 1–15), а также другие ПС различного целевого назначения, относившиеся к иммунобиологическим лекарственным препаратам, в том числе и для контроля стерильности ЛС, проходили государственную регистрацию с утверждением на них фармакопейного стандарта: фармакопейной статьи (ФС) и/или фармакопейной статьи предприятия (ФСП). ФС традиционно включала перечень показателей, нормативные требования, а также подробное описание методов контроля качества соответствующей ПС³. На сегодняшний день ПС не включаются в Государственный реестр ЛС и не имеют действующих государственных стандартов качества⁴, а нормативно-правовое регулирование производства и применения ПС осуществляется в соответствии с их назначением. Подтверждение соответствия микробиологических ПС, основ питательных и сырья биологического для вирусологических ПС, применяемых в медицине, осуществляется в форме принятия декларации о соответствии⁵. При принятии декларации о соответствии производитель (заявитель) на добровольной основе подтверждает соблюдение требований нормативной документации [4]. Государственной регистрации в качестве медицинского изделия подлежат среды, предназначенные исключительно для диагностики инфекционных заболеваний⁶. Требования к медицинским изделиям для диагностики *in vitro* регулируются ГОСТ Р 51088-2013⁷, ГОСТ Р 51352-2013⁸, ГОСТ Р ЕН 12322-2010⁹. Для обеспечения качества результатов исследований необходимо применение стандартных ПС, реагентов и использование стандартных методик проведения и учета результатов. Однако стандарты, использование которых позволило бы производителю подтвердить соответствие своего изделия конкретным требованиям безопасности, эффективности и качества, в данных документах отсутствуют. ПС, используемые в иных целях, в том числе для научных и санитарно-эпидемиологических исследований, для микробиологического контроля образцов пищевых продуктов, кормов животных, фармацевтических и косметических продуктов, образцов окружающей среды,

¹ Guidelines for independent lot release of vaccines by regulatory. WHO; 2010. https://www.who.int/biologicals/Guidelines_for_Lot_Release_AFTER_ECBS_27.1.2011.pdf

² Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

³ Государственный реестр лекарственных средств. Минздрав России; 2000.

⁴ Государственный реестр лекарственных средств. Минздрав России; редакция от 16.06.2019. <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>

⁵ Постановление Правительства Российской Федерации от 01.12.2009 № 982 (ред. от 21.02.2018) «Об утверждении единого перечня продукции, подлежащей обязательной сертификации, и единого перечня продукции, подтверждение соответствия которой осуществляется в форме принятия декларации о соответствии».

⁶ Федеральный закон Российской Федерации от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

⁷ ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

⁸ ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний.

⁹ ГОСТ Р ЕН 12322-2010 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред.

государственной регистрации в качестве медицинских изделий не подлежат. Для работников организаций, осуществляющих изготовление ПС при серийном промышленном выпуске, а также для микробиологических лабораторий, распространяющих или изготавливающих ПС для микробиологии для собственного использования, контроль качества осуществляется согласно МУК 4.2.2316-08¹⁰, для микробиологических лабораторий пищевой промышленности — согласно ГОСТ ISO 11133-2016¹¹ [5, 6]. Наиболее полно на сегодняшний день требования к качеству и методам контроля бактериологических ПС в зависимости от их назначения изложены в МУК 4.2.2316-08, а именно, их классификация и полный перечень показателей качества, включающий физико-химические показатели, а также специфическая активность (чувствительность среды, дифференцирующие, ингибирующие свойства, эффективность среды, показатель прорастания и др.). Приведена техника приготовления сред, контроля их чистоты, условия хранения, наименование тест-штаммов, необходимых для оценки специфической активности, а также условия инкубации посевов. Тем не менее, учитывая современные тенденции, направленные на повышение требований к производству и качеству ЛС, данный документ также не представляется исчерпывающим для соответствующего применения.

Основные стандарты, предназначенные для оценки качества ЛС, включая требования к используемым в целях проведения анализа реагентам и материалам, в нашей стране регламентируются ГФ РФ¹². В XIV изд. ГФ РФ включены общие ФС (ОФС) на реактивы, титрованные и буферные растворы, однако аналогичный отечественный стандарт на ПС до настоящего времени не введен в практику фармакопейного анализа¹³. Необходимо отметить, что в ОФС 1.3.0001.15 Реактивы. Индикаторы приводятся сведения об отдельных реактивах и индикаторах (глюкоза, натрия хлорид, динатрия фосфат, феноловый красный, фуксин основной), которые могут выступать в качестве вспомогательных компонентов ПС. Однако ПС в отличие от химических реактивов имеют, как правило, более сложный состав, поскольку содержат в качестве основы неоднородное по своим свойствам, характеризующееся высокой степенью вариабельности биологическое сырье, качество которого главным образом обеспечивает качество самой среды [3].

В связи с этим для установления требований к качеству ПС, используемых не только для производства, но и для оценки качества лекарственных препаратов, этой информации, безус-

ловно, недостаточно. Общий анализ статей ГФ РФ XIV изд. подтверждает, что ПС различного назначения находят свое применение как на подготовительных этапах, так и в процессе производства ЛС и оценки их качества. Использование ПС различного назначения предусмотрено требованиями более 30 ОФС на методы анализа и группы препаратов, а также практически всеми ФС, предусматривающими оценку стерильности или микробиологической чистоты готового ЛС. Обобщение и систематизация данных ГФ РФ XIV изд. по целевому назначению ПС, используемых для выпуска ЛС, позволяет условно разделить их на две основные группы: производственные и непроизводственные (рис. 1).

Дальнейший критический анализ статей ГФ РФ XIV изд. показал, что приводимая информация, касающаяся общих сведений в отношении выбора и подготовки ПС различного назначения, как правило, ограничивается требованием к использованию оптимальной/адекватной среды и/или к приготовлению ее в соответствии с приведенной в фармакопее рецептурой, а при использовании коммерческих сред — в соответствии с инструкцией производителя. Установлено, что подходы к изложению и объему приводимой информации, требованию к составу и оценке пригодности, условиям и срокам хранения, режиму стерилизации и объему выборки при проверке стерильности ПС могут значительно различаться и не всегда соответствовать руководящим документам по ПС¹⁴.

Наличие такого рода разночтений может приводить к затруднениям при воспроизведении методик, а также стать причиной признания испытания недостоверным. Необходимо отметить, что наиболее полно в ГФ РФ XIV изд. описаны требования к средам, применяемым для анализа чистоты ЛС по показателям «Стерильность»¹⁵ и «Микробиологическая чистота»¹⁶, однако и в этих документах прописи ПС, способы приготовления и условия контроля их специфических свойств описаны с различной степенью детализации, иногда с взаимоисключающими рекомендациями. В качестве примера в таблице 1 приведены отличия требований ОФС 1.2.4.0003.15 Стерильность и ОФС 1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота к одной и той же по назначению среде Сабуро.

Сходная ситуация наблюдается и в отношении изложения требований в ОФС к условиям и срокам хранения ПС. Приготовленные в лаборатории среды, предназначенные для оценки качества ЛС по показателю «Стерильность», могут храниться при температуре «от 2 до 25 °С в защищенном от света месте

¹⁰ МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред.

¹¹ ГОСТ ISO 11133-2016 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред.

¹² Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

¹³ Общая фармакопейная статья 1.3.0001.15 Реактивы. Индикаторы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.3.0002.15 Титрованные растворы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.3.0003.15 Буферные растворы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁴ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0003.15 Бифидосодержащие пробиотики. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0009.15 Споровые пробиотики. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.2.0006.15 Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.2.0001.15 Безопасность пробиотиков в тестах in vivo. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред.

¹⁵ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁶ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

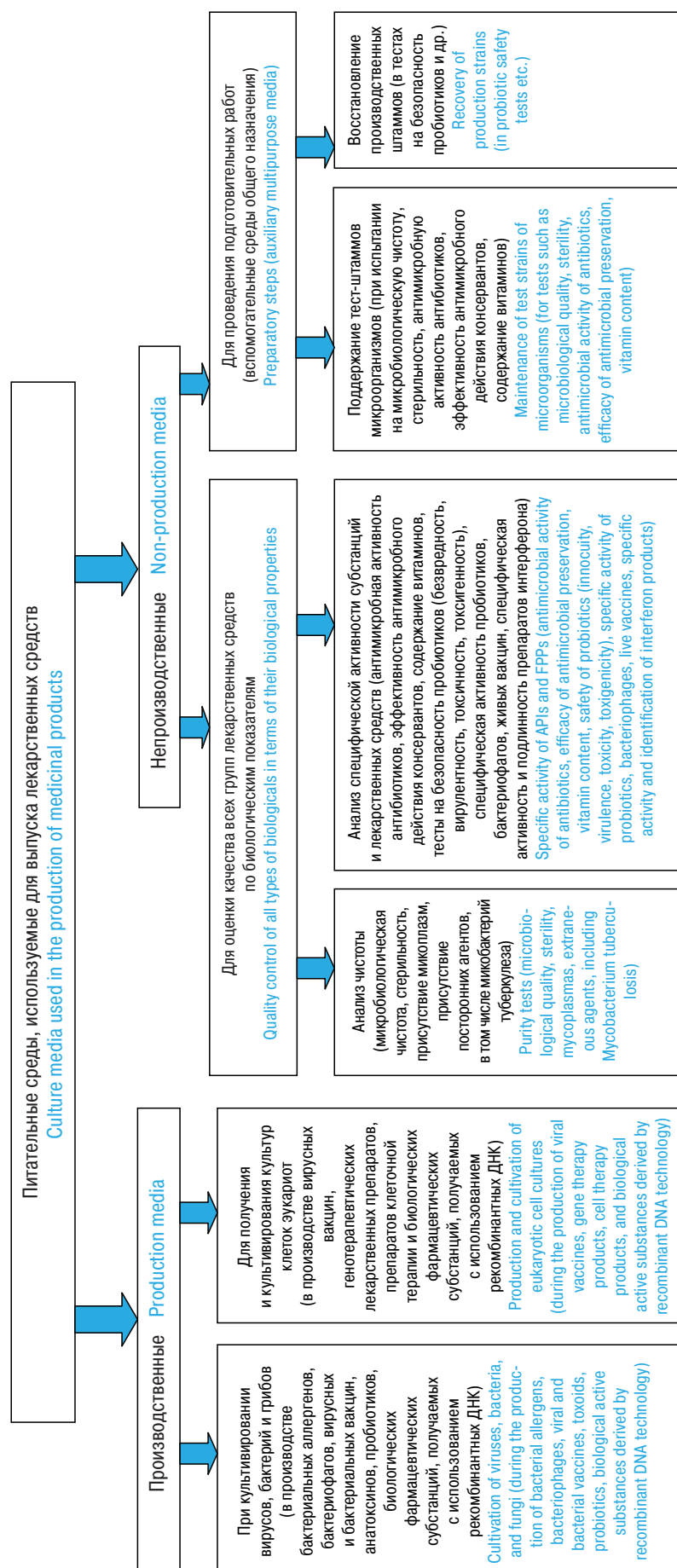


Рис. 1. Систематизация питательных сред в фармакопейном анализе (в рисунке использованы материалы общих фармакопейных статей: 1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота; 1.2.4.0003.15 Стерильность; 1.2.4.0010.18 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар; 1.2.4.0011.15 Определение эффективности антимикробных консервантов; 1.2.4.0012.15 Определение содержания витаминов в многокомпонентных лекарственных препаратах микробиологическим методом; 1.7.1.0001.15 Алергены; 1.7.1.0002.15 Бактериофаги; 1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины; 1.7.1.0007.15 Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК; 1.7.1.0008.15 Пробиотики; 1.7.1.0009.15 Спорные пробиотики; 1.7.2.0001.15 Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*; 1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток; 1.7.2.0006.15 Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов; 1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков; 1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам — субстратам производства биологических лекарственных препаратов; 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм; 1.9.1.0001.18 Генотерапевтические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018).

Fig. 1. Types of culture media used in pharmacopoeial analysis (the figure was drawn based on the texts of the following general chapters: 1.2.4.0002.18 Microbiological quality; 1.2.4.0003.15 Sterility; 1.2.4.0010.18 Determination of antimicrobial activity of antibiotics by the diffusion method; 1.2.4.0011.15 Efficacy of antimicrobial preservation; 1.2.4.0012.15 Determination of vitamin content in multi-component medicinal products by the microbiological method; 1.7.1.0001.15 Allergens; 1.7.1.0002.15 Bacteriophages; 1.7.1.0004.15 Vaccines and toxins; 1.7.1.0007.15 Medicinal products derived by recombinant DNA technology; 1.7.1.0008.15 Probiotics; 1.7.1.0009.15 Spore probiotics; 1.7.2.0001.15 Safety of probiotics *in vivo* tests; 1.7.2.0002.15 Cell-culture based biological assays used for interferon products; 1.7.2.0006.15 Tests for extraneous agents in viral vaccines; 1.7.2.0009.15 Specific activity of probiotics; 1.7.2.0011.15 Requirements for cell cultures used as substrates in the production of biological products; 1.7.2.0031.15 Mycoplasma tests; 1.9.1.0001.18 Gene therapy medicinal products. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed.; 2018).

Таблица 1. Примеры отличий требований к среде Сабуро ОФС 1.2.4.0003.15 Стерильность и ОФС 1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота

Table 1. Examples of differences in the requirements for Sabouraud medium described in general chapters OFS 1.2.4.0003.15 Sterility and OFS 1.2.4.0002.18 Microbiological quality

Название ОФС General chapter	Питательная среда Culture medium	Компоненты питательной среды, г/л Culture medium components, g/L			
		пептон ферментативный enzymatic peptone	пептон мясной meat peptone	пептон казеиновый casein peptone	глюкозы моногидрат glucose monohydrate
ОФС 1.2.4.0003.15 Стерильность OFS 1.2.4.0003.15 Sterility	Жидкая среда Сабуро Sabouraud Liquid Medium	10,0	-	-	40,0
ОФС 1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота OFS 1.2.4.0002.18 Microbiological quality	Бульон Сабуро Sabouraud Broth	-	5,0	5,0	20,0

в течение 1 месяца или иного валидированного срока». При этом аналогичные ПС лабораторного изготовления, предназначенные для оценки качества ЛС по показателю «Микробиологическая чистота», следует хранить при комнатной температуре (т.е. от 15 до 25 °С) до окончания срока годности (?) или 3 месяца при температуре 2–8 °С. Помимо этого требования к оценке пригодности и хранению ПС, предназначенных для испытания БЛП, содержащих живые микроорганизмы, по показателю «Микробиологическая чистота» не приводятся, а условия инкубации (32,5 ± 2,5) °С при оценке ростовых свойств (МПА, агар Эндо) отличаются от условий инкубации (37 ± 1) °С при проведении испытаний, что противоречит рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) инкубировать среды при той же температуре, при которой проводятся испытания¹⁷. Различные режимы инкубации рекомендованы также и для контроля стерильности приготовленных в лабораториях ПС.

Сравнительный анализ требований девяти ведущих зарубежных фармакопей: Республики Беларусь (БФ), Казахстан (КФ), Украины (ГФУ), Индии (ИФ), Великобритании (БрФ), Японии (ЯФ), США (ФСША), а также Международной (МФ) и Европейской фармакопей (ЕФ)¹⁸ к ПС, используемым при производстве ЛС, показал, что ведущие фармакопеи мира, в том числе стран-членов ЕАЭС, также не имеют фармакопейного стандарта на ПС. Исключение составляет ФСША, в которой требования к ПС, предназначенным для оценки качества ЛС, обобщены и представлены в соответствующей монографии¹⁹. Документ включает как общие рекомендации по подготовке ПС к использованию (выбор надлежащих ПС, компонентов, воды;

соблюдение инструкций по приготовлению и рекомендации по взвешиванию, растворению, стерилизации, используемой посуде, измерению рН, проверке емкостей перед испытанием), так и требования к оценке их качества (определение рН и ростовых свойств, периодическая проверка стабильности качества для подтверждения срока годности), к хранению и утилизации, а также к контролю красителей для идентификации микроорганизмов.

В фармакопеях других стран также наибольшее внимание уделяется ПС, предназначенным для анализа качества ЛС, и, в первую очередь их чистоты, поэтому требования к составу ПС, порядку контроля и условиям его выполнения приводятся в монографиях, посвященных биологическим испытаниям. В соответствии с назначением ПС определяются подходы к оценке их пригодности. Основным критерием пригодности сред для анализа чистоты ЛС служит наличие роста соответствующих тест-штаммов после внесения не более 100 КОЕ и инкубации не более 5 суток, подтверждающего способность среды к выявлению искомым микроорганизмов. Для некоторых установленных требований допускается возможность отступления от четкой регламентации. В частности, разрешено использование тест-штаммов других коллекций, типичных по своим свойствам, других условий стерилизации, сроков хранения, объема выборки при условии валидации процедуры²⁰. Возможно изменение концентрации некоторых ингредиентов, особенно биологического происхождения, в связи с тем, что их качество может быть различным²¹. Вместе с тем, результаты сравнительного анализа требований к тиогликолевой среде,

¹⁷ WHO Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 530; 1973.

¹⁸ European Pharmacopoeia 9th ed.; 2017.

Государственная фармакопея Республики Беларусь. I изд.; 2006.

Государственная фармакопея Республики Казахстан. I изд.; 2008.

Государственная фармакопея Украины. II изд.; 2016.

Indian Pharmacopoeia. 2010.

British Pharmacopoeia. 2012.

Japanese Pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

The International Pharmacopoeia (First and Second Suppl.) 8th ed.; 2018.

USP 41–NF 36.

¹⁹ USP 41–NF 36 <1117> Microbiological best laboratory practices.

²⁰ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

European Pharmacopoeia 9th ed.; 2017.

Государственная фармакопея Республики Беларусь. I изд.; 2006.

Japanese Pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

Государственная фармакопея Украины. II изд.; 2016.

Indian Pharmacopoeia. 2010.

²¹ European Pharmacopoeia 9th ed.; 2017.

British Pharmacopoeia. 2012.

Таблица 2. Основные требования различных фармакопей к качеству жидкой тиогликолевой среды, используемой при испытании лекарственных средств по показателю «Стерильность»

Table 2. The main requirements for the quality of fluid thioglycollate medium used in sterility tests as described in different pharmacopoeias

Показатель Parameter	Требования к качеству питательной среды согласно фармакопеям Requirements for the culture medium quality as described in different pharmacopoeias		
	ГФ РФ XIV изд. ОФС 1.2.4.0003.15 Ph. Rus., 14th ed. OFS 1.2.4.0003.15	ЕФ, ЯФ, БФ, БрФ, ГФУ, КФ, МФ, ФСША Ph. Eur., JP, Ph. Bel., BP, Ph. Ukr., Ph. Kaz., Ph. Int., USP	ИФ IP
Назначение Intended use	Для выявления анаэробных, аэробных бактерий и грибов Detection of anaerobic and aerobic bacteria, and fungi	Для выявления в первую очередь анаэробных бактерий, но обнаруживает и аэробные бактерии Primarily intended for the detection of anaerobic bacteria; however, it will also detect aerobic bacteria	
Состав (отличия) Composition (differences)	Допускается, отличия в составе при условии соответствия требованиям по ростовым свойствам There may be differences in composition provided the requirements for growth promoting properties are met	Допускается отсутствие агара, раствора резазурина натрия Agar and resazurin sodium solution may be omitted	
Тест-штаммы Test strains	<i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus subtilis</i> или <i>Bacillus cereus</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Clostridium novyi</i> . При температуре 30–35 °С <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus subtilis</i> or <i>Bacillus cereus</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Clostridium novyi</i> . At 30–35 °С	<i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Micrococcus luteus</i> (<i>Kocuria rhizophila</i>) — альтернативный <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в ФСША и ИФ <i>Bacteroides vulgatus</i> — альтернативный <i>Clostridium sporogenes</i> в ФСША <i>Bacillus subtilis</i> — альтернативный <i>Clostridium sporogenes</i> в ИФ <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Micrococcus luteus</i> (<i>Kocuria rhizophila</i>) — as an alternative to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in USP and IP <i>Bacteroides vulgatus</i> — as an alternative to <i>Clostridium sporogenes</i> in USP <i>Bacillus subtilis</i> — as an alternative to <i>Clostridium sporogenes</i> in IP	
Условия инкубации Incubation conditions	При температуре 30–35 °С. При использовании в качестве универсальной дополнительно при температуре 20–25 °С At 30–35 °С. Additionally, at 20–25 °С, if used as multipurpose growth medium	При температуре 30–35 °С At 30–35 °С	
Режим стерилизации Sterilisation conditions	121 °С, 15 мин 121 °С, 15 min	Валидация Validation	120 °С, 20 мин 120 °С, 20 min
Условия хранения Storage conditions	В защищенном от света месте. При температуре от 2 до 25 °С Protected from light. At 2–25 °С	Валидация Validation	В защищенном от света месте. При температуре от 2 до 30 °С Protected from light. At 2–30 °С
pH	7,1 ± 0,2	7,1 ± 0,2	7,1 ± 0,2
Срок хранения Shelf-life	1 месяц или иной валидированный срок 1 month or another validated period	Валидация Validation	1 месяц 1 month

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации; ЕФ — Европейская фармакопея; ЯФ — фармакопея Японии; БФ — Государственная фармакопея Республики Беларусь; БрФ — Британская фармакопея; ГФУ — Государственная фармакопея Украины; КФ — Государственная фармакопея Республики Казахстан; МФ — Международная фармакопея; ФСША — фармакопея США; ИФ — фармакопея Индии; ОФС — общая фармакопейная статья.

Note. Ph. Rus. — State Pharmacopoeia of the Russian Federation; Ph. Eur. — European Pharmacopoeia; JP — Japanese Pharmacopoeia; Ph. Bel. — State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus; BP — British Pharmacopoeia; Ph. Ukr. — State Pharmacopoeia of Ukraine; Ph. Kaz. — State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan; Ph. Int. — International Pharmacopoeia; USP — United States Pharmacopoeia; IP — Indian Pharmacopoeia; OFS — general monograph.

рекомендованной всеми фармакопеями для оценки качества ЛС по показателю «Стерильность», представленные в таблице 2, свидетельствуют, что даже при практически одинаковом составе среды базовые рекомендации (режим стерилизации, тест-штаммы для оценки ростовых свойств, условия инкубации и хранения) в фармакопеях различных стран также могут существенно отличаться.

С различной степенью детализации приводится фармакопеями порядок приготовления этой среды, включающий необходимость проведения процедуры фильтрования, соблюдения соотношения площади поверхности среды к ее глубине при выборе емкости, а также проверки ее пригодности в отношении сохранения анаэробных условий. Например, в ГФ РФ XIV изд. требование по соблюдению соотношения площади поверхности среды к ее глубине не рассматривается в связи с тем, что в качестве емкостей рассматривается использование только пробирок, чем обеспечивается необходимое соотношение. Такое ограничение при выборе емкостей, на наш взгляд, нецелесообразно из-за высокой трудоемкости процедуры посева, а также невозможности ее выполнения в соответствии с требованиями ОФС 1.2.4.0003.15 Стерильность по минимальному количеству испытуемого препарата, необходимого для посева на ПС при исследовании образцов препаратов, выпускаемых большими сериями и/или в больших емкостях²².

В отношении выбора режима стерилизации большинство стран на сегодняшний день сходятся во мнении о необходимости валидации данной процедуры в связи с тем, что ее эффективность, а также ростовые свойства простерилизованной среды, зависят от различных факторов²³, в том числе и от объема стерилизуемых жидкостей. Только в ГФ РФ XIV изд. и ИФ приводятся конкретные, при этом различные, режимы стерилизации одной и той же среды: 121 °С 15 мин и 121 °С 20 мин, соответственно, при этом допускается использовать также и другие режимы, если они приведены в нормативной документации. То есть, по сути, это является прямым указанием на необходимость проведения валидации. Срок и условия хранения тиогликолевой среды большинством фармакопей также не указываются в связи с тем, что требования должны устанавливаться на основании результатов процедуры валидации. В качестве исключения можно привести наличие данной информации в ОФС 1.2.4.0003.15 Стерильность и в монографии ИФ (табл. 2).

Перечень основных штаммов, необходимых для оценки ростовых свойств тиогликолевой среды, в рассматриваемых фармакопеях преимущественно одинаков. Однако в России он расширен, с одной стороны, для возможности проведения испытания иммунобиологических лекарственных препаратов с помощью одной универсальной среды, а с другой — для сохранения национальных стандартов при проведении испытаний других ЛС [7, 8]. Возможность использования одной тиогликолевой среды для оценки качества препаратов с ртутьсодержащими консервантами в составе, которые не могут быть проконтролированы с помощью метода мембранной фильтрации, предусмотрена также требованиями ЕФ, ФСША, МФ, БФ,

при условии подтверждения в валидационных испытаниях ее способности поддерживать рост аэробных и анаэробных бактерий и грибов, засеянных в количестве не более 100 КОЕ. Согласно материалам ГФ РФ, ИФ, ФСША допускается изменение количества и наименования типичных по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам тест-штаммов, необходимых для оценки ростовых свойств тиогликолевой среды. Набор тест-штаммов может быть изменен также в зависимости от способа применения или состава испытуемого препарата, что представляется нам наиболее подходящим решением. Такой подход согласуется с рекомендациями ВОЗ²⁴, а также МФ²⁵, по возможности выбора разнообразных аэробных, анаэробных тест-штаммов бактерий и грибов, включая такие их виды, которые обнаруживаются в среде производственных помещений [9]. Несмотря на наличие во всех фармакопеях требования проверки на стерильность и ростовые свойства используемой среды, предмет проверки (серия, партия) и очередность проведения оценки качества (до или во время испытания) также могут не всегда однозначно трактоваться. Объем выборки для проведения испытания на стерильность самой среды указывается только в ГФ РФ XIV изд. При этом количество емкостей, необходимое для проведения испытания (не менее 5%), превышает нормы выборок для испытания образцов ЛС на стерильность (2%), а также для проверки готовых к применению сред²⁶ и не соответствует требованиям ОФС 1.4.0004.15 Отбор проб²⁷.

Анализ требований различных фармакопей, предъявляемых к ПС, на примере только тиогликолевой среды в рамках испытания ЛС на стерильность, выявил наличие многочисленных расхождений, касающихся как подготовки к испытанию, оценке качества, так и к условиям и срокам хранения среды. Для расширения возможностей испытания рядом фармакопей допускаются отклонения от жесткой регламентации процедуры, при сохранении принципа испытания, в связи с тем, что излишняя детализация и конкретизация процедур могут существенно ограничивать возможности испытания, особенно сложных высокотехнологичных ЛС, приводя при несоблюдении фармакопейных требований к признанию испытания недействительным. Изучение данных по ПС другого назначения позволило установить, что требования к качеству вспомогательных ПС в ГФ РФ XIV изд. и в рассматриваемых зарубежных фармакопеях ограничиваются общими положениями об их адекватности, использовании соответствующих методов посева и условий инкубации²⁸. Для полноценной эффективной работы с данной группой сред, обеспечивающих сохранение и стабильность свойств посевного материала и тест-штаммов, используемых при производстве и контроле ЛС, также необходимо формирование надлежащих требований.

Определяющими факторами для формирования требований российской и зарубежных фармакопей к качеству производственных ПС, как правило, являются вопросы, связанные с безопасностью готового продукта. Требования к качеству производственных ПС в ГФ РФ XIV изд. представлены с уче-

²² Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²³ WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series No. 978; 2010.

²⁴ WHO Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 530; 1973.

²⁵ Международная фармакопея. Третье издание. Т. 1; 1981.

²⁶ МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред.

²⁷ Общая фармакопейная статья 1.1.0004.15 Отбор проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁸ 5.2.3. Cell substrates for the production of vaccines for human use. European Pharmacopoeia 9th ed.; 2017.

Общая фармакопейная статья 1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам-субстратам производства биологических лекарственных препаратов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

том современных подходов к оценке наиболее актуальных рисков. Как и в ЕФ, в ГФ РФ XIV изд. установлены особые ограничения, предъявляемые к ряду компонентов ПС, используемых в производстве БЛП, которые не должны содержать ингредиентов, вызывающих токсические, аллергические или другие нежелательные реакции у людей, а при использовании таких компонентов следует продемонстрировать, что их количество в конечном продукте ниже уровня, гарантирующего безопасность для человека²⁹. Отмечается, что при оценке рисков особое внимание должно уделяться риску, связанному с контаминацией губчатой энцефалопатией животных и латентными вирусами³⁰. Согласно требованиям ГФ РФ XIV изд. одним из условий, обеспечивающим качество БЛП, является использование «адекватных» ПС, обладающих высокими ростовыми свойствами (сырье и реагенты, используемые при производстве ПС, должны иметь сертификаты, подтверждающие их качество)³¹. Не вызывает сомнения тот факт, что при выборе ПС для производства ЛС под «высокими ростовыми свойствами» должна подразумеваться не традиционная способность к выявлению контаминации, а требования к уровню соответствующей продуктивности и/или эффективности. В ЕФ отмечается необходимость учета рисков при использовании для производства вакцин ПС, содержащих компоненты животного происхождения. По согласованию с уполномоченным органом в ПС для выращивания клеток допускается использование сыворотки крови животных, но среда, используемая для поддержания роста клеток при размножении вируса, не должна содержать сыворотку крови, если не указано иначе в частной статье. Предпочтительно, чтобы среды, используемые в процессе производства, также не содержали антибиотиков³².

Обобщение данных фармакопей разных стран и современных требований, предъявляемых к производству ЛС, позволяет сделать вывод о том, что в качестве основного подхода при оценке качества ПС рассматривается важность соблюдения принципа управления рисками для качества. Надлежащая производственная практика напрямую связана с необходимостью проведения валидации, т. е. документированного подтверждения соответствия установленным требованиям и характеристикам качества всех процессов и методик применительно к конкретному производству и выпускаемой продукции, включая требования к качеству ПС. С целью доказательства пригодности ПС для оценки качества должны подтверждаться их ростовые свойства, методика испытания должна быть валидирована для каждой ПС и ЛС³³. При использовании эффективных сред в процессе производства (производственные среды) особое внимание должно быть уделено возможному риску контаминации конечного продукта.

Анализ действующей нормативной базы в части требований, предъявляемых к ПС, свидетельствует о целесообразности и необходимости разработки национального фармакопейного стандарта, в котором, принимая во внимание современные тенденции, направленные на унификацию международных требований, предъявляемых к качеству ЛС и повышению уровня фармакопейного анализа, следует отразить основные критерии и требования к качеству различных по назначению групп ПС, используемых при производстве и контроле ЛС. Решение поставленной задачи должно заключаться не столько в конкретизации и/или детализации требований к ПС, сколько в создании системного дифференцированного подхода к оценке качества сред различного назначения, включающего возможные от использования ПС риски, влияющие на качество ЛС.

Выводы

1. Анализ нормативной базы, определяющей требования к питательным средам в Российской Федерации, показал, что государственные стандарты, регламентирующие требования к питательным средам, используемым при производстве лекарственных средств, отсутствуют.

2. Установлено, что в России и за рубежом наиболее полно фармакопейные требования изложены к питательным средам, используемым для анализа чистоты лекарственных средств. Перечень требований, включающий подготовку питательной среды, оценку качества и условия хранения, а также подходы к их установлению и изложению, различны.

3. Обоснована целесообразность и определены основные направления разработки и стандартизации требований к качеству различных групп питательных сред, используемых при производстве и контроле лекарственных средств, для подготовки ОФС Питательные среды в Государственной фармакопее Российской Федерации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение государственных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

²⁹ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0002.15 Бактериофаги. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

European Pharmacopoeia 9th ed.; 2017.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0008.15 Пробиотики. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³⁰ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0010.18 Биологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³¹ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0010.18 Биологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0011.18 Биотехнологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³² 5.2.3. Cell substrates for the production of vaccines for human use. European Pharmacopoeia 9th ed.; 2017.

³³ Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».

Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (в ред. Федеральных законов № 192-ФЗ от 27.07.2010; № 271-ФЗ от 11.10.2010; № 313-ФЗ от 29.11.2010).

Литература/References

1. Суханова СМ, Захарова НЕ. Питательные среды в практике микробиологических исследований. В кн.: Лабинская АС, Волина ЕГ, ред. *Руководство по медицинской микробиологии*. Кн. 1. *Общая и санитарная микробиология*. М.: Бином; 2008. С. 221–54. [Sukhanova SM, Zakharova NE. Nutrient media in microbiological research practice. In: Labinskaya AS, Volina EG, eds. *Guideline on Medical microbiology*. Bk. 1. *General and Sanitary Microbiology*. Moscow: Binom; 2008. P. 221–54 (In Russ.)]
2. Sandle T. Selection of microbiological culture media and testing regimes. In: Saghee MR, Sandle T, Tidswell EC, eds. *Microbiology and Sterility Assurance in Pharmaceuticals and Medical Devices*. New Delhi: Business Horizons; 2010. P. 101–20.
3. Поляк МС, Сухаревич ВИ, Сухаревич МЭ. *Питательные среды для медицинской микробиологии*. СПб: НИЦФ; 2003. [Polyak MS, Sukharevich VI, Sukharevich ME. *Nutrient Media for Medical Microbiology*. St. Petersburg: RCPH; 2003 (In Russ.)]
4. Якимов ЮМ, Миронов АН, Борисевич ИВ, Меркулов ВА, Фокина АЛ, Волгин АР. К вопросу подтверждения соответствия иммунобиологических лекарственных препаратов требованиям нормативной документации. *Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2012;(3):19–22. [Yakimov YM, Mironov AN, Borisevich IV, Merkulov VA, Fokina AL, Volgin AR. On the question of conformity assessment of immunobiological preparations to the requirements of the normative documents. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2012;(3):19–22 (In Russ.)]
5. Шепелин АП, Дятлов ИА. *Питательные среды для энтеробактерий*. М.: Династия; 2017. [Shepelin AP, Dyatlov IA. *Nutrient Media for Enterobacteria*. Moscow: Dinastia; 2017 (In Russ.)]
6. Нечаев ВН, Манзенюк ИН, Шипулин ГА, Колин ВВ, Шепелин АП, Масыго АВ и др. Российские производители медицинских изделий для диагностики *in vitro* о проблемах в отрасли. *Современная лабораторная диагностика*. 2015;17(3):25–9. [Nechaev VN, Manzenuk IN, Shipulin GA, Kolin VV, Shepelin AP, Masyago AV, et al. Russian manufacturers of medical devices for *in vitro* diagnostics about problems in the industry. *Sovremennaya laboratornaya diagnostika = Modern Laboratory Diagnostics*. 2015;17(3):25–9 (In Russ.)]
7. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Захарова НЕ, Меркулов ВА. Испытание на стерильность иммунобиологических лекарственных препаратов в России. История вопроса и современные требования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):5–15. [Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Zakharova NE, Merkulov VA. Sterility testing of immunobiological medicinal products in Russia. Historical background and current requirements. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):5–15 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-5-15>
8. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Захарова НЕ, Голубенко ИА. Новый подход к испытаниям препаратов лекарственных средств на стерильность. В кн.: *Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней»*. М.; 2010. С. 108. [Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Zakharova NE, Golubenko IA. A new approach to testing drugs for sterility. In: *Theses of the All-Russian Scientific and Practical Conference «Vaccinology 2010. Improvement of Immunological Means of Prevention, Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases»*. Moscow; 2010. P. 108 (In Russ.)]
9. Sutton S. Assessment of culture media in pharmaceutical microbiology. *Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter*. 2007;13(7):3–9.

Об авторах / Authors

Суханова Светлана Михайловна, канд. биол. наук. *Svetlana M. Sukhanova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

Захарова Наталия Евгеньевна, канд. биол. наук. *Natalia E. Zakharova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0985-3694>

Поступила 08.07.2019

После доработки 02.08.2019

Принята к публикации 26.08.2019

Received 8 July 2019

Revised 2 August 2019

Accepted 26 August 2019