



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Современные подходы к микробиологическому анализу качества лекарственных средств

Гунар О.В.,
начальник лаборатории микробиологии,
доктор фармацевтических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«**Научный центр экспертизы средств медицинского применения**»

Министерства здравоохранения Российской Федерации



Нормативные определения

- **Качество** лекарственного средства – соответствие лекарственного средства требованиям фармакопейной статьи либо в случае ее отсутствия нормативной документации или нормативного документа.
- **Эффективность** лекарственного препарата – характеристика степени положительного влияния лекарственного препарата на течение, продолжительность заболевания или его предотвращение, реабилитацию, на сохранение, предотвращение или прерывание беременности.
- **Безопасность** лекарственного средства – характеристика лекарственного средства, основанная на сравнительном анализе его эффективности и риска причинения вреда здоровью.

№ 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств" от 12 апреля 2010 г.



контроль
качества
лекарственных
средств ...



... с давних
времен ...



... является
государственной
прерогативой в
области охраны
здоровья
граждан страны.



Микробиологический анализ лекарственного средства –

подтверждает качество и безопасность
ЛС, о необходимости доказательства
которой говорит ФЗ №61
«Об обращении лекарственных средств».



Опасность контаминации лекарственных средств

1

Изменение физико-химических свойств ЛС

2

Передача и распространение устойчивых форм микроорганизмов

3

Снижение или отсутствие терапевтического действия препарата

4

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



ОФС.1.2.4.0003.15

Стерильность

ОФС.1.2.4.0002.15

**Микробиологическая
чистота**

**Микробиологические
методы ГФ XIII изд.**

ОФС.1.2.4.0012.15

**Определение
содержания
витаминов**

ОФС.1.2.4.0011.15

**Эффективность
антимикробных
консервантов**



ГФ РФ XIII изд.

**действует с
1.01.2016**



**Региональная
фармакопея
стран ЕАЭС**



ГФ РФ XIV изд.



В Государственную Фармакопею XIV издания планируем включить:

- ОФС «Валидация микробиологических методик»
- ОФС «Валидация биологических методик»



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения



Валидация –

документированное подтверждение обоснованности (правильности) выбора методики испытаний, гарантирующее получение ожидаемых и воспроизводимых результатов, соответствующих поставленной цели.



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Верификация-

доказательство применимости методики для анализа качества **конкретного** образца ЛС, с учетом ложноположительных и ложноотрицательных результатов.





Проверка пригодности (валидация) методики испытания проводится

- при анализе нового препарата;
- при изменении состава или технологии его производства;
- при внесении любых изменений в экспериментальные условия испытания.





научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Определение валидационных характеристик:

Валидационные данные должны служить доказательством целостности и полноты проводимых испытаний. Валидация метода, выполненная надлежащим образом, должна гарантировать, что при разработке новой методики выявлены в полной мере и учтены все аспекты, которые могут в той или иной степени повлиять на достоверность результатов испытания.





Рекомендуемые параметры валидации микробиологических методик

Специфичность

Предел
обнаружения

Предел
количественного
определения

Рабочий
диапазон

Устойчивость
(надежность)

Линейность

Правильность

Прецизионность



**Биомедицинские
клеточные продукты
(БМКП) – это комплекс, содержащий
жизнеспособные клетки человека (клеточные
линии) и вспомогательные вещества.**



Федеральный закон №180 –ФЗ "О биомедицинских клеточных продуктах» от 23 июня 2016 г.

Вступил в действие с 1.01.2017 г., разработан с учетом международного опыта и направлен на регулирование отношений, возникающих в связи с:

- разработкой,
- доклиническими исследованиями,
- экспертизой,
- государственной регистрацией,
- клиническими исследованиями,
- производством.... БМКП,
- а также с донорством биологического материала в целях производства биомедицинских клеточных продуктов.



Впервые на законодательном уровне определены понятия:

- биомедицинский клеточный продукт,
- клеточная линия,
- дифференцировка клеток,
- донор биологического материала,
- безопасность биомедицинского клеточного продукта,
- эффективность биомедицинского клеточного продукта.

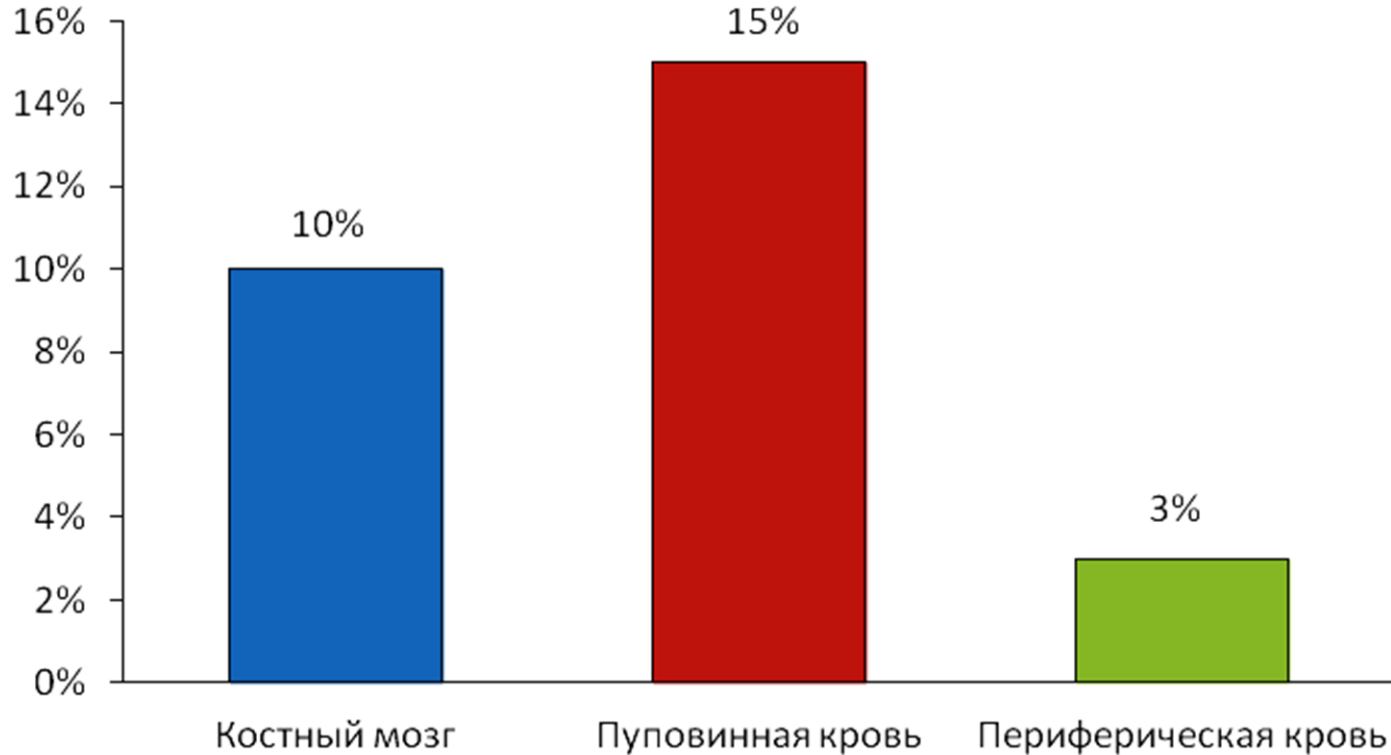


Примеры БМКП

Препарат	Производитель	Статус
1.Ontaril®	Cellerix SA, Испания	Одобен ЕМА в Европе в 2011 г.
2.Prochymal®	Osiris Therapeutics, Inc., США	Одобен в 2012 г в Канаде, Новой Зеландии для лечения реакции «трансплантат против хозяина» у детей. III стадия клинических испытаний для лечения болезни Крона.
3.Provenge® (Sipuleucel-T)	Dendreon Corporation, США	Одобрено СВЕР в 2010 г.
4.Hemacord®	New York Blood Center, США	Одобрено FDA в 2011 г.
5.Pancrostem®	Институт клеточной терапии, Украина	Одобрено Министерством здравоохранения Украины в 2012 г.
6.Angiostem®		
7.Гемацелл	Институт стволовых клеток человека, Россия	Прошел доклинические испытания
8.Криоцелл		II фаза клинических испытаний



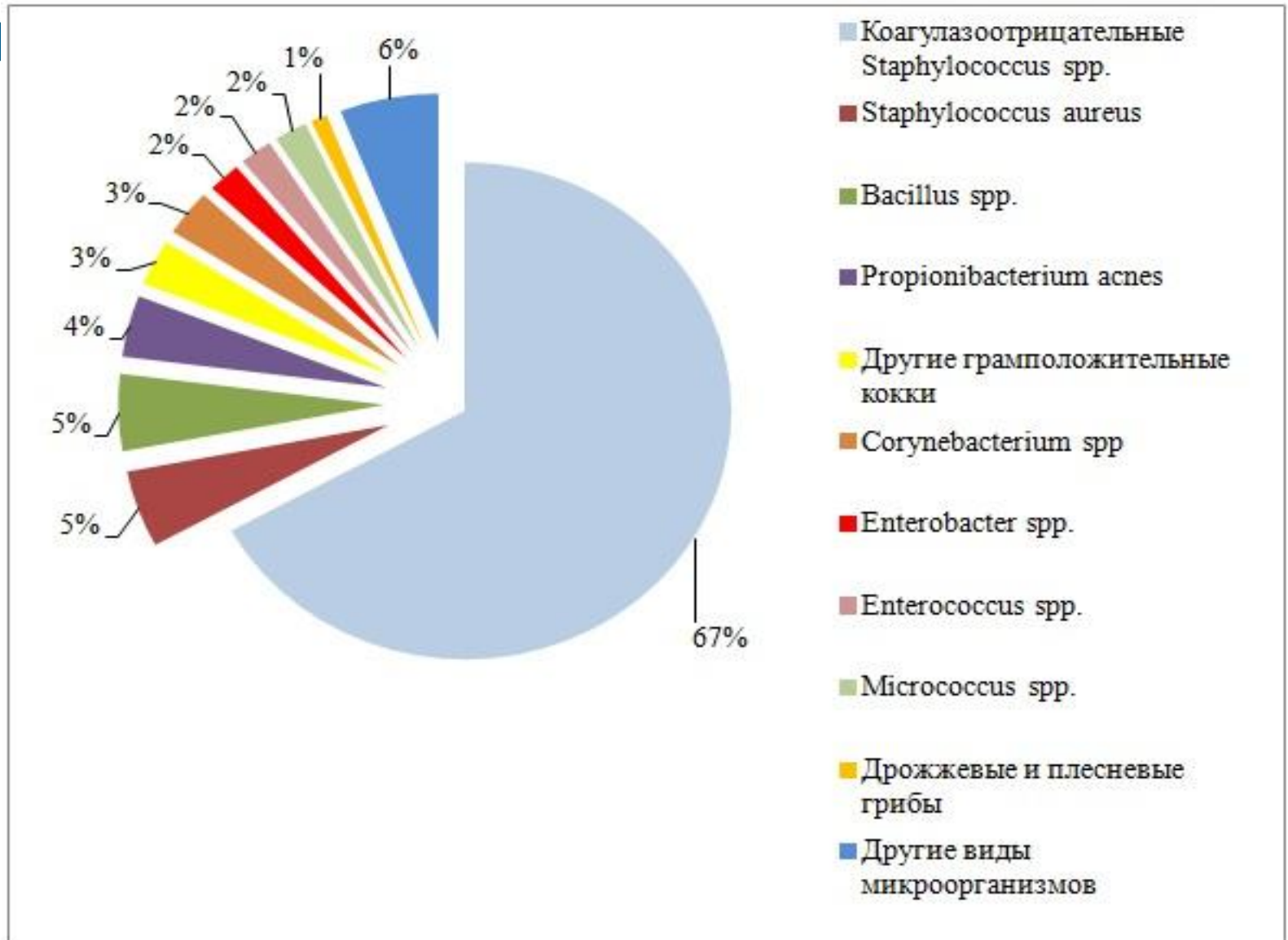
Вероятность контаминации клеточного продукта в зависимости от источника получения культуры клеток



Микробная контаминация клеточных препаратов составляет **1,2 – 4,8%** и зависит от типа и источника их получения



Видовой состав микроорганизмов, загрязняющих клеточные препараты

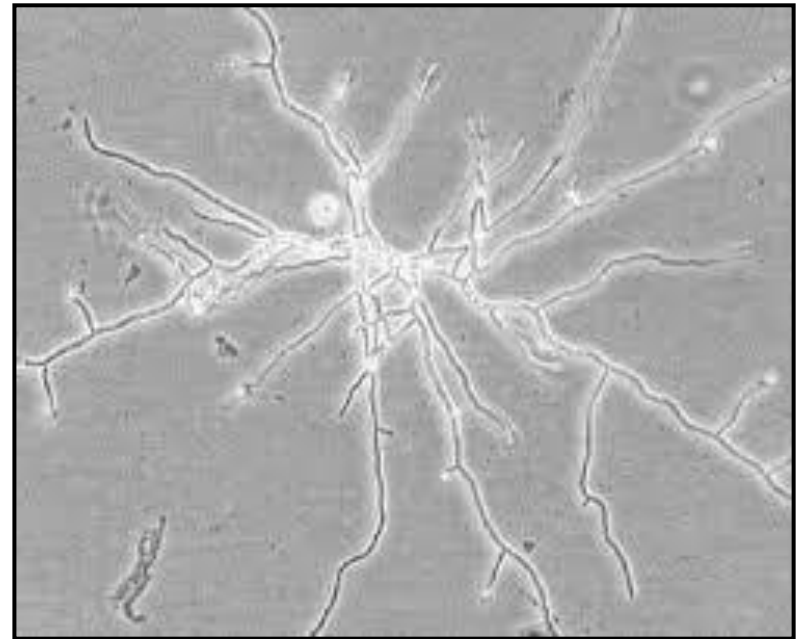




Микроскопическое исследование клеточной культуры



Контаминация культур
клеток печени дрожжевыми
клетками



Колония мицелиальных
грибов, растущая в культуре
клеток



Нормативная документация:

- ФЗ №180-ФЗ "О биомедицинских клеточных продуктах" от 23.06.2016
- Европейская фармакопея 9 изд. ст. 2.6.27
- Американская фармакопея ст. 1046
- Guidance for Industry Current Good Tissue Practice and Additional Requirements for Manufacturers of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products
- 21 CFR Part 610 - General biological products standards





Определение стерильности БМКП



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

При оценке стерильности используют:

культуральные методы, описанные в утвержденной нормативной документации,

альтернативные подходы на основе автоматических

систем при условии их валидации



Методы определения стерильности БМКП

**Метод прямого
посева**

**Альтернативные
методы**

Параметр сравнения	Стандартная методика испытания (ЕФ 9 изд., 2.6.1)	Методика анализа клеточных продуктов (ЕФ 9 изд., 2.6.27)
Объем образца $V \geq 10$	1/2 содержимого контейнера, но не менее 1 мл (для упаковок объемом более 40 мл – не менее 20 мл)	1% от общего объема
$1 \leq V < 10$		100 мкл
$V < 1$	Все содержимое контейнера	Неприменимо
Методика посева	– Мембранная фильтрация – Прямой посев	Прямой посев
Питательные среды	Жидкая тиогликолевая среда (для выявления аэробных и анаэробных бактерий), соево-казеиновый бульон (для выделения грибов)	Минимум две подходящие питательные среды (например, с добавлением крови) для выделения грибов, аэробных и анаэробных бактерий
Условия инкубации	Аэробные	Аэробные и анаэробные
Температура инкубации	Тиогликолевая среда – 30-35°C; соево-казеиновый бульон – 20-25°C	35-37°C
Время инкубации	14 суток	14 суток – при визуальном определении, 7 суток при автоматической детекции роста
Идентификация контаминантов	Не требуется	Необходима
Валидация метода	Не требуется. Проводят оценку применимости методики для испытания конкретного образца	■ Необходима с определением специфичности, чувствительности и воспроизводимости ■



Альтернативные методы определения микроорганизмов

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



Сравнение автоматизированных систем и стандартного способа

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



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







научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Выбранные тест-штаммы микроорганизмов:

1. *Alcaligenes faecalis* 415;
2. *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 ;
3. *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642;
4. *Bacillus cereus* ATCC 10702;
5. *Bacillus subtilis* ATCC 6633;
6. *Burkholderia cepacia* ATCC 25416;
7. *Candida albicans* ATCC 10231;
8. *Clostridium sporogenes* ATCC 19404;
9. *Escherichia coli* ATCC 8739
10. *Escherichia coli* ATCC 25922;
11. *Micrococcus luteus* (*Kocuria rhizophila* ATCC 9341);
12. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027;
13. *Propionibacterium acnes* DSM 1897
14. *Salmonella abony* IHE 103/39
15. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538;
16. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990





Предел обнаружения тест-штаммов бактерий на тиогликолевой среде

Микроорганизм	Предел обнаружения	Доверительный интервал
<i>B. subtilis</i> АТСС 6633	1,45	1,44 – 1,45
<i>S. aureus</i> АТСС 6538	1,52	1,50 – 1,54
<i>P. aeruginosa</i> АТСС 9027	1,24	1,23 – 1,26
<i>C. sporogenes</i> АТСС 19404	< 1,00	-



Предел обнаружения

ДРОЖЖЕВЫХ И ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

Питательная среда	Температура инкубации посевов	Тест-штамм микроорганизма	
		C.albicans АТСС 10231	A.brasiliensis АТСС 16404
		Предел обнаружения	
Тиогликолевая среда	(32,5 ± 2,5) °C	2,20	3,31
	(22,5 ± 2,5) °C	1,79	5,31
Соево-казеиновый бульон	(32,5 ± 2,5) °C	1,46	4,49
	(22,5 ± 2,5) °C	1,50	5,10
Жидкая среда Сабуро	(32,5 ± 2,5) °C	1,56	1,40
	(22,5 ± 2,5) °C	1,49	1,35
Модифицированная среда Мартина	(32,5 ± 2,5) °C	1,55	1,44
	(22,5 ± 2,5) °C	1,61	1,19



Микроорганизм

Правильность

1 КОЕ

5 КОЕ

ВасТ/
ALERT

Прямой посев

ВасТ/
ALERT

Прямой посев

Bacillus subtilis

100%

20%

100%

40%

Staphylococcus aureus

70%

66%

100%

84%

Pseudomonas aeruginosa

84%

50%

100%

96%

Streptococcus pyogenes

86%

6%

95%

5%

Clostridium sporogenes

100%

100%

100%

100%

Propionibacterium acnes

70%

0%

96%

32%

Candida albicans

90%

55%

100%

93%

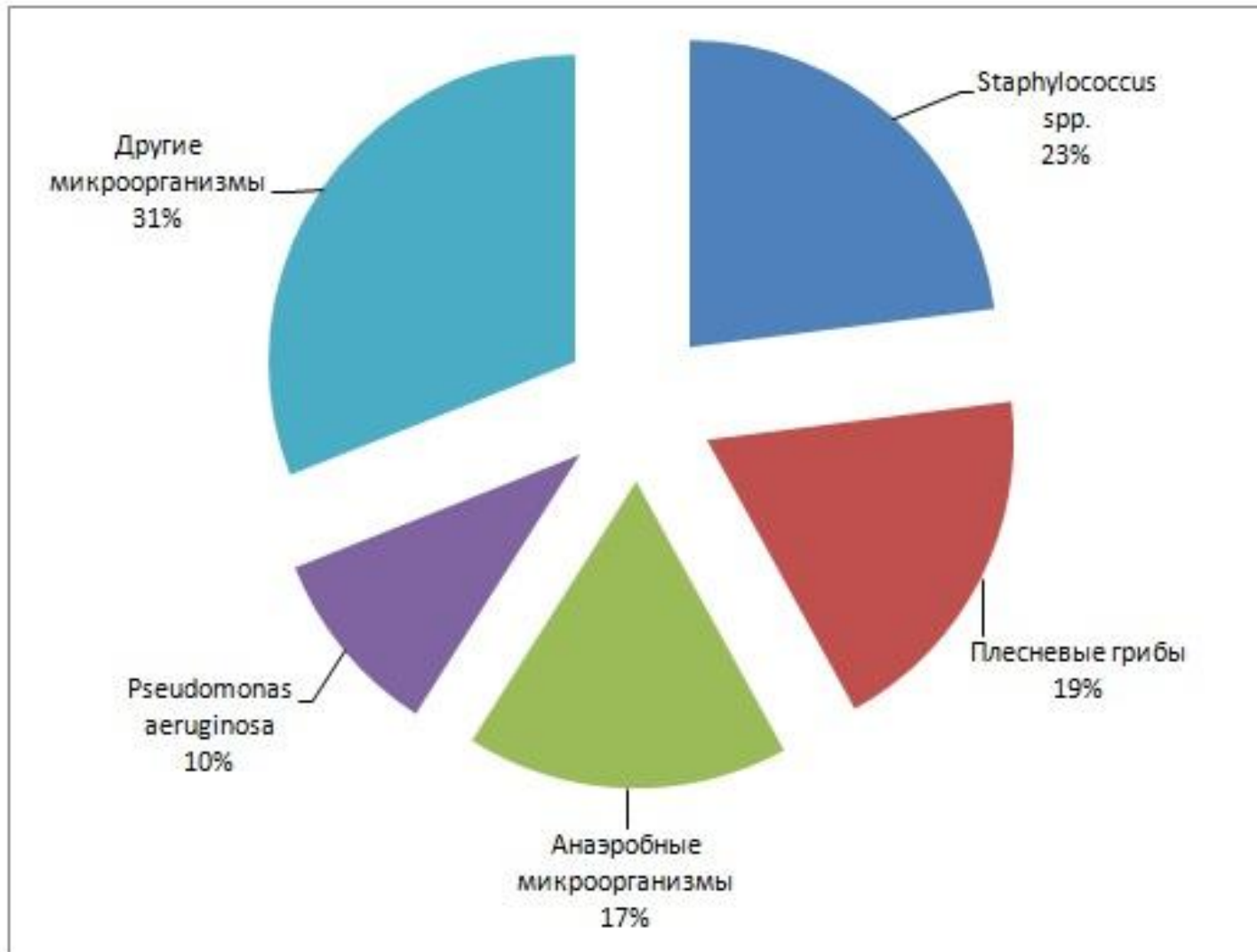


В рамках НИР «Разработка технологической платформы и МР по проведению доклинических исследований БМКП» изучено 12 образцов, произведенных из донорской жировой ткани.

№ образца	КОЕ/мл	№ образца	КОЕ/мл
1	5	7	4
2	$1,3 \times 10^3$	8	1
3	2	9	$1,6 \times 10^3$
4	6	10	4
5	10^3	11	2
6	4×10^3	12	1



Выделенные микроорганизмы в анализируемых БМКП:





Оценка ложноотрицательных результатов, полученных при анализе стерильности образцов БМКП

Количество образца, мл	ВаcT/ALERT	Прямой посев
0,1	8%	42%
0,5	4%	17%
1,0	4%	4%



Таким образом,

- Изученный альтернативный метод определения стерильности является более чувствительным.
- Выявление минимально (1-5 КОЕ/мл) контаминированных ЛС на примере БМКП требует существенно меньше времени (25ч) по сравнению с методом прямого посева (62ч).
- Количество ложноотрицательных результатов, получаемых альтернативным методом значительно ниже и удовлетворяет общепринятому критерию приемлемости, не превышая 30%.

**Благодарю
за
внимание!**

