

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

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

Одним из основных критериев биологической безопасности иммунобиологических препаратов является их стерильность. В статье представлена история разработки в нашей стране методов испытания иммунобиологических препаратов по показателю «Стерильность», начиная с 1961 г. и заканчивая современными требованиями, регламентируемыми Государственной фармакопеей Российской Федерации XIII издания. Детально проанализированы ключевые подходы по совершенствованию оценки качества по данному показателю, в том числе в отношении выбора оптимальных питательных сред и методик проверки их качества, чувствительных тест-штаммов и условий инкубирования, определения количества отбираемых образцов препарата, необходимого для достоверного подтверждения стерильности всей серии (объем выборки), а также по разработке схемы проведения испытания, учитывающей особенности производства и применения иммунобиологических препаратов. Приведена информация о многолетнем опыте использования разработанной в нашей стране схемы испытания стерильности Национальным органом контроля медицинских иммунобиологических препаратов ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Представлен анализ современного состояния проблемы гармонизации требований к проведению испытания стерильности иммунобиологических и других лекарственных препаратов, в том числе с ведущими зарубежными фармакопеями, а также перспективы их использования странами — членами Евразийского экономического союза.

Ключевые слова: национальный орган контроля; фармакопея; стерильность; медицинские иммунобиологические препараты; микробиологическая безопасность; мембранная фильтрация; прямой посев; контаминация; мертиолят; оценка качества

Для цитирования: 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. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-5-15

* **Контактное лицо:** Суханова Светлана Михайловна; SuhanovaSM@expmed.ru

Sterility Testing of Immunobiological Medicinal Products in Russia. Historical Background and Current Requirements

* S. M. Sukhanova, Z. E. Berdnikova, N. E. Zakharov, V. A. Merkulov

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
8/2 Petrovsky boulevard, Moscow 127051, Russian Federation

Sterility is one of the key parameters of biological safety of immunobiological medicinal products. The article traces the history of the development of sterility test methods for immunobiological medicinal products from as far back as 1961 and up to the current requirements laid down in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th edition. The article provides a detailed analysis of major approaches to the improvement of medicines quality evaluation based on this parameter, namely to the choice of: optimal growth media and methods of their evaluation, sensitive test strains, incubation conditions, the number of test samples (i.e., sample size) required for reliable demonstration of batch sterility; as well as approaches to the development of a test design that would accommodate specific aspects of production and use of immunobiological products. The article dwells upon the longstanding use of the sterility testing scheme developed in the national agency for control of immunobiological products — L.A. Tarasevich State Institute for Standardization and Control of Medicinal Immunobiological Products. The article analyses the current status of harmonisation of requirements for sterility testing of immunobiological products and other groups of medicines with those of the leading world pharmacopoeias, and prospects of using these requirements in the Eurasian Economic Union.

Key words: national control authority; pharmacopoeia; sterility; medicinal immunobiological products; microbiological safety; membrane filtration; direct inoculation; contamination; merthiolate; quality evaluation

For citation: Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Zakharova NE, Merkulov VA. Sterility Testing of Immunobiological Medicinal Products in Russia. Historical Background and Current Requirements. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2018; 18(1): 5–15. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-5-15

* **Contact person:** Sukhanova Svetlana Mikhailovna; SuhanovaSM@expmed.ru

В соответствии с Федеральным законом № 429-ФЗ от 22 декабря 2014 г. иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) — это лекарственные препараты, предназначенные для формирования активного или пассивного иммунитета, а также диагностики наличия иммунитета или специфического приобретенного иммунологического ответа на аллергизирующие вещества. К ИЛП относятся вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки и аллергены [1].

Оборот, качество и безопасность этих препаратов находятся под особым контролем государства практически во всех странах мира и осуществляются отдельно от других фармацевтических препаратов. Государство гарантирует обеспечение современного уровня производства вакцин и предусматривает социальную защиту граждан при возникновении поствакцинальных осложнений. Правовые основы государственной политики в области иммунопрофилактики в России установлены Федеральным законом от 17.09.1998 № 157-ФЗ «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней». Все применяемые в Российской Федерации вакцины проходят обязательный контроль качества в установленном порядке [2].

Такой подход обусловлен как особенностями производства ИЛП — использование в качестве сырья биологического материала, асептическое производство, отсутствие финишной стерилизации, — так и вследствие многообразия механизмов действия, необходимостью проведения широкомасштабных, многолетних предрегистрационных исследований с целью дальнейшего их применения не только на больных, но и на здоровых людях, включая детей первых дней жизни [3].

Основными требованиями, предъявляемыми к применяемым практически в любой области медицины биопрепаратам, к которым отнесены ИЛП, является их безопасность и эффективность. Учитывая, что значительная часть ИЛП предназначена для парентерального применения, определяющим критерием их микробиологической безопасности является в первую очередь стерильность. Получение стерильного не контаминированного посторонней микрофлорой медицинского препарата является первостепенной задачей производства, позволяющей исключить дополнительный риск при применении препаратов, вводимых людям. Подтверждением микробиологической безопасности лекарственных препаратов, наряду с соответствием условий их производства требованиям надлежащих практик GMP и GLP, является использование при оценке их качества точных, высокочувствительных и адекватных методов, обеспечивающих достоверные результаты исследований [4].

Цель работы — ретроспективный анализ подходов и изучение современных направлений совершенствования оценки качества ИЛП по показателю «Стерильность».

В задачи исследования входило:

- изучение вопроса становления нормативных требований к проведению испытания ИЛП по показателю «Стерильность»;
- проведение анализа современного состояния проблемы гармонизации требований к проведению испытания иммунобиологических и других лекарственных препаратов, в том числе с требованиями ведущих зарубежных фармакопей, а также перспективы их использования странами членами Евразийского экономического союза.

Основные стандарты, применяемые в фармакопейном анализе при производстве и контроле лекарственных средств (ЛС) ведущими мировыми производителями, регламентируются зарубежными фармакопеями, а в России — Государственной фармакопеей (ГФ) Российской Федерации, которая находится под государственным надзором и имеет юридическую силу [5].

Испытание на стерильность в Великобритании и США впервые было предложено для вакцин, токсинов, сывороток, адре-

налина и инсулина и внесено в фармакопеи в 1932 и 1936 гг. соответственно [6]. В СССР испытание на стерильность путем посева на искусственные питательные среды в аэробных и анаэробных условиях впервые было внесено при самом активном участии профессора Л.А. Тарасевича — председателя Ученого медицинского совета в 1934 г. в ГФ VII издания для противодифтерийной и противостолбнячной лечебных сывороток [7].

Основываясь на международном опыте, правилах и нормах, применяемых в различных странах к биологическим препаратам (БП), в 1959 г. Исследовательской группой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в состав которой входил и представитель СССР — доктор Г.В. Выгодчиков из Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, были впервые сформулированы общие требования к стерильности БП. Было рекомендовано применять эти требования к любым биологическим продуктам, для которых необходимо исключить микробную контаминацию [8].

Теоретически стерильность определялась как отсутствие всех способных к размножению микроорганизмов. В случае если препарат содержал живые микроорганизмы, например так называемые живые вакцины, под стерильностью подразумевали отсутствие контаминации другими микроорганизмами.

Наиболее важными вопросами при разработке методов контроля стерильности лекарственных средств были и остаются: подбор оптимальных питательных сред (ПС) и методик оценки их чувствительности, определение количества образцов исследуемого препарата, необходимого для достоверного подтверждения стерильности всей серии (объем выборки), а также создание самой схемы проведения испытания.

Требования к проведению испытания стерильности вакцин, антитоксических сывороток, анатоксинов и гормональных препаратов в нашей стране впервые были внесены в IX выпуск ГФ СССР в 1961 г. В документе приводился перечень ПС и условий инкубации для выявления в этих препаратах бактерий, а также грибов (8 сут при 37 и при 22 °С соответственно). ПС должны были иметь паспорт и быть проверенными на интенсивность роста в них тест-микробов, наименования которых не приводились. В частности, для обнаружения бактерий было рекомендовано использовать несколько ПС, основой которых являлся бульон Хоттингера или Мартена: скошенный агар, бульон с 0,5 % глюкозой и бульон с 0,1 % агаром и кусочками мяса, а для выявления грибов — агар и бульон Сабуро. Образцы препаратов, содержащих в качестве консерванта препараты ртути, дополнительно требовалось высевать по 0,5 мл в 20 мл тиогликолевой среды (ТС) следующего состава: цистин (0,75 г), натрия хлорид (2,5 г), глюкоза (5 г), дрожжевой экстракт (5 г), панкреатический гидролизат казеина (15 г), тиогликолевая кислота (0,3 мл), вода дистиллированная до 1000 мл, pH 7,2–7,4 после стерилизации при 110–112 °С в течение 30 мин. Срок хранения — не более 7 сут. Количество образцов для испытания — не менее трех от каждой бутылки, отобранных в начале, середине и в конце розлива. В случае выявления контаминантов в расфасованной продукции испытания разрешено было повторить на удвоенном количестве образцов. При частичном проросте сред другими видами микробов допускалось исследование препарата в третий раз [9].

По мере накопления данных по оценке стерильности ЛС в 1968 г. в X выпуск ГФ были внесены изменения, в которых отражены особенности проведения испытания для различных групп препаратов — для вакцин и анатоксинов, для кровезаменителей и антибиотиков, а также для эндокринных препаратов. Впервые были определены условия проведения испытания (в специальных боксах, оборудованных подачей стерильного воздуха и оснащенных бактерицидными лампами), увеличено

количество отбираемых на испытание образцов (не менее 4), уменьшено соотношение объема образца и питательной среды (1:20 вместо 1:40). Требования к качеству ПС не изменились [10]. Порядок контроля стерильности каждой группы препаратов был регламентирован специальными инструкциями, утвержденными Министерством здравоохранения СССР, поэтому наименования тест-штаммов для оценки ростовых свойств в фармакопее не приводились. В соответствии с требованиями действовавшей в то время Инструкции по контролю стерильности вакцин, анатоксинов, бактериофагов, лечебных сывороток и аллергенов оценку чувствительности ПС необходимо было проводить с помощью тест-штаммов *Corynebacterium diphtheroides* 1921, *Streptococcus hemolyticus* Dick I и *Clostridium oedematiens* тип С № 198 [11].

В состав ТС, рекомендованной для оценки стерильности вакцин, анатоксинов, антитоксических сывороток и антибиотиков, были добавлены агар-агар дальневосточный (0,75 г) и свежеприготовленный раствор резазурина натрия (1:1000, 1,0 мл). Тиогликолевая кислота могла быть заменена тиогликолятом натрия (0,5 г), изменен диапазон pH (7,0–7,2) и режим стерилизации (120 °С в течение 20 мин) [10].

Схема испытания вакцин, анатоксинов и антитоксических сывороток по сравнению с требованиями ГФ СССР IX выпуска также была изменена и включала два этапа:

1-й этап. Посев образцов в жидкую ТС в соотношении 1:20 мл и инкубация посевов в течение 5 сут при 37 °С.

2-й этап. Пересев с первой пробирки (по 0,5; 1,0 мл) и инкубация 5 сут:

а) при 37 °С в жидкой ТС и средах на основе триптического гидролизата казеина с 0,5 % глюкозой — питательном бульоне

(СПБ) и питательном агаре (СПА) и б) при 22 °С в тиогликолевой и среде Сабуро.

Вторую пробирку первичного посева на ТС выдерживали еще 5 сут при 37 °С. Учет результатов проводили через 10 сут после первичного посева вместо 8 сут (рис. 1).

Для испытания препаратов кровезаменителей и антибиотиков были описаны иные требования [8].

В 1958 г. ВОЗ, практически с самого начала своей деятельности, была определена необходимость разработки международных стандартов для БП. В 1975 г. ввиду улучшения методов испытания стерильности биологических продуктов и усовершенствования мероприятий по контролю Комитетом экспертов ВОЗ по стандартизации БП общие требования к стерильности, опубликованные в 1959 г., были пересмотрены [8]. Обновленные требования относились ко всем иммунологическим БП, т.е. вакцины и сыворотки, используемые для введения человеку, должны быть стерильны. При их подготовке был обобщен международный опыт по данной проблеме, принимались во внимание мнения консультантов, правила и требования, разработанные в ряде стран, а также сведения из опубликованных докладов и рабочих документов ВОЗ. Большая часть этих требований не изменилась до настоящего времени. В документе указывалось, что степень стерильности БП зависит, во-первых, от адекватности контрольных испытаний стерильности препаратов, находящихся в запаянных ампулах или флаконах, достаточное число которых отбирается методом случайной выборки, и, во-вторых, от принятия соответствующих мер предосторожности, касающихся исходных материалов, из которых приготавливается продукт, и технологического процесса. Тесты на стерильность, проводящиеся с приемлемым числом отобранных проб, способны выявить контаминацию только серий с высоким процентом контаминированных образцов. В связи с этим положительный результат испытания не может быть основополагающим критерием стерильности продукта, а должен быть обеспечен процессом производства, включая испытание стерильности на различных стадиях. Отмечалось, что, несмотря на недостатки проведения испытаний стерильности, усилия должны быть направлены на применение наиболее эффективных производственных процессов и на улучшение и утверждение методов испытания стерильности в соответствии с самыми последними достижениями и опытом.

Испытание стерильности в зависимости от требований к отдельным препаратам было разделено на три возможных вида испытаний: 1) присутствие бактерий и грибов; 2) присутствие вирусов и риккетсий и 3) присутствие микоплазм [8]. На сегодняшний день именно первый вид испытаний, позволяющий выявлять рост бактерий и/или грибов в образцах, принимается за испытание на стерильность.

Комитетом экспертов ВОЗ при проведении испытаний стерильности БП было рекомендовано руководствоваться следующими основными положениями.

1. Отбор проб. Пробы готовой формы препарата должны быть отобраны таким образом, чтобы представлять всю серию целиком, включая пробы в начале и в конце розлива. Число проб должно быть не меньше утвержденного национальным контрольным органом при условии, что из готовой серии, содержащей 500 ампул или более, следует взять не менее 20. Для серий, состоящих менее чем из 500 ампул, брать не менее 10 ампул, для серий менее 100 ампул — 10 %. Число проб рассчитывается по формуле:

$$n = 0,4\sqrt{N}, \quad (1)$$

где N — число готовых ампул серии.

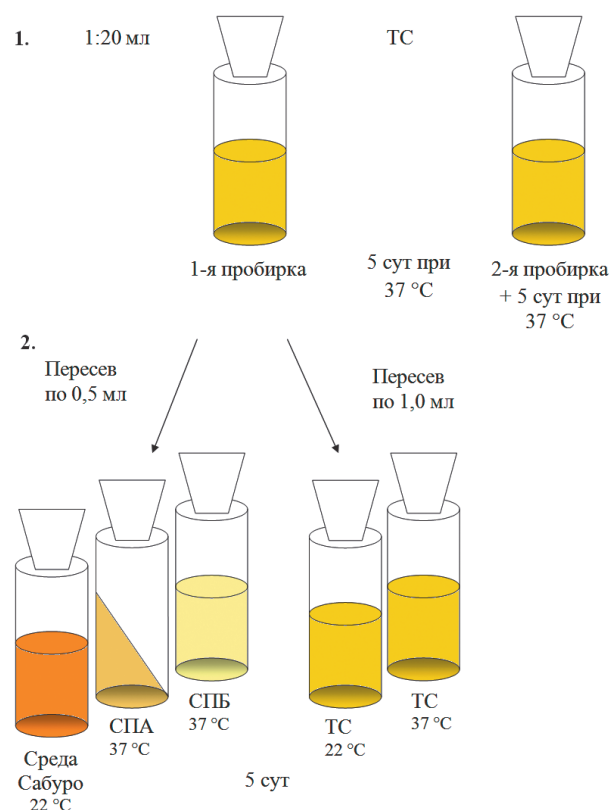


Рис. 1. Схема испытания вакцин, анатоксинов и антитоксических сывороток: ТС — тиогликолевая среда, СПБ — сухой питательный бульон с 0,5 % глюкозой, СПА — сухой питательный агар.

2. Культуральные среды. Культуральные среды для испытаний должны быть утверждены Национальным контрольным органом. Необходимо показать, что в этих средах способны расти и размножаться аэробы, анаэробы, включая такие их виды, которые обнаруживаются в среде производственных помещений. Для испытания стерильности рекомендованы жидкая среда с тиогликолятом натрия (или тиогликолевой кислотой) и среда из продуктов переваривания соевых бобов и казеина. При использовании для этих целей других сред следует показать, что они по меньшей мере эквивалентны приведенным выше в отношении роста и размножения в них микробов. Критерием чувствительности среды является способность ее поддерживать в аэробно-анаэробных условиях рост микроорганизмов при посеве не более 100 жизнеспособных клеток. Ростовые свойства необходимо оценивать для каждой серии сухой среды или партии, приготовленной из отдельных ингредиентов. Режим стерилизации сред — температура 121 °С, 18–20 мин.

3. Необходимость установления у испытуемого материала наличия свойств уничтожать или ингибировать рост и размножение микроорганизмов. При наличии антимикробного эффекта испытание необходимо проводить, используя соответствующий метод нейтрализации.

4. Количество вносимого материала зависит от объема первичной упаковки: менее 1 мл — все содержимое; не более 20 мл — не менее 1 мл; более 20 мл, но не более 100 мл — не менее 5 мл для каждого значения температуры инкубации. Образцы для испытаний должны быть репрезентативными.

5. Соотношение объемов среды и вносимого материала не должно ухудшать ростовые свойства среды.

6. Инкубация. Температура инкубации должна быть одобрена национальным контрольным органом и включать температурные режимы 20–25 и 30–36 °С. Длительность инкубации не менее 14 сут. Препараты, вызывающие помутнение среды, не позволяющее определить наличие и отсутствие роста посторонних микроорганизмов, на 3–7-е сут пересевают и также наблюдают не менее 14 сут.

7. Новый метод испытаний — метод мембранной фильтрации при определенных условиях (например, наличие антимикробного действия препарата) предпочтителен. Даны рекомендации по применению метода (прибор, параметры фильтров: размер пор — 0,22 или 0,45 мкм и диаметр — 47 мм, позитивные и негативные контроли, жидкости для растворения и промывки, длительность инкубации).

8. Интерпретация результатов. Если ни в одном из сосудов с инокулируемыми культуральными средами нет роста, то образец считается прошедшим испытание. При обнаружении роста микроорганизмов испытуемый препарат считается не удовлетворяющим требованиям стерильности, если национальный орган не убедится с помощью повторных испытаний или других средств в том, что результаты первого были недействительными [8].

В СССР в 1970-е годы также проводились исследования по совершенствованию методов контроля и подходов к испытанию БП, которые учитывали бы предыдущий положительный отечественный опыт по испытаниям стерильности вакцин и сывороток, а также рекомендации ВОЗ для национальных регуляторных органов и производителей вакцин. Применявшийся в соответствии с ГФ X метод контроля стерильности БП предусматривал использование, наряду с ТС, дополнительного набора сред, предназначенных для выявления отдельных групп микроорганизмов (аэробы, анаэробы, грибы). Использование набора ПС обеспечивало достаточную надежность результатов, однако этот метод в связи с необходимостью проведения боль-

шого числа пересевов был весьма трудоемок, требовал больших затрат ПС, рабочего времени персонала и не исключал возможности технических погрешностей.

Разработанная в те годы в нашей стране технология получения сухих компонентов ПС, а именно белковой основы — ферментативного гидролизата казеина неглубокой степени расщепления и экстракта кормовых дрожжей — витаминсодержащего компонента, позволила получить сухой препарат ТС [12]. Изготовленная из сухого препарата ТС имела большую чувствительность и была более стандартна по сравнению со средой, полученной из отдельных жидких компонентов, что позволило стандартизовать метод оценки качества медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). Результаты многочисленных испытаний стерильности МИБП, включая препараты национального календаря прививок, проведенных на ведущих производствах, показали, что ТС такого качества обеспечивала выявление различных по своим свойствам микроорганизмов-контаминантов, и свидетельствовали о принципиальной возможности использования ее в качестве универсальной [13].

Принимая во внимание, что ГФ X, опубликованная в 1968 г., утратила свою актуальность, так как не в полной мере отвечала последним достижениям в данной области, а введение в действие нового выпуска ГФ в ближайшее время не планировалось, в 1979 г. в целях совершенствования контроля стерильности бактериальных и вирусных препаратов была разработана и утверждена «Инструкция по контролю стерильности вакцин, анатоксинов, бактериофагов, сывороточных препаратов и аллергенов». Данный документ стал в эти годы основным нормативным документом, регламентирующим требования к проведению контроля стерильности БП [14].

В основу Инструкции [14] были положены результаты многолетних исследований в Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских иммунологических препаратов (ГИСК им. Л.А. Тарасевича) по совершенствованию и стандартизации метода контроля стерильности медицинских БП, снижающего риск выпуска и, соответственно, применения контаминированных вакцин и сывороток. Были подробно описаны требования к ПС и методам оценки ее качества, в частности к нейтрализующим свойствам в отношении наиболее часто используемого при производстве вакцин консерванта — мертиолята. Пересмотрены правила отбора образцов препаратов, схемы контроля, в том числе и препаратов, вызывающих помутнение среды, а также порядок учета результатов. Для выявления различных микроорганизмов-контаминантов было предусмотрено использование не набора сред, а одной универсальной ТС. Для установления срока нейтрализации ртутного консерванта вакцин тиогликолевой кислотой (или тиогликолятом натрия), входящей в состав ТС, был введен показатель ее нейтрализующих свойств, который оценивали с помощью штамма *Streptococcus hemolyticus* Dick I. Данные модификации позволили обосновать срок годности готовой ТС в течение 4–5 сут для препаратов, содержащих мертиолят, а для препаратов, не содержащих мертиолят, увеличить до 14 сут, и исключить необходимость внесения в среду дополнительного компонента — окислительно-восстановительного индикатора аэробных условий — резазурина натрия, предусмотренного рядом зарубежных фармакопей и в настоящее время [15–18].

Официальные международные требования по использованию конкретных наименований тест-штаммов для оценки ростовых свойств сред при контроле стерильности БП в эти годы отсутствовали. В нашей стране на основе изучения ростовых свойств ТС в отношении различных микроорганизмов отечественных и зарубежных коллекций для определе-

ния ее чувствительности в соответствии с Инструкцией [14] было разрешено использовать тест-штаммы *Streptococcus hemolyticus* Dick I (аэроб, разведение не ниже 10^{-7}) и *Clostridium oedematiens* (novyi) тип С № 198 (строгий анаэроб, разведение не ниже 10^{-5}), замена которых не допускалась. Выбор штаммов с учетом рекомендаций ВОЗ был основан как на анализе опыта практической работы и характеристике наиболее часто выявляемых при производстве БП контаминирующих агентов, так и на результатах отечественных исследований по подбору наиболее требовательных к условиям культивирования штаммов, позволяющих четко дифференцировать партии среды по их чувствительности. Так, например, рост штамма *Clostridium oedematiens* (novyi) тип С № 198 из разведения 10^{-7} – 10^{-6} на отдельных партиях ТС, изготовленной из сухих компонентов, мог наблюдаться уже через 18–20 ч. Использование в контроле среды штамма с высокой скоростью роста позволило устанавливать отличия в качестве различных серий коммерческой ТС, а также сократить примерно в два раза сроки получения результатов и выдачи заключения о пригодности среды.

Тиогликолевая среда, соответствующая таким требованиям, обеспечивала выявление различных микроорганизмов-контаминантов МИБП (аэробных, анаэробных бактерий и грибов), а также нейтрализацию бактериостатического действия мертиолята ($0,5 \cdot 10^{-5}$ г/мл). Учитывая особенности производства МИБП (биологическое сырье, асептическое производство, контроль стерильности на всех этапах производства, большие объемы серий и др.), проведение испытания стерильности с помощью одной универсальной среды позволяло осуществлять высокоэффективный, технологичный «мониторинг» качества препаратов по данному показателю и выявлять возможную контаминацию препаратов еще до окончания производственного цикла.

Применяемые ранее в нашей стране правила, предусматривавшие отбор постоянного числа образцов (по 4) для испытания независимо от количества емкостей в серии, были изменены. Расчет образцов, необходимых для достоверного заключения о стерильности серии, стали проводить в том числе с учетом объема готового препарата в каждой емкости по формуле (1). Для удобства расчета в зависимости от объема серии, а также для образцов, расфасованных менее чем по 2 мл, была предложена соответствующая таблица, что позволило более дифференцированно подходить к их отбору. Изменение норм отбора дало возможность унифицировать метод контроля стерильности и привести его также в соответствие с рекомендациями ВОЗ [7, 13]. Соотношение количества вносимого образца и ПС осталось прежним (1:20) и позволяло разведением «снимать» антимикробное действие консервантов МИБП, в том числе фенола и хлороформа, которое не могло быть устранено тиогликолевой кислотой, входящей в состав ТС.

Условия инкубации посевов, порядок учета и интерпретации результатов также были дополнены и уточнены, в том числе и в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Для выявления бактерий была установлена температура инкубации посевов от 35 до 37 °С, для выявления грибов — от 20 до 22 °С. Продолжительность инкубации составила 14 сут вместо ранее рекомендованной — 10 сут. Второй этап испытания, применявшийся в соответствии с ГФ Х для всех препаратов, а именно пересев на свежую ПС и инкубирование 14 сут от начала испытания, был предусмотрен только для препаратов, вызывающих помутнение среды, для которых сложно идентифицировать наличие микробного роста. При учете результатов наличие роста хотя бы в одной из пробирок необходимо было подтвердить микроскопированием с окрашиванием по Граму и повторить испытание

на том же количестве образцов, что и в первый раз. В случае роста микроорганизмов при повторном посеве, морфологически сходных с микроорганизмами, выявленными при первичном посеве, испытуемый препарат считали нестерильным. При выявлении роста микроорганизмов, отличающихся по морфологии от первоначально выделенных, а также если и в том, и в другом случае отмечался рост лишь в отдельных пробирках, в порядке исключения, учитывая большие партии препаратов, их высокую стоимость, а также вероятностный характер результатов испытания, допускался посев образцов в третий раз.

К началу 1980-х годов исследования, направленные на улучшение качества МИБП, позволили усовершенствовать как саму процедуру испытания стерильности в процессе производства, так и повысить ее эффективность. В 1983 г. приказом Минздрава СССР № 31 был утвержден Сборник инструкций, в который вошли новейшие разработки, касающиеся методов и порядка контроля МИБП, и в первую очередь определения стерильности [19]. Документ содержал подробное описание требований к порядку проведения испытания с детальным изложением всех процедур. Согласно этой инструкции испытание предписывалось проводить с применением ТС, выпускаемой отечественным предприятием (НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова) в виде сухого препарата по утвержденной технической документации [20]. По способности выявлять минимальные количества контаминирующих агентов данная ТС превосходила аналогичные среды, выпускаемые в ЧССР и ГДР [21]. Предусматривалась оценка качества каждой серии сухой ПС, а также каждой партии, приготовленной из сухой, по показателю стерильности, ростовым и нейтрализующим свойствам [19].

Принципиальным отличием новой Инструкции [19] от предыдущей [14] явилась замена аэробного тест-штамма *Streptococcus hemolyticus* Dick I на *Alcaligenes faecalis* 415 при контроле ростовых, и в первую очередь нейтрализующих, свойств ТС. Штамм *Alcaligenes faecalis* 415 — подвижная грамотрицательная палочка, строгий аэроб, непатогенный для человека, был получен из института Листера (Лондон). Именно с помощью этого штамма при одинаковых ростовых свойствах в отношении других, ранее используемых аэробов (*S. aureus*, *S. piogenes* Dick I) удавалось выявлять различия в качестве серий среды по их способности нейтрализовать действие мертиолята. Более короткие сроки нейтрализации позволяли быстрее и более надежно выявлять наличие микробного загрязнения в препаратах. Способ контроля качества ТС с использованием чувствительных к составу среды, к условиям аэробно-анаэробного культивирования, а также к наличию в препаратах ртутного консерванта мертиолята, тест-штаммов *Alcaligenes faecalis* 415 и *Clostridium novyi* 198, позволявший использовать среду с более высокими показателями качества, был запатентован в СССР в 1981 г. и внесен во все нормативные документы, регламентировавшие требования к проведению испытания на стерильность МИБП [22–25].

Принимая во внимание высокую чувствительность тест-штаммов *Alcaligenes faecalis* 415 (разведение не ниже 10^{-7} ; не менее 40 клеток) и *Clostridium novyi* 198 (разведение не ниже 10^{-5} ; не менее 50 клеток) к качеству серий ТС, замена их в испытании на стерильность МИБП не допускалась. Требования к учету и интерпретации результатов не изменились.

Для более оперативного внедрения достижений науки и повышения требований к качеству лекарственных средств, начиная с 1971 г., Управление по внедрению новых ЛС и медицинской техники стало утверждать фармакопейные статьи (ФС), имеющие силу государственных стандартов [26]. В 1988 г. с целью унификации и совершенствования подходов к испытанию сте-

рильности для всех ЛС и МИБП, в отношении которых имелись соответствующие указания в нормативной документации (НД), требования были вновь объединены и включены во временную фармакопейную статью (ВФС) [27]. Единые нормы были установлены для методов, порядка отбора образцов, условий и длительности инкубации, а также для сроков пересева препаратов, вызывающих помутнение среды. В ВФС были учтены также ранее действовавшие в соответствии с Инструкцией [19] основные положения требований к проведению испытаний МИБП.

Так, помимо метода прямого посева для испытания препаратов, обладающих выраженным антимикробным действием, и ЛС, разлитых в емкости более 100 мл, был предложен новый метод мембранной фильтрации, рекомендованный Комитетом экспертов ВОЗ в 1975 г. При расчете количества образцов принимали во внимание режим стерилизации препарата. В случае стерилизации при 121 °С образец должен был состоять из 10 единиц, при других видах стерилизации минимальное количество образцов определяли по формуле (1).

При испытании лекарственных препаратов необходимо было использовать ТС и жидкую среду Сабура, а для контроля стерильности МИБП — одну ТС. Цистин в составе ТС мог быть заменен на цистеин, обладающий лучшей растворимостью и более сильными антиоксидантными свойствами, связывающий избыток кислорода в процессе хранения среды и поддерживающий, таким образом, условия для анаэробного роста. Допускалось также приготовление ТС без индикатора резазурина [26]. Ростовые свойства ТС должны были быть подтверждены в отношении тест-штаммов аэробных бактерий и грибов, предусмотренных НД, при посеве их в количестве менее 100 жизнеспособных клеток. Для контроля МИБП, содержащих ртутные консерванты, ТС должна обеспечивать во всех засеянных пробирках, содержащих мертиолят в концентрации 10 мкг/мл, видимый рост высокочувствительного к мертиоляту тест-штамма (согласно ТУ 42.14.162–79 [20] и более поздним документам — *Alcaligenes faecalis* 415) не позднее пяти суток инкубации при температуре от 30 до 35 °С. Срок годности ТС при испытании МИБП, содержащих мертиолят, не более 3 сут, для остальных ЛС — 14 сут. Условия инкубации, а также необходимость пересева через 3–7 сут мутных препаратов совпадали с ранее утвержденными для испытания МИБП.

Требования к учету и интерпретации результатов испытаний для всех ЛС в основном соответствовали Инструкции [19]. Изменения коснулись лишь оценки результатов повторного посева, в котором мог быть выявлен рост микроорганизмов, отличающихся по морфологии от первоначально выделенных. Испытание разрешалось повторить в третий раз, но уже на удвоенном количестве образцов, что увеличивало вероятность получения достоверных результатов.

В 1987–1990 гг. была утверждена ГФ СССР XI издания, а затем, в 2007 г. — ГФ РФ XII издания, однако требования к испытанию на стерильность в этих документах содержали лишь часть положений [27], относившихся к проведению испытаний других ЛС. Согласно ГФ XI особые требования к испытанию на стерильность разрешалось указывать в частных фармакопейных статьях. Среда должны были обеспечивать визуально обнаруживаемый рост соответствующих тест-штаммов аэробных и анаэробных бактерий и грибов, предусмотренных НД, при посеве их в количестве менее 100 жизнеспособных клеток, однако в тексте ГФ XI они не приводились. Учитывая, что на ТС взамен существовавших ТУ 42.14.162–79 [20] были утверждены соответствующие ФС, а также Инструкция по применению этой среды, утвержденная Министерством здравоохранения СССР, контроль ее качества регламентировался именно этими

документами [23–25]. В соответствии с НД ТС была предназначена именно для контроля стерильности МИБП с целью выявления их возможной контаминации аэробными и анаэробными бактериями и грибами, а чувствительность, эффективность и скорость роста оценивали с помощью тест-штаммов, утвержденных в 1983 г. [19].

В 1995 г. в целях совершенствования системы, обеспечивающей должное качество, эффективность и безопасность МИБП, и в соответствии с рекомендациями ВОЗ правительство России возложило на ГИСК им. Л.А. Тарасевича функции национального органа контроля медицинских иммунологических препаратов (НОК) [28]. НОК отвечал за разработку процедур, которые гарантируют, что используемые в Российской Федерации иммунобиологические препараты соответствуют необходимому уровню качества и эффективности. Надзорная деятельность НОК МИБП распространялась на все организации и предприятия, производящие и реализующие МИБП в нашей стране. В функции НОК входили экспертиза документов и испытание отечественных и зарубежных МИБП с целью их государственной регистрации по всем показателям качества, а также согласование инструкций по применению. В ГИСК им. Л.А. Тарасевича проводился также предварительный контроль и анализ материалов на эти препараты, а предприятия направляли производственные протоколы по изготовлению и контролю (паспорта) и образцы каждой серии препарата [29, 30]. Аналогичные требования распространялись и на питательные среды, в том числе предназначенные для контроля стерильности. За НОК были закреплены государственный надзор за качеством и сертификация МИБП [31]. ГИСК им. Л.А. Тарасевича, осуществляя взаимодействие с ВОЗ и национальными органами других стран, проводил научные исследования по совершенствованию методов стандартизации и оценки качества МИБП, разрабатывал национальные стандарты и определял требования к условиям производства и контролю качества [28, 29]. Первоочередное внимание НОК было направлено на безопасность применения МИБП, вводимых людям. Особое место среди показателей качества МИБП, обеспечивающих их безопасность, занимал показатель «Стерильность».

В 1996 г. обобщенные, основанные на многочисленных научных исследованиях и опыте контроля МИБП национальным органом и предприятиями-производителями требования к проведению испытаний на стерильность МИБП были пересмотрены и внесены в МУК «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям», утвержденные Государственным комитетом санэпиднадзора Российской Федерации [32]. Положения данного документа распространялись на предприятия, производящие и осуществляющие контроль качества МИБП.

Схема испытания МИБП на стерильность включала следующие основные этапы¹.

Требования к расчету количества образцов остались без изменений в соответствии с Инструкцией [14]. Методы испытания (прямой посев и мембранная фильтрация), условия инкубации, требования к качеству ТС и тест-штаммы для ее контроля, а также учет результатов были в соответствии с ВФС [27]. Для МИБП, вызывающих помутнение ТС, пересев на соответствующую свежую ТС проводится на 5–7 сут (ранее на 3–7) с последующей инкубацией 14 сут со дня первичного посева. Инактивацию антимикробного действия мертиолята и фенола (хлороформа) при прямом посеве проводят нейтрализацией тиогликолевой кислотой (в составе ТС) и разведением (1:20)

¹ Приводятся только основные этапы испытания стерильности и требования по ним, отличающиеся от требований ГФ для остальных ЛС.

препарата. Перед проведением испытаний МИБП, содержащих ртутные консерванты, подтверждают наличие нейтрализующих свойств ТС, при этом дополнительная инактивация МИБП не требуется [32].

За более чем 30-летний период в НОК МИБП ГИСК им. Л.А. Тарасевича при испытании по данной схеме с применением одной ТС соответствующего качества было проверено более 15 тысяч серий 362 наименований препаратов. Было выявлено 277 нестерильных серий 45 наименований различных МИБП, из них 212 (76,5 %) серий — при 30–35 °С и 192 (69,7 %) серии — при 20–25 °С. Анализ результатов контроля за данный период на предприятиях-производителях МИБП и НОК показал, что не было отмечено ни одного случая, когда контаминация была бы выявлена на альтернативных ПС (бульон Сабуро, соево-казеиновая среда), рекомендуемых как российской, так и другими известными зарубежными фармакопеями, при отсутствии роста на ТС. Во всех случаях микробный рост, независимо от вида выделенного микроорганизма, был подтвержден и при посеве на ТС соответствующего качества. Так, например, в 2009 г. при испытании препарата Солкотриховак в ГИСК им. Л.А. Тарасевича именно по такой схеме была выявлена контаминация, не обнаруженная при испытаниях, проводимых в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи (ЕФ) и ГФ XII фирмами IDT (Германия), CONFARMA (Франция), Institut Fresenius (Германия) и в испытательной лаборатории НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. Более того, до настоящего времени не было зарегистрировано ни одного случая поступления нестерильного МИБП в учреждения здравоохранения, прошедшего испытания по данной схеме [33]. Используемая схема позволяла не только выявлять в посевном материале минимальные количества различных контаминирующих агентов (аэробы, анаэробы, грибы), менее 100 жизнеспособных клеток, а в действительности менее 40–50, что соответствовало требованиям ЕФ и ГФ XII, но и использовать для этих целей одну среду — тиогликолевую вместо нескольких.

Анализ требований зарубежных фармакопей подтверждает возможность проведения испытания на стерильность по данной схеме, в частности с использованием одной ТС при двух температурных режимах, прежде всего при испытании вязких нефилтруемых препаратов, для которых не может быть применен метод мембранной фильтрации, в том числе содержащих ртутный консервант [15–18, 34]. Данная схема соответствует требованиям международной фармакопеи ВОЗ также и в отношении учета результатов испытания. В случае несоответствия препарата по данному показателю и если доказана правильность проведения теста, повторный контроль в соответствии с этими требованиями следует проводить также на удвоенном количестве образцов. Кроме того, во всех документах имеются указания о возможности использования и других питательных сред, если доказана их чувствительность и эффективность, в том числе тиогликолевой, не содержащей агар и резазурин [15–18, 34].

К 2009 г. отработанная и успешно зарекомендовавшая себя в ходе многолетних исследований НОК и крупнейшими производителями МИБП схема контроля стерильности была включена в нормативные документы (НД, ФСП, производственные регламенты) на все зарегистрированные в Российской Федерации МИБП (более 300 наименований), в том числе на все вакцины национального календаря прививок, на всех этапах производственного процесса: контроль исходного сырья, вносимых ингредиентов, клеточных культур, посевных вирусов, вирусных сборов, полуфабриката до розлива и готовой формы препарата.

Особенностью современного этапа стандартизации ЛС, в том числе МИБП, в Российской Федерации является необходимость гармонизации с ведущими зарубежными фармакопеями в отношении требований к качеству и методам испытаний [35]. Принятая концепция развития получила отражение в таких документах, как «Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года» и федеральная целевая программа «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». Значительное место в названной программе занимает раздел «Совершенствование государственного регулирования в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий», ориентированный на гармонизацию нормативно-правового поля с международными стандартами в сфере обращения ЛС и медицинских изделий [36].

В свою очередь, в соответствии с Федеральным законом № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» в 2010 г. препараты биологического происхождения, предназначенные для иммунологической диагностики, профилактики и лечения заболеваний (ранее МИБП), были отнесены к лекарственным средствам, к группе иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) [37]. Учитывая, что качество лекарственного средства определяется его соответствием требованиям фармакопейной статьи, создание единой законодательной и нормативной базы, а также стандартизация требований к оценке качества всех ЛС в Российской Федерации стали первоочередной задачей.

С целью создания единой мощной отечественной структуры, предназначенной для осуществления экспертизы качества, эффективности и безопасности всех ЛС, включая ИЛП, в 2010 г. к ФГБУ «НЦЭСМП» был присоединен Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича [38].

Основные стандарты, применяемые в фармакопейном анализе и производстве ЛС в Российской Федерации, в этот период были регламентированы ГФ РФ XII издания, утвержденной в 2007 г. [5]. В то же время требования, предъявляемые к методам оценки качества ИЛП по показателю «Стерильность», были изложены в других, ранее принятых и утвержденных в Российской Федерации документах. Они учитывали особенности этих препаратов и, как следствие, имели ряд существенных отличий от требований ГФ XII ОФС 42-0066-07 «Стерильность». В таблице 1 приведены основные различия в требованиях к проведению испытаний ЛС и ИЛП, регламентированных ГФ XII и МУК 4.1/4.2588–96 соответственно. Различия касались как набора питательных сред, тест-штаммов, порядка расчета количества образцов, так и учета результатов. Более того, в эти годы действующей оставалась и ГФ XI издания, в методике испытания на стерильность ЛС которой для выявления грибов следовало использовать среду Сабуро. Тем не менее известно, что при испытании ряда ИЛП (вакцина желтой лихорадки, сывороточные препараты) с использованием среды Сабуро, имеющей низкое значение pH, равное $5,6 \pm 0,2$, происходит изменение их физических свойств, так называемое «створивание» и образование осадка, которое искажает результаты испытания и может повлиять на выявление микроорганизмов-контаминантов [39]. Данная среда также не рекомендована для испытания стерильности БП как Комитетом экспертов ВОЗ, так и основными зарубежными фармакопеями [15–18]. Таким образом, проведение испытания в соответствии с требованиями ОФС 42-0066-07 не только нарушало исторически сложившуюся эффективную схему испытания стерильности ИЛП, но

Таблица 1. Сравнение методик проведения испытания для ИЛП по показателю «Стерильность»

Раздел	Нормативный документ		
	ГФ XII, ОФС 42-0066-07	МУК 4.1/4.2588–96	ГФ XIII, ОФС 1.2.4.0003.15, Гармонизированный вариант для ИЛП
Питательные среды, температура инкубации*	I.1. Тиогликолевая среда (32,5 ± 2,5 °С) 2. Соево-казеиновая среда (22,5 ± 2,5 °С) II.1. Тиогликолевая среда (32,5 ± 2,5 °С) 2. Бульон Сабуро (22,5 ± 2,5 °С)	Тиогликолевая среда (20–25 и 30–35 °С)	I.1. Тиогликолевая среда (32,5 ± 2,5 °С) 2. Соево-казеиновая среда (22,5 ± 2,5 °С) II.1. Тиогликолевая среда (32,5 ± 2,5 °С) 2. Бульон Сабуро (22,5 ± 2,5 °С) III. Тиогликолевая среда** (22,5 ± 2,5 °С, 32,5 ± 2,5 °С)
Требования к качеству тиогликолевой среды	Стерильность		
	Наличие ростовых свойств (при 32,5 ± 2,5 °С) в отношении тест-штаммов аэробных и анаэробных бактерий при посеве их в количестве менее 100 жизнеспособных клеток**		
	—	Наличие ростовых свойств в отношении тест-штаммов грибов (при 20–25 °С) при посеве их в количестве менее 100 жизнеспособных клеток**	
—	Наличие нейтрализующих свойств* (при прямом посеве мертиолятсодержащих препаратов)		
Тест-штаммы для оценки ростовых свойств тиогликолевой среды	Аэробные бактерии: <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 Анаэробные бактерии: <i>Clostridium sporogenes</i> ГИСК 272	Аэробные бактерии: <i>Alcaligenes faecalis</i> 415 Анаэробные бактерии: <i>Clostridium novyi</i> 198	Аэробные бактерии: <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 / <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Alcaligenes faecalis</i> 415** Анаэробные бактерии: <i>Clostridium sporogenes</i> ГИСК 272 <i>Clostridium novyi</i> 198** Грибы**: <i>Candida albicans</i> ATCC 24433 (или NCTC885-653, ATCC 1023)
Правила отбора. Расчет количества образцов готового препарата	По таблицам, в зависимости от объема серии и фасовки препарата	По формуле $n = 0,4\sqrt{N}$, где n — число емкостей для контроля (не менее 10 и не более 40); N — число емкостей в серии	По таблицам, в зависимости от объема серии и фасовки препарата
Учет результатов контроля	Для препаратов, вызывающих помутнение среды, пересев на 14 сут, инкубация 14 + 4 сут	Для препаратов, вызывающих помутнение среды, делают пересев на 5–7-е сут, инкубация 14 сут	

* Температура инкубации 32,5 ± 2,5 °С — для выявления бактерий, 22,5 ± 2,5 °С — для выявления грибов.

** Для случаев использования тиогликолевой среды в качестве универсальной при испытании ИЛП.

могло привести к получению ложноотрицательных результатов и, как следствие, к выпуску загрязненных препаратов.

Учитывая все эти факторы, необходимость внесения дополнений в ОФС 42-0066-07, касающихся требований к испытаниям стерильности ИЛП в Российской Федерации и гармонизированных в том числе с учетом современных международных требований, была очевидна. Идея гармонизации, учитывающей современные российские и международные тенденции и требования к испытаниям стерильности всех групп ЛС, была положена в основу проекта ОФС, рекомендованной взамен ОФС 42-0066-07.

В проект ОФС ГФ XIII были внесены основные требования к проведению испытания стерильности ИЛП в нашей стране в соответствии с МУК 4.1/4.2.588–96. Принимая во внимание, что в набор тест-штаммов для контроля ростовых свойств ТС

ранее не были включены тест-штаммы грибов, предварительно была исследована чувствительность данной среды в отношении штаммов *Candida albicans* NCTC 885-653 и ATCC 10231, рекомендуемых различными фармакопеями [40]. Показано, что ТС обладает чувствительностью 10–100 КОЕ/мл при скорости прорастания штаммов 48 ч, что соответствует отечественным и зарубежным фармакопейным требованиям к ростовым свойствам питательных сред, предназначенным для выявления грибов при испытании стерильности [6, 15–18, 25]. Введение в схему контроля тест-штамма грибов *Candida albicans* позволило окончательно решить вопрос о возможности использования данной среды в качестве универсальной как для выявления аэробных и анаэробных бактерий, так и грибов.

Таким образом, для проведения испытаний ИЛП на стерильность с помощью универсальной ТС в ГФ XII были предложены и затем внесены в ГФ XIII следующие дополнения:

- для выявления аэробных, анаэробных бактерий и грибов испытание может быть проведено на одной ТС при инкубации посевов при двух температурных режимах 30–35 и 20–25 °С, ростовые свойства среды в этом случае оценивают с помощью тест-штаммов *Alcaligenes faecalis* 415 (аэроб), *Clostridium novyi* 198 (анаэроб), *Candida albicans* NCTC 885-653 или *Candida albicans* ATCC 10231 (грибы);

- перед проведением испытаний ИЛП, содержащих ртутные консерванты, методом прямого посева, необходимо проводить определение нейтрализующих свойств среды, подтверждающее инактивацию мертиолята, при этом дополнительная инактивация консерванта не требуется;

- для нейтрализации действия других консервантов, входящих в состав ИЛП, инактиваторы не используются, а основным способом устранения их действия является разведение образцов ПС. Посев испытуемого препарата в ПС проводят в соотношении 1:20, с учетом результатов определения антимикробного действия препарата;

- использование жидкой среды Сабуро для проведения испытания ИЛП не рекомендовано;

- для ИЛП, вызывающих помутнение питательной среды, не позволяющее определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов, на 5–7 сут производят пересев на свежую питательную среду с последующей инкубацией при соответствующей температуре в течение 14 сут со дня первичного посева;

- если результаты испытания ИЛП признаны недостоверными (в случае обнаружения ошибок в ходе анализа), тест повторяют на удвоенном количестве образцов.

Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 октября 2015 г. № 771 с 1 января 2016 г. утверждены ОФС и ФС, составившие Государственную фармакопею XIII издания, в том числе и ОФС 1.2.4.0003.15 «Стерильность» [41, 42]. Таким образом, в настоящее время законодательно закреплено, что в соответствии с требованиями ГФ XIII испытание ИЛП может быть проведено методом мембранной фильтрации или прямого посева с использованием одной среды при двух температурных режимах, позволяющих эффективно выявлять контаминацию аэробными и анаэробными бактериями и грибами. Оценка ростовых свойств ТС, проводимая с использованием высокочувствительных тест-штаммов, позволяет выявлять различия в качестве различных партий. Требования, предъявляемые к чувствительности такой ТС, примерно в два раза выше (40–50 КОЕ), чем для других питательных сред, рекомендованных отечественной и зарубежными фармакопеями (до 100 КОЕ) [15–18]. При необходимости проведения испытания препаратов ИЛП методом прямого посева ТС нейтрализует антимикробное действие консерванта мертиолята и не требует дополнительного внесения инактиватора, в отличие от соево-казеиновой среды и жидкой среды Сабуро. Проведение испытания на стерильность с использованием одной ТС при мониторинге ее качества по ростовым и нейтрализующим свойствам соответствующими высокочувствительными тест-штаммами микроорганизмов остается надежной схемой контроля ИЛП.

Вместе с тем, помимо традиционной, используемой в Российской Федерации схемы контроля стерильности ИЛП, требованиями ОФС 1.2.4.0003.15 предложен альтернативный вариант, гармонизированный с требованиями ведущих зарубежных фармакопей, предусматривающий использование для выявления аэробных бактерий и грибов при 20–25 °С жидкой соево-казеиновой среды, который позволяет расширить

спектр возможностей при подборе методики испытания препаратов, имеющих различную природу и состав [42]. При выборе методики для оценки качества препарата по показателю «Стерильность» должна быть проведена проверка ее пригодности, включая определение антимикробного действия, и подтверждено, что будут выполняться критерии эффективности, характерные для фармакопейного метода испытаний (верификация метода), адекватность и воспроизводимость. В случае внесения изменений в экспериментальные условия испытания, технологического процесса или в состав препарата необходимо подтверждать пригодность методики.

Согласно п. 22 ст. 4 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» качество лекарственного средства — соответствие лекарственного средства требованиям фармакопейной статьи либо в случае ее отсутствия нормативной документации [37]. Для обеспечения высокого качества и безопасности применения ИЛП производители должны устранить в нормативной документации имеющиеся разночтения и несоответствия в ссылках на методики испытания, возникшие в результате многообразия законодательной базы переходного периода. В соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 октября 2015 г. № 771 нормативная документация на зарегистрированные лекарственные препараты для медицинского применения, а также на лекарственные препараты для медицинского применения, заявления о государственной регистрации которых представлены в Министерство здравоохранения Российской Федерации до введения в действие общих фармакопейных статей, утвержденных настоящим приказом, подлежит приведению в соответствие с данными общими фармакопейными статьями до 1 января 2019 г. [41].

Заключение

Проведенный ретроспективный анализ подходов к разработке метода испытания ИЛП по показателю «Стерильность», изучение современных направлений совершенствования оценки качества ИЛП, в том числе в отношении выбора оптимальных питательных сред и методик проверки их качества, чувствительных тест-штаммов и условий инкубирования, определения количества отбираемых образцов препарата, а также обобщение современных требований, предъявляемых к этому испытанию, показали, что гармонизированные и унифицированные требования к проведению испытания всех ЛС, в том числе ИЛП, вошедших в ГФ XIII, учитывают не только современные подходы, но и применявшиеся ранее стандарты, основанные на результатах многолетнего отечественного и международного опыта, и могут послужить основой для установления единых требований к проведению испытания стерильности ИЛП для стран — членов Евразийского экономического союза в рамках создания фармакопей стран Евразийского союза и поможет выработке единых требований к качеству лекарственных средств.

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

Литература / References

1. Федеральный закон от 22 декабря 2014 г. № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств». [Federal Law, December 22, 2014, No. 429-FZ «On Amendments to the Federal Law «On Circulation of Medicines» (In Russ.)]
2. Федеральный закон «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней» № 157-ФЗ от 17.09.1998 (ред. от

- 18.07.2011). [Federal Law, September 17, 1998, No. 157-FZ «About the Immuno Prophylaxis of Infectious Diseases» (Revised July 18, 2011) (In Russ.)]
3. Санитарные правила СП 3.3.2.015–94. «Производство и контроль медицинских иммунобиологических препаратов для обеспечения их качества» (утв. постановлением Госкомсанэпиднадзора РФ от 12 августа 1994 г.). [Sanitary Regulations SR 3.3.2.015–94. «Production and Monitoring of Medical Immunobiological Products to Ensure Their Quality» (Approved by the Decision of the State Committee for Sanitary and Epidemiological Supervision of Russia of August 12, 1994) (In Russ.)]
 4. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (утв. приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 14 июня 2013 г. № 916). [Rules for the Organization of Production and Quality Control of Medicinal Products (Approved by the Order of the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation of June 14, 2013, No. 916) (In Russ.)]
 5. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. Ч. 1. М.: НЦЭСМП; 2008. [The State Pharmacopoeia of the Russian Federation 12th ed. Part 1. Moscow: SCEEMP; 2008 (In Russ.)]
 6. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств. Лекция 10. [Microbiological Control of Sterility of Medicinal Products. Lecture 10 (In Russ.)] Available from: <http://www.gmpua.com/QC/Sterilitytesting.pdf>
 7. Государственная Фармакопея СССР. VII изд. М.–Л.: Медгиз; 1934. [State Pharmacopoeia of the USSR 7th ed. Moscow–Leningrad: Medgiz; 1934 (In Russ.)]
 8. Серия технических докладов ВОЗ, № 530, 1975. 25-й доклад. [WHO Technical Report Series, No. 530, 1975. 25 report (In Russ.)]
 9. Государственная Фармакопея СССР. IX изд. М.: Медгиз; 1961. [State Pharmacopoeia of the USSR 9th ed. Moscow: Medgiz; 1961 (In Russ.)]
 10. Государственная Фармакопея СССР. X изд. М.: Медицина, 1968. [State Pharmacopoeia of the USSR 10th ed. Moscow: Meditsina; 1968 (In Russ.)]
 11. Инструкция по контролю стерильности вакцин, анатоксинов, бактериофагов, лечебных сывороток и аллергенов (утв. Министерством здравоохранения СССР, 1971). [Instructions for Controlling the Sterility of Vaccines, Anatoxins, Bacteriophages, Therapeutic Sera and Allergens (Approved by the Ministry of Health of the USSR, 1971) (In Russ.)]
 12. Бендас ЛГ, Рунова ВФ, Петрова ИТ, Раскин БМ. Сухая питательная среда для контроля стерильности медицинских биологических препаратов. В кн.: Стандарты, штаммы и методы контроля вирусных, бактериальных препаратов и аллергенов. Сборник научных трудов МНИИВС им. И.И. Мечникова. М.; 1975. С. 266–70. [Bendas LG, Runova VF, Petrova IT, Raskin BM. Dehydrated Medium for Control of Sterility of Medical Biological Preparations. In: The Standards, Strains and Methods of Control of Viral, Bacterial Products and Allergens. Collection of Research Papers of MNIIVS im. I.I. Mechnikova. Moscow; 1975. P. 266–70 (In Russ.)]
 13. Петрова ИТ, Резепов ФФ. О возможности использования единой питательной среды для контроля стерильности медицинских биологических препаратов. В кн.: Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. Сборник научных трудов МНИИВС им. И.И. Мечникова. М.; 1977. С. 186–92. [Petrova IT, Rezepov FF. On the Possibility of Using a Single Nutrient Medium to Control the Sterility of Medical Biological Products. In: The Standards, Strains and Methods of Control of Viral and Bacterial Products. Collection of Research Papers of MNIIVS im. I.I. Mechnikova. Moscow; 1977. P. 186–92 (In Russ.)]
 14. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 19 февраля 1979 г. № 192 «О совершенствовании контроля стерильности бактериальных и вирусных препаратов». «Инструкция по контролю стерильности вакцин анатоксинов, бактериофагов, сывороточных препаратов и аллергенов». [Order of the Ministry of Health of the USSR of February 19, 1979, No. 192 «On Improving the Control of the Sterility of Bacterial and Viral Preparations».
 - «Instructions for the Control of the Sterility of Vaccines of Anatoxins, Bacteriophages, Serum Preparations and Allergens» (In Russ.)]
 15. 39<71>/2016. United States Pharmacopeia. 39th ed. Available from: <http://www.uspnf.com/uspnf/login>
 16. European Pharmacopoeia 9.0. 2017. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>
 17. 2.2.11/6.0/2012. Indian Pharmacopoeia.
 18. 4.06/XVII/2016. The Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. Available from: <http://jpcdb.nihs.go.jp/jp17e/000217650.pdf>
 19. Приказ Минздрава СССР от 13 января 1983 г. № 31 «Об унификации методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов». Сборник инструкций по общим методам контроля стерильности, физико-химических свойств, пирогенности, на отсутствие контаминирующих агентов и токсичности иммунобиологических препаратов. [Order of the Ministry of Health of the USSR, January 13, 1983, No. 31 «On the Unification of Methods for the Control of Medical Immunobiological Preparations». Collection of Instructions on General Methods for Controlling Sterility, Physicochemical Properties, Pyrogenicity, Absence of Contaminants and Toxicity of Immunobiological Preparations (In Russ.)]
 20. Питательная среда для контроля медицинских биологических препаратов (Тюгликолевая среда), сухая. ТУ. 42.14.162–79. [Nutrient Medium for the Control of Medical Biological Preparations (Thioglycolic Medium), Dry. TU. 42.14.162–79 (In Russ.)]
 21. Петрова ИТ. Стандартизация метода контроля стерильности медицинских биологических препаратов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.; 1981. [Petrova IT. Standardization of the Method of Sterility Control of Medical Biological Preparations. Cand. Biol. Sci [Thesis]. Moscow; 1981 (In Russ.)]
 22. Гавристова ИА, Андреева ЗМ, Бендас ЛГ. Способ контроля качества тиогликолевой среды. АС № 990808 на изобретение. Заявка № 3311679 от 03.07.1981. [Gavristova IA, Andreeva ZM, Bendas LG. Author's Certificate No. 990808 for an Invention «Method for Quality Control of a Thioglycolic Medium». Application No. 3311679 of July 3, 1981 (In Russ.)]
 23. ФС 42-354BC–90. Питательная среда для контроля стерильности (тиогликолевая среда). [FS 42-354BC–90. Nutrient Medium for Sterility Control (Thioglycolic Medium) (In Russ.)]
 24. ФС 42-3390–97. Питательная среда для контроля стерильности (тиогликолевая среда). [FS 42-3390–97. Nutrient Medium for Sterility Control (Thioglycolic Medium) (In Russ.)]
 25. Инструкция по применению Питательной среды для контроля стерильности, сухой (тиогликолевой среды). Утв. 29.12.1990. [Instructions for Use of the Nutrient Medium for Sterility Control, Dry (Thioglycolic Medium) Approved on December 29, 1990 (In Russ.)]
 26. Государственная Фармакопея СССР. XI изд. Вып. 2. М.: Медицина; 1989. [State Pharmacopoeia of the USSR 11th ed. Publication 2. Moscow: Meditsina; 1989 (In Russ.)]
 27. ВФС 42-1844-88. Испытание на стерильность. [VFS 42-1844-88. Test for Sterility (In Russ.)]
 28. Постановление Правительства Российской Федерации от 18 декабря 1995 г. № 1241 «О государственном контроле за медицинскими иммунобиологическими препаратами». [Decree of the Government of the Russian Federation, December 18, 1995, No. 1241 «Concerning the State Control over Medical Immunobiological Preparations» (In Russ.)]
 29. Приказ Минздравмедпрома РФ и Госкомсанэпиднадзора РФ от 4 марта 1996 г. № 79/36 «О совершенствовании государственного контроля за медицинскими иммунобиологическими препаратами». [Order of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation and the State Committee for Sanitary and Epidemiological Supervision of the Russian Federation, March 4, 1996, No. 79/36 «On the Improvement of State Control Over Medical Immunobiological Preparations» (In Russ.)]
 30. Медуницын НВ. Вакцинология. М.: Триада-Х; 2010. [Medunitsyn NV. Vaccinology. Moscow: Triada-X; 2010 (In Russ.)]

31. Постановление Госкомсанэпиднадзора РФ от 3 июня 1994 г. № 5 «О введении системы государственной регистрации и сертификации медицинских иммунобиологических препаратов». [Decree of the State Sanitary Epidemiological Service of the Russian Federation, June 3, 1994, No. 5 «On Introduction of System of the State Registration and Certification of Medical Immunobiological Preparations» (In Russ.)]
32. МУК 4.1/4.2.588–96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям (утв. Госкомсанэпиднадзором РФ 31 октября 1996 г.) [МУК 4.1/4.2.588–96 «Testing of Injectable Medical Immunobiological Preparations» (Approved by the State Committee on Sanitary and Epidemiology Surveillance, October 31, 1996) (In Russ.)]
33. Озерецковский НА, Затолочина КЭ, Снегирева ИИ. Предложения по профилактике нежелательных реакций при применении иммунобиологических лекарственных препаратов в Российской Федерации. Безопасность и риск фармакотерапии 2015; (1): 25–9. [Ozeretskovsky NA, Zatolochina KE, Snegireva II. Suggestions for Preventing Undesired Reactions at Application Immunobiological Medicinal Products in the Russian Federation. Safety and Risk of Pharmacotherapy 2015; (1): 25–9 (In Russ.)]
34. The International Pharmacopoeia. 7th ed. 2017. Available from: <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>
35. Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (2): 38–41. [Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality Standards for Immunobiological Medicinal Products — New Texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2016; (2): 38–41 (In Russ.)]
36. Приказ Минпромторга РФ от 23 октября 2009 г. № 965 «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года». [Order of the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation, October 23, 2009, No. 965 «On Approval of the Strategy for the Development of the Pharmaceutical Industry of the Russian Federation for the Period Until 2020» (In Russ.)]
37. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (в ред. № 192-ФЗ от 27 июля 2010 г.; № 271-ФЗ от 11 октября 2010 г.; № 313-ФЗ от 29 ноября 2010 г.). [Federal Law of the Russian Federation, April 12, 2010, No. 61-FZ «On Circulation of Medicines» (As Amended by Federal Law No. 192-FZ of July 27, 2010, No. 271-FZ of October 11, 2010, No. 313-FZ of November 29, 2010) (In Russ.)]
38. Лепяхин ВК, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Бунатян НД, Романов БК, Яворский АН, Рычихина ЕМ. История создания и развития контрольно-разрешительной системы лекарственных средств в России. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (1): 3–10. [Lepakhin VK, Olefir YuV, Merkulov VA, Bunatyan ND, Romanov BK, Yavorsky AN, Rychikhina EM. The History of Creation and Development of the Control and Licensing System of Medicines in Russia. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2016; (1): 3–10 (In Russ.)]
39. Суханова СМ, Захарова НЕ. Питательные среды в практике микробиологических исследований. В кн.: Руководство по медицинской микробиологии. М.: Бином; 2008. С. 221–54 [Sukhanova SM, Zaharova NE. Nutrient Media in the Practice of Microbiological Research. In: Guide to Medical Microbiology. Moscow: Binom; 2008. P. 221–54 (In Russ.)]
40. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Захарова НЕ. Новый подход к испытаниям препаратов лекарственных средств на стерильность. В кн.: Всероссийская научно-практическая конференция «Вакцинология-2010». Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней. М.; 2010. С. 108. [Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Zaharova NE. A New Approach to Trials of Drugs for Sterility. In: All-Russian Research-to-Practice Conference «Vaccinology-2010». Improvement of Immunobead and Logical Means of Prevention, Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases. Moscow; 2010. P. 108 (In Russ.)]
41. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 октября 2015 г. № 771 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей». [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation, October 29, 2015, No. 771 «Approval of General Pharmacopoeia Articles and Pharmacopoeia Articles» (In Russ.)]
42. Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 3; М.; 2015. [General Monograph 1.2.4.0003.15 Sterility. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 3. Moscow; 2015 (In Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>

Об авторах

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

Суханова Светлана Михайловна. Начальник лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Бердникова Зинаида Евтропиевна. Главный эксперт лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Захарова Наталия Евгеньевна. Главный эксперт лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, профессор

Поступила 18.01.2018
Принята к публикации 08.02.2018

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2 Petrovsky boulevard, Moscow 127051, Russian Federation

Svetlana M. Sukhanova. Head of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Zinaida E. Berdnikova. Chief Expert of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Natalia E. Zakharova. Chief Expert of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Vadim A. Merkulov. Deputy Director-General for Medicinal Products' Evaluation. Doctor of Medical Sciences, Professor

Received 18 January 2018
Accepted 8 February 2018