

## **ЛЕКЦИЯ 10**

# **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

# Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

ГФ РБ т.1 изд-е 2 разделы 2.6.1, 5.1.10.

*Стерильность – отсутствие живых микроорганизмов.*

Для стерильных лекарственных форм наличие микроорганизмов, даже в малом количестве, может стать летальным, учитывая беспрепятственное попадание микроорганизмов в кровь или на слизистые оболочки организма, при условии ослабленного иммунитета человека.

Впервые тест на определение стерильности лекарственных средств был внесен в фармакопеи Великобритании и США в 1932 и 1936 годах соответственно.

*Цель испытания на стерильность – подтверждение полного отсутствия жизнеспособных бактерий и грибов в испытуемом объекте (АФИ, ЛС).*

Испытание применяется для препаратов, которые должны быть стерильны:

- ЛС для парентерального применения (растворы, лиофильно высушенные и стерильно расфасованные порошки для инъекций и инфузий);
- Офтальмологические ЛС;
- Растворы антисептиков для наружного применения;
- Мази, гели для наружного применения (для нанесения на раневую поверхность);
- АФИ, предназначенные для производства ЛС в форме стерильно расфасованных порошков и др.

*Однако: удовлетворительный результат испытания свидетельствует лишь о том, что в условиях испытания в испытуемом образце не обнаружено микроорганизмов.*

Для стерильных продуктов обоснованные и документированные фактические доказательства правильного протекания процесса их приготовления дают большую гарантию по сравнению с испытанием на стерильность.

# Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

*Условия для проведения испытания по определению стерильности:*

- Испытания на стерильность должны проводиться в тех же условиях, что и асептическое производство: при использовании ламинар-боксов с ламинарным потоком воздуха класса А, расположенной в чистом помещении класса В, или с помощью изолятора.

- Подготовка воздуха, подаваемого в чистое помещение, с помощью HEPA-фильтров (HEPA - High Efficiency Particulate Absorption - высокоэффективная задержка частиц). Эти фильтры служат для практически полной очистки воздуха даже от самых мельчайших частиц, вплоть до 0.1 мкм.

- Доступ к помещению должен быть организован через *воздушные шлюзы* – конструкции с однонаправленными односторонними путями прохождения. Воздушный шлюз предотвращает перемещение воздуха между помещениями. Когда все двери воздушного шлюза закрыты, подаваемый в него воздух разбавляет загрязнения, поступившие из наружного коридора через дверь, либо выделяемые присутствующим персоналом.



## Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств



- Испытуемая продукция должна подаваться через передаточные окна.
- Исполнители должны быть переодеты в стерильную одежду.
- Исполнители должны пройти соответствующую подготовку.
- Меры предосторожности, принимаемые против контаминации, не должны влиять ни на один из микроорганизмов, которые могут быть обнаружены в ходе испытания.
- Условия, в которых проводятся испытания, должны регулярно контролироваться путем отбора проб воздуха и поверхностей рабочей зоны.



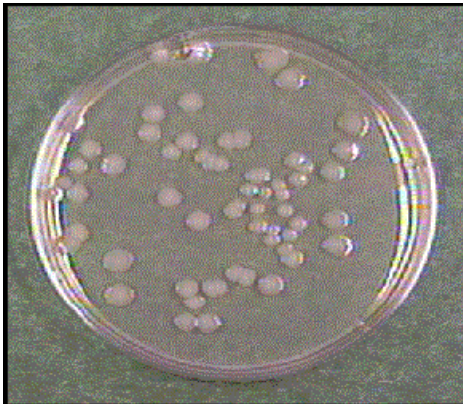
# Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

## Методы определения стерильности:

- Мембранная фильтрация – наиболее предпочтительный метод, если испытуемый препарат фильтруется;
- Метод прямого посева.

## **Прямой Посев**

- Преимущества
  - Быстрый, простой, экономичный
  - Нефильтруемые образцы
- Ограничения
  - Ограниченный объем образца: низкая чувствительность
  - Проблемы с антимикробным действием



## **Мембранная Фильтрация**

- Преимущества
  - Возможность эффективного устранения антимикробного действия
  - Высокая надежность выявления нестерильности антимикробных препаратов из-за отсутствия разбавления, что имеет место при устранении антимикробного действия.
  - Возможность фильтрования большого объема
  - Статистически более достоверен
  - Более чувствителен: высокая эффективность выявления микробной контаминации при низкой концентрации клеток в единице образца благодаря возможности концентрирования или удержания на мембране даже единичных клеток (1 КОЕ на образец)
- Ограничения
  - Нефильтруемые образцы, закупоривание мембраны

# Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

## Питательные среды, используемые для определения стерильности:

- *Жидкая тиогликолевая среда*: снижает окислительно-восстановительный потенциал и способствует росту анаэробных микроорганизмов
  - Выявление анаэробных бактерий
  - Аэробных бактерий
- *Жидкая среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (# среда Сабуро)* :
  - Выявление грибов
  - Выявление аэробных бактерий.

## Приготовление питательных сред

- Из отдельных ингредиентов в соответствии с ГФ РБ
- Из коммерческой дегидратированной среды в соответствии с прилагаемой инструкцией (состав дегидратированной среды должен соответствовать ГФ РБ).

## Проверка пригодности питательных сред

- А. Проверке подлежит каждая партия приготовленных питательных сред (~ 5% от количества в партии)
- Б. *Проверка стерильности*: термостатируют образец каждой партии питательной среды после ее стерилизации в течении 14-ти суток при 30-35°C для тиогликолевой среды и 20-25°C для среды на основе гидролизата казеина и соевых бобов (# среды Сабуро).

По истечении заданного срока на (в) питательных средах должны отсутствовать визуально определяемые признаки роста микроорганизмов.

## **В. Проверка ростовых свойств:**

### 1. Используемые микроорганизмы

- Жидкая тиогликолевая среда: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes*.
- Жидкая среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (# среда Сабуро): *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*.



# Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

## 2. Проведение процедуры:

- порции питательных сред инокулируют небольшим количеством каждого из микроорганизмов (не более 100 КОЕ). Способ приготовления рабочих суспензий аналогичен таковому при проверке ростовых свойств питательных сред, используемых для определения микробиологической чистоты.

- инкубируют: до 3-х дней при температуре 30 - 35°C – в случае бактерий и до 5 дней при температуре 20-25°C – в случае грибов;

- отрицательный контроль: контролю подвергается растворитель, используемый для приготовления исходной и рабочей суспензий тест-микрорганомов, путем высева на питательные среды. Не должно наблюдаться роста микроорганизмов.

3. Интерпретация результатов: среды являются пригодными при условии наличия четкого визуально наблюдаемого роста микроорганизмов.

### Проверка наличия/отсутствия антимикробного действия ЛС:

аналогично тому, как при проверке микробиологической чистоты с учетом условий проведения определения стерильности (определение проводится в жидких средах).

## Определение стерильности ЛС и АФИ

### *1. Объем выборки для испытания (количество единиц продукции):*

- метод определения стерильности – разрушающий, поэтому отбор для анализа большого количества единиц продукции экономически невыгоден;
- использование для анализа малого количества единиц продукции при большом объеме производственной серии – риск получения неадекватного ответа.

Объем выборки зависит от количества единиц продукции в серии и назначения препарата.



# Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

**\*Минимальное количество единиц продукции для испытания**

Количество единиц продукции в производственной серии	Минимальное количество единиц продукции для каждой среды (если не обосновано или не разрешено использование других количеств)
<i>ЛС для парентерального применения</i> - не более 100 контейнеров  - 100 – 500 контейнеров  - более 500 контейнеров	10% или 4 контейнера, в зависимости от того, что больше  10 контейнеров  2% или 20 контейнеров, в зависимости от того, что меньше
<i>Офтальмологические и другие инъекционные ЛС</i> - не более 200 контейнеров  - более 200 контейнеров	5% или 2 контейнера, в зависимости от того, что больше  10 контейнеров

\*Информация носит ознакомительный характер, не является обязательной



# Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

*Минимальные количества испытуемого продукта, используемые для каждой питательной среды*

Количество препарата в контейнере	Минимальное количество, которое следует использовать для посева на каждую среду (если не обосновано или не разрешено использование других количеств)
<b>Жидкости:</b> - менее 1 мл - 1-40 мл - более 40 мл, но не более 100 мл - более 100 мл	<b>Все содержимое контейнера</b> <b>½ содержимого каждого контейнера, но не менее 1 мл</b> <b>20 мл</b> <b>10% содержимого контейнера, но не менее 20 мл</b>
<b>Твердые вещества</b> <i>(лиофилизированные и стерильно расфасованные порошки)</i> Менее 50 мг 50 мг – 300 мг От 300 мг до 5 г Более 5 г	<b>Все содержимое каждого контейнера</b> <b>½ содержимого каждого контейнера, но не менее 50 мг</b> <b>150 мг</b> <b>500 мг</b>

## Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

### 2. *Определение стерильности методом прямой инокуляции*

- **Водные растворы:**

- Определенное количество испытуемого продукта помещают непосредственно в питательную среду. Объем питательной среды должен в 10 раз превышать объем образца для посева (или объем продукта должен составлять не более 10% объема питательной среды);
- Если испытуемый продукт обладает антимикробной активностью, испытания выполняют после нейтрализации подходящим нейтрализующим агентом или путем разведения в достаточном количестве питательной среды;
- При необходимости использования большого объема испытуемого продукта предпочтительно использовать концентрированную питательную среду, приготовленную с учетом последующего разбавления

- **Масляные жидкости:**

- Используют питательные среды с добавкой подходящего эмульгатора в концентрации, приемлемость которой была подтверждена предварительно (например, полисорбат 80 в концентрации 10 г/л)

- **Мази и кремы, гели:**

- Образец для анализа готовят разбавлением в соотношении ~ 1:10 путем эмульгирования с использованием выбранного эмульгатора в стерильном растворителе (например, в растворе мясного или казеинового пептона, концентрацией 1 г/л)

- Приготовленный образец переносят в питательную среду

- Инокулированные питательные среды инкубируют в течение не менее 14 дней при 30 - 35°C (тиогликолевая среда для выявления бактерий) и при 20-25°C (среду на основе гидролизата казеина и соевых бобов (# среда Сабуро) для выявления грибов).

# Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

## 3. Определение стерильности методом мембранной фильтрации

### Установка мембранной фильтрации:

- гребенка из нержавеющей стали (1-, 3-х-, 6-ти-местная)
- фильтродержатели с воронками (пластмассовые, нержавеющей стали, стеклянные)
- мембранные фильтры с номинальным размером пор – 0,45 мкм
- вакуумный насос
- стеклянные колбы Бунзена для использования в качестве приемников фильтрата
- аппарат для фильтрации и мембрану стерилизуют подходящим образом

Конструкция аппарата для фильтрации должна обеспечивать проведение процесса фильтрации в асептических условиях, возможность извлечения мембраны и переноса ее в питательную среду (для аппаратов открытого типа) или проведение инкубации после помещения питательной среды в аппарат (для аппаратов закрытого типа)



Трехместная фильтрующая система (открытого типа):

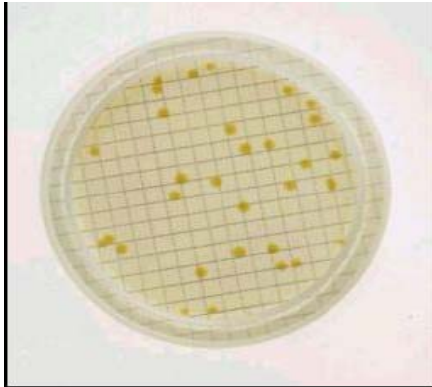
## Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств



### Принцип метода:

- Образец фильтруют через мембранный фильтр, который задерживает присутствующие микроорганизмы.
- Помещают фильтр с задержанными на нем микроорганизмами в питательную среду и инкубируют.
- Если все условия проведения анализа соблюдены, то есть правильно выбраны материал, структура и размер пор фильтра, условия проведения фильтрования, состав питательной среды, температура и время инкубирования, то микроорганизмы быстро размножаются и образуют визуально обнаруживаемый рост (помутнение среды).

# Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств



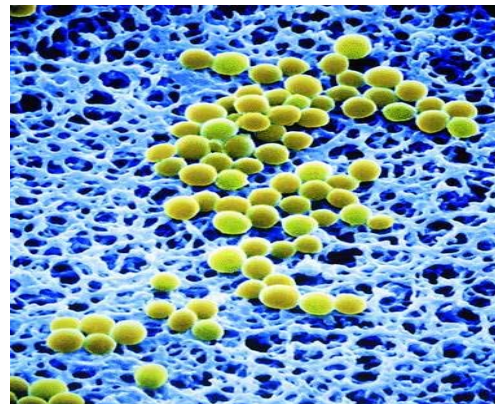
## Мембранные фильтры, требования:

- Микроструктура мембраны и размеры пор должны максимально способствовать прорастанию удержанных на мембране микроорганизмов.
- Высокая пористость, позволяющая быстро фильтровать образцы, в том числе и вязкие.
- Материал мембраны не должен содержать токсичных для микроорганизмов веществ.

- Мембраны должны быть стерильно упакованы и готовы к немедленному использованию

## Мембранные фильтры, оптимальный выбор:

- мембранные фильтры с номинальным размером пор не более 0,45 мкм, с установленной способностью к удерживанию бактерий.
- фильтры изготавливают из инертных материалов: эфир целлюлозы (нитрат или ацетат целлюлозы)
- белые или темные, с нанесенной сеткой для удобства подсчета колоний (для микробиологической чистоты)
- стерильно упакованные



Микрофотография бактерий на мембранном фильтре

## Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

### • Мембранная фильтрация водных растворов

- Содержимое контейнера (контейнеров) переносят на мембрану (мембраны) и немедленно фильтруют;

- Если раствор обладает антимикробным действием, мембрану промывают путем пропускания через нее определенного объема выбранного стерильного растворителя. Число циклов промывки должно быть не более 5 из расчета по 100 мл/цикл, даже если было показано, что такая промывка не полностью исключает антимикробное действие;

- Мембрану целиком переносят в питательную среду или в асептических условиях делят ее на две равные части, каждую из которых помещают в тиогликолевую среду и среду на основе гидролизата казеина и соевых бобов (# среду Сабуро);

- Инокулированные питательные среды инкубируют в течение не менее 14 дней при 30 - 35°C (тиогликолевая среда для выявления бактерий) и при 20-25°C (среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (# среда Сабуро) для выявления грибов).

Контроль: рост культур микроорганизмов в питательных средах этих же партий (проверка ростовых свойств)

Отрицательный контроль:

-положительный результат при проверке стерильности питательных сред этих же партий;

- проверка на асептичность посева: через простерилизованную установку мембранной фильтрации пропускают заведомо стерильную жидкость и производят посев в питательные среды.



# Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

## • Мембранная фильтрация твердых растворимых веществ

- Требуемое количество продукта растворяют в подходящем растворителе: растворителе, прилагаемом к ЛС, изотоническом растворе натрия хлорида, нейтральном растворе 1 г/л мясного или казеинового пептона;

- Далее испытания продолжают как и для растворов.

Контроль: рост культур микроорганизмов в питательных средах этих же партий (проверка ростовых свойств).

### Отрицательный контроль:

- положительный результат при проверке стерильности питательных сред этих же партий;

- отсутствие визуального роста при посеве растворителя в питательные среды (для ЛС в форме стерильных порошков, которые предварительно растворяют в растворителе);

- проверка на асептичность посева: через простерилизованную установку мембранной фильтрации пропускают заведомо стерильную жидкость и производят посев в питательные среды.



## Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств



Система Стеритест - система мембранной фильтрации закрытого типа

Прибор *Стеритест* - это прецизионный перистальтический насос специальной конструкции с регулируемой скоростью работы, позволяющий переносить жидкость (образец, промывочный раствор, среду) из исходной емкости в канистру (фильтроэлемент) Стеритест.

Расходные канистры Стеритест представляют собой две пластиковые емкости, в дно каждой из которых впаян мембранный фильтр с порами 0.45 мкм, а в верхней части находятся 0.22 мкм гидрофобный вентиляционный фильтр и соединение с эластичной ПВХ трубкой, которая на другом конце соединена с одной или несколькими иглами (общими для обеих трубок).

## Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

### 4. Наблюдение и интерпретация результатов

- На протяжении периода инкубации, а также по его завершении оценивают наличие макроскопических признаков микробного роста в средах
- Если признаков микробного роста не обнаруживается, то продукт признают выдерживающим испытание на стерильность
- При наличии признаков микробного роста продукт не выдерживает испытание на стерильность
- Результаты испытания (нестерильность) могут быть признаны недостоверными лишь при выполнении не менее одного из перечисленных ниже критериев:
  - данные микробиологического мониторинга зоны проверки стерильности указывают на произошедшие сбои
  - проверка методики, используемой для проведения испытания, привела к обнаружению недочетов
  - наличие микробного роста в отрицательном контроле
  - Если результаты испытания признаны недостоверными, испытание повторяют. При отсутствии признаков микробного роста в ходе повторного испытания продукт признают стерильным. При наличии – продукт нестерилен и бракуется.
- Если внесение испытуемого материала приводит к помутнению питательной среды, образованию осадка или выпадению хлопьев вследствие чего наличие или отсутствие микробного роста не может быть легко определено визуально, следует через 14 суток после начала инкубации перенести соответствующую порцию инокулированной среды в свежую аналогичную среду и инкубировать первоначальные и повторные посева еще 4 суток

# Лекция 10. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств

## Схема определения стерильности

Проверка пригодности питательных сред (стерильность, ростовые свойства)

Проверка наличия/отсутствия антимикробного действия продукта

← Продукт не обладает антимикробным действием

→ Продукт обладает антимикробным действием

Мембранная фильтрация и перенос фильтров в жидкие питательные среды

Прямой посев в жидкие питательные среды

Нейтрализация антимикробного действия (для нефiltrуемых и плохоfiltrуемых препаратов – разведение, добавление нейтрализующего агента, комбинированный метод; для filtrуемых – мембранная фильтрация)

Прямой посев в жидкие питательные среды с учетом результатов устранения антимикробного действия

Мембранная фильтрация и перенос фильтров в жидкие питательные среды

↓  
Инкубирование, визуальная оценка наличия/отсутствия роста, интерпретация результатов