

## **ЛЕКЦИЯ 13**

**ВАЛИДАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ  
ПРОЦЕССОВ.**

**СТЕРИЛИЗУЮЩАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ  
ЖИДКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

**Валидация** – документально оформленные действия, которые в соответствии с принципами надлежащей производственной практики доказывают, что определенная процедура, процесс, оборудование, исходные материалы, деятельность или система приводят к ожидаемым результатам с заранее установленными критериями приемлемости (ТКП 030-2013. «Надлежащая производственная практика»).

**Валидация технологического процесса** – документированное подтверждение того, что технологический процесс, проводимый в пределах установленных параметров, может осуществляться эффективно, с воспроизводимыми результатами и приводит к получению лекарственного средства, соответствующего заранее установленным характеристикам качествам.

Основные документы по вопросам валидации технологических процессов: ТКП 030-2013 «Надлежащая производственная практика»; ТКП «433-2012» «Валидация процессов производства стерильных лекарственных средств»; ТКП «449-2012» «Порядок подготовки и контроля фильтров для стерилизующей фильтрации»; PDA (Parenteral Drug Association) Technical Report 26 “Sterilizing Filtration of Liquids” (1998); ГФ РБ т.1, изд-е 2, р 5.1.

**Требования к производству стерильных ЛС:**

- Минимальный риск загрязнения микроорганизмами, механическими частицами, пирогенными веществами;
- Производство в классифицированных чистых помещениях и зонах с постоянным контролем степени их загрязненности.

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

*Основные типы технологических операций при производстве стерильных ЛС:*

- Производство с заключительной стерилизацией;
- Производство в асептических условиях.

*Стерилизация* – процесс, обеспечивающий полное уничтожение или удаление из объекта всех жизнеспособных форм микроорганизмов.

*Заключительная стерилизация* – процесс, при котором продукция стерилизуется в герметичной первичной упаковке (ампулах, флаконах, бутылках и др.) и который позволяет проводить измерения и количественную оценку летального воздействия на микроорганизмы.

Если продукция не может быть подвергнута заключительной стерилизации в упакованном виде, все или несколько последних стадий проводятся в асептических условиях.

*Асептическое производство* – совокупность технологических процессов, проводимых в асептических условиях, в т.ч. асептическое наполнение контейнеров продукцией в контролируемой окружающей среде, в которой обеспечение воздухом, материалами, оборудованием и персоналом регулируется так, чтобы загрязнение микроорганизмами и механическими частицами не выходило за установленные пределы.

*К валидации 2-х типов процессов по изготовлению стерильных ЛС применяются принципиально разные подходы:*

- Для ЛС, подвергающихся заключительной стерилизации, – валидация процесса стерилизации
- Для ЛС, производимых в асептических условиях, - валидация процесса стерилизующей фильтрации и асептических операций в целом.

# Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.



*Валидация процесса стерилизации (с использованием влажного пара):*

- разработка цикла стерилизации;
- аттестация стерилизационного оборудования (в т.ч. с помощью химических и биологических индикаторов);
- изучение проникания тепла;
- изучение распределения тепла;
- выполнение испытаний с биологическими пробами (микробиологический тест с использованием устойчивых микроорганизмов);
- валидация процесса при непосредственном контакте влажного пара со стерилизуемой нагрузкой;
- валидация стерилизации и целостности вентиляционных фильтров стерилизатора и др.

# Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

## *Валидация процесса стерилизующей фильтрации*

Для достижения уровня гарантированной стерильности ЛС (SAL) в асептическом производстве применяют:

- системы фильтрации, включающие фильтры стерилизующего уровня для удаления микроорганизмов,
- чистые помещения и локальные зоны, обеспечивающие асептическую среду вокруг этих систем фильтрации.

*Фильтрация* – процесс удаления жизнеспособных и (или) нежизнеспособных частиц из жидкости путем прохождения через фильтрующий материал.

*Фильтрующий материал* – пористый материал, через который пропускают жидкость с целью удаления жизнеспособных или нежизнеспособных частиц.

*Фильтр* – фильтрующий материал, установленный в корпус или держатель.

*Фильтрационная система* – фильтр, оснащенный фильтрационным оборудованием: датчиком, клапаном и др. элементами, соединенными с собранным фильтром.



## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

*Стерилизующий фильтр* – фильтр, способный в процессе фильтрации удалять из среды микроорганизмы, присутствующие в ней в определенной концентрации.

*Требования, предъявляемые к характеристикам и свойствам стерилизующих фильтров:*

- способность удерживать микроорганизмы
- отсутствие способности к сорбции компонентов ЛС
- широкая химическая совместимость с различными средами (растворами ЛС)
- способность выдерживать множественные циклы регенерирующих и стерилизационных воздействий
- стойкость к механическим воздействиям
- высокая производительность и др.

Часть требуемых характеристик предоставляется в составе документов производителя фильтров.

Свойства, которые определяются спецификой применения в конкретных производственных условиях и с конкретными ЛС, должны быть подтверждены (валидированы) пользователем самостоятельно:

- **Удерживающая способность фильтра (микробиологические испытания);**
- Целостность;
- Химическая совместимость фильтруемой продукции и компонентов системы фильтрации;
- Адсорбционные характеристики.

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

### *Удерживающая способность стерилизующего фильтра*

Стерилизующий фильтр: размер пор – 0,2 (0,22) мкм.

*Почему не 0,45 мкм?*

- В природе встречаются мелкие микробные клетки с размером менее 0,5 мкм (например, микоплазмы). В природных популяциях такие клетки представлены очень слабо и в среднем составляют менее 1% от «обычных» бактериальных сообществ.
- Клетки многих бактерий в угнетенном состоянии при определенных условиях могут значительно уменьшаться в размерах – до 0,2 – 0,3 мкм по сравнению со стандартным размером – 0,5 – 2,0 мкм;

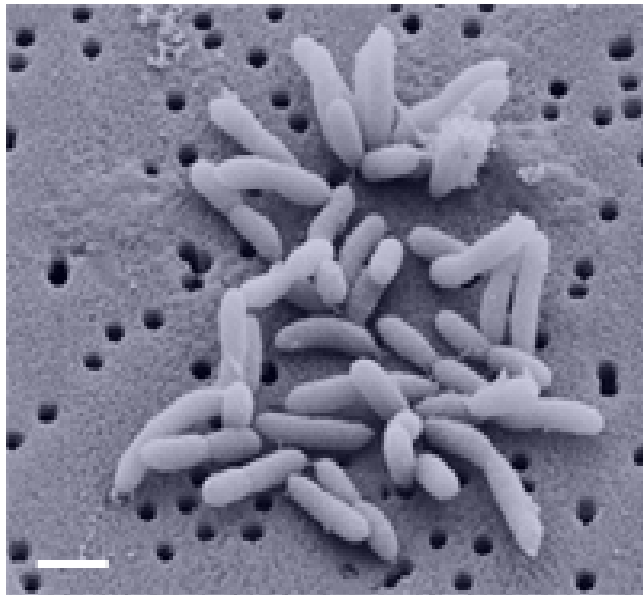
Поэтому для проверки удерживающей способности стерилизующего фильтра используют клетки одной из самых мелких «классических» бактерий – ***Brevundimonas (Pseudomonas) diminuta***:

- Размер клеток, выращенных в стандартных условиях: 0,3 – 0,4 мкм (ширина), 0,6 – 1,0 мкм (длина).
- Суспензия таких клеток считается международным промышленным стандартом микробиологических модельных загрязнений для определения эффективности удерживающей способности на мембранах с диаметром пор 0,22 мкм.
- Для проведения валидации процесса стерилизующей фильтрации используют культуру *Brevundimonas (Pseudomonas) diminuta* ATCC 19146 из американской коллекции типовых культур или другой коллекции контрольных культур (NCIMB 11091, CIP 103020).

# Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

## **Brevundimonas (Pseudomonas) diminuta**

Ранее относились к роду *Pseudomonas*. На основании анализа структуры клеточных белков, состава жирных кислот, последовательности генов рРНК, соотношения оснований ДНК и степени родства ДНК классифицированы в отдельный род - *Brevundimonas*.



### Характеристика.

- Одиночные подвижные аэробные неспорообразующие грамотрицательные мелкие палочки 0,3 – 0,4 мкм (ширина), 0,6 – 1,0 мкм (длина), с полярно расположенным единственным жгутиком.
- Экология: окружающая среда – воздух, вода. Не считается патогеном, но известны случаи выделения из клинического материала.
- Нуждаются в органических факторах роста: пантотенате, биотине, цианкобаламине, метионине или цистине.
- Не ферментируют ряд углеводов (глюкозу, лактозу и др.). Оксидаза-положительны.
- Оптимальная температура роста – 30-35°C



## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

### *Коммерческие препараты культуры:*

- *Лиофилизированный микроорганизм в форме желатиновых или лиофилизированных дисков (гранул, таблеток), упакованных во флакон.*
- *Флакон содержит осушитель с целью предотвращения скопления влаги.*
- *Условия хранения - от +2°C до +8°C (или при других условиях, оговоренных руководством по работе со штаммом).*

В целях использования для валидации процесса стерилизующей фильтрации культуру выращивают на жидкой и агаризованной среде на основе гидролизата казеина и соевых бобов (соево-казеиновый агар – СКА и соево-казеиновый бульон - СКБ).

На агаризованной среде СКА колонии округлые, выпуклые, гладкие, глянцевые, с ровным краем. Цвет колоний – светло-бежевый, иногда с серовато-желтым оттенком. На 24 ч. роста колонии становятся видимыми, точечными. На 48 ч. роста диаметр колоний 2,0 - 2,5 мм; на 72 ч. роста – 3,0 - 3,5 мм.

### Восстановление культуры

- Перед началом работы с культурой в желатиновых или лиофилизированных дисках (гранулах, таблетках) закрытый флакон с культурой достают из холодильника и выдерживают 15 – 20 мин. при комнатной температуре, чтобы при открытии не произошло конденсации воды во флаконе.
- Стерильным пинцетом достают один диск (гранулу, таблетку) и помещают в 0,5 – 1,0 мл стерильной жидкости (раствор натрия хлорида изотонический, СКБ). Флакон немедленно закупоривают и возвращают в место хранения (+2°C - +8°C).
- Диск (гранулу, таблетку) суспендируют, из полученной суспензии стерильной микробиологической петлей делают посев истощающим штрихом на СКА в чашке Петри до получения изолированных колоний. Чашки Петри инкубируют при 30 - 35°C в течение 48 – 72 ч.

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

- По истечении срока инкубирования определяют макроскопические и микроскопические характеристики.
  - Макроскопические характеристики: визуально
  - Микроскопические характеристики: с использованием светового микроскопа, имеющего калиброванный окуляр-микрометр рассматривают микроорганизмы в нескольких полях зрения микроскопа для оценки их размеров и расположения.

Дополнительно готовят окрашенный препарат для подтверждения принадлежности к грамотрицательным бактериям и идентификации жгутиков

- Физиолого-биохимическая идентификация.

### Поддержание культуры

- Изолированные колонии пересевают на скошенную агаризованную среду СКА в пробирках и инкубируют в течение 48-72 ч. при температуре 30 - 35°C.
- Выросшую культуру хранят при температуре от +2°C до +8°C не более 7 суток. По истечении указанного времени хранения культуру пересевают на скошенную агаризованную среду СКА в пробирках. Инкубируют и хранят аналогичным образом.
- Количество пассажей не должно превышать пяти.

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

Фильтр классифицируется как стерилизующий, если он выдерживает бионагрузку в виде клеток *Brevundimonas diminuta* в количестве не менее  $10^7$  КОЕ/см<sup>2</sup> эффективной площади фильтра и обеспечивает стерильный поток на выходе.

*Бионагрузка* (биологическая нагрузка) – популяция жизнеспособных микроорганизмов в жидкости до стадии стерилизующей фильтрации.

Концентрация *Brevundimonas diminuta*  $10^7$  КОЕ/см<sup>2</sup> эффективной площади фильтра – биологическая нагрузка (провокационная нагрузка, микробный вызов).

### Почему $10^7$ КОЕ/см<sup>2</sup> ?

Фильтр может иметь некоторое количество более крупных пор по сравнению с номинальным размером и потенциально может пропускать микроорганизмы. Вероятность такого пропускания увеличивается по мере повышения бионагрузки в фильтруемом материале.

Реальная бионагрузка растворов ЛС, подлежащих фильтрации, как правило, не содержит микроорганизмы меньших размеров и в большей концентрации, чем провокационная нагрузка, применяющаяся при валидационных испытаниях. В большинстве случаев считается допустимой концентрация микроорганизмов в стерилизуемой жидкости 10 КОЕ/100 мл.

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.



Проверка удерживающей способности стерилизующего фильтра проводится с учетом реальных условий производства лекарственного средства:

- Путем инокуляции суспензии микроорганизма в раствор конкретного лекарственного средства (прямая инокуляция), т.к. его компоненты могут оказывать воздействие как на материал фильтра, так и на микроорганизм. *Допускается использовать 10% от реального объема стандартной серии препарата.*
- В течение времени фильтрации объема стандартной серии ЛС
- При давлении и скорости потока, соответствующих таковым в условиях реального производства ЛС
- С учетом температуры фильтрации (если температура раствора ЛС не оказывает влияния на жизнеспособность тест-микроорганизма)

# Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

Прямая инокуляция суспензии *Brevundimonas diminuta* в ЛС позволяет оценить эффект ЛС на материал фильтра и микроорганизм. Однако, прямая инокуляция часто невозможна из-за антимикробных свойств ЛС в отношении тест-микроорганизма.

Поэтому до проведения валидационных испытаний необходимо определить наличие/отсутствие антимикробного действия ЛС в отношении *Brevundimonas diminuta*.

## Определение антимикробного действия раствора лекарственного средства в отношении тест-микроорганизма *Brevundimonas diminuta*

### Условия проведения испытания:

- Температура соответствует температуре фильтрации препарата в условиях производства (как правило – комнатная  $22 \pm 2$  °С)
- Время экспозиции соответствует времени фильтрации препарата в условиях производства
- Количество КОЕ микроорганизма, вносимое в испытываемые растворы, соответствует минимальной бионагрузке на стерилизующий фильтр - не менее  $10^7$  КОЕ/см<sup>2</sup>

### Процедура:

*1. Приготовление испытуемого и контрольного растворов:*

Испытуемый раствор – в раствор лекарственного средства вносится суспензия тестовой культуры.

Контрольный раствор – в стерильный раствора натрия хлорида изотонического (стерильный забуференный раствор натрия хлорида и пептона рН 7,0) вносится суспензия тестовой культуры.

Количество КОЕ, вносимое в опытный и контрольный растворы, рассчитывается по формуле:

$$X = \frac{N \times S \times V_1}{V_2}$$

где:

N – биологическая нагрузка (КОЕ) на 1 см<sup>2</sup> фильтра в количестве не менее  $10^7$  КОЕ.;

S – площадь фильтра см<sup>2</sup>;

V<sub>1</sub>- объем испытуемого раствора ЛС, л;

V<sub>2</sub>- объем раствора, пропускаемого через фильтр в условиях реального производства или при валидации процесса, л;

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

Опытный и контрольный растворы, инокулированные суспензией микроорганизма, выдерживают при температуре  $(22\pm 2)^\circ\text{C}$  в течение времени, равном длительности процесса стерилизующей фильтрации определенного лекарственного средства в условиях производства.

2. *Определение антимикробного действия ЛС в отношении *Brevundimonas diminuta*:*

- Определяют количество КОЕ микроорганизма в 1 мл обоих растворов на:
  - нулевую точку (непосредственно после внесения тест-микроорганизма),
  - среднюю точку (соответствует  $\frac{1}{2}$  времени фильтрации лекарственного средства)
  - конечную точку фильтрации (соответствует времени полной фильтрации лекарственного средства).

Метод: серия последовательных десятикратных разведений опытного и контрольного образцов в том же растворителе. Из каждого разведения высевают по 0,1 мл в две параллельные чашки Петри с агаризованной средой СКА. Чашки инкубируют при температуре 30 - 35°C в течение 48-72 ч.

- Производят подсчет числа выросших колоний, рассчитывают количество КОЕ *Brevundimonas diminuta* в 1 мл испытуемого и контрольного растворов и находят логарифмы (lg) полученных значений.
- Определяют разницу логарифмов КОЕ/мл между контрольным и испытуемым растворами:
  - если разница логарифмов (lg) составляет менее 1, подтверждается выживаемость культуры *Brevundimonas diminuta* и отсутствие антимикробного действия лекарственного средства в условиях испытания;
  - если разница логарифмов составляет 1 и более – лекарственное средство обладает антимикробным действием.

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

Определение антими­кробного действия ЛС в отношении *Brevundimonas diminuta*

t экспозиции (ч)	Результат испытания										
	Контрольный образец					Испытуемый образец					Разность lg
	Разведение 10 <sup>-5</sup>					Разведение 10 <sup>-5</sup>					
	Чашка 1 (число колоний)	Чашка 2 (число колоний)	Среднее значение	КОЕ/мл	lg КОЕ/мл	Чашка 1 (число колоний)	Чашка 2 (число колоний)	Среднее значение	КОЕ/мл	lg КОЕ/мл	
0 t	36	39	37,5	3,75 x 10 <sup>7</sup>	7,5740	40	34	37	3,7 x 10 <sup>7</sup>	7,5682	0,0058
½ t	41	35	38	3,8 x 10 <sup>7</sup>	7,5797	33	39	36	3,6 x 10 <sup>7</sup>	7,5563	0,0234
t	35	38	36,5	3,65 x 10 <sup>7</sup>	7,5623	23	27	25	2,5 x 10 <sup>7</sup>	7,3979	0,1644

**Вывод: Лекарственное средство не обладает антими­кробным действием**

# Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

3. Условия проведения валидации (определение удерживающей способности):

А. Если ЛС не обладает антимикробным действием – при валидации осуществляют прямую инокуляцию тест-микроорганизма в раствор ЛС;

Б. Если ЛС обладает антимикробным действием необходимо:

- *Изменить условия процесса:*
  - снизить температуру раствора
  - сократить время экспозиции системы «раствор- микроорганизм»
- *Использовать модельную среду:*
  - снизить концентрацию или удалить из раствора ЛС соединения, обладающие антимикробным действием
  - скорректировать рН

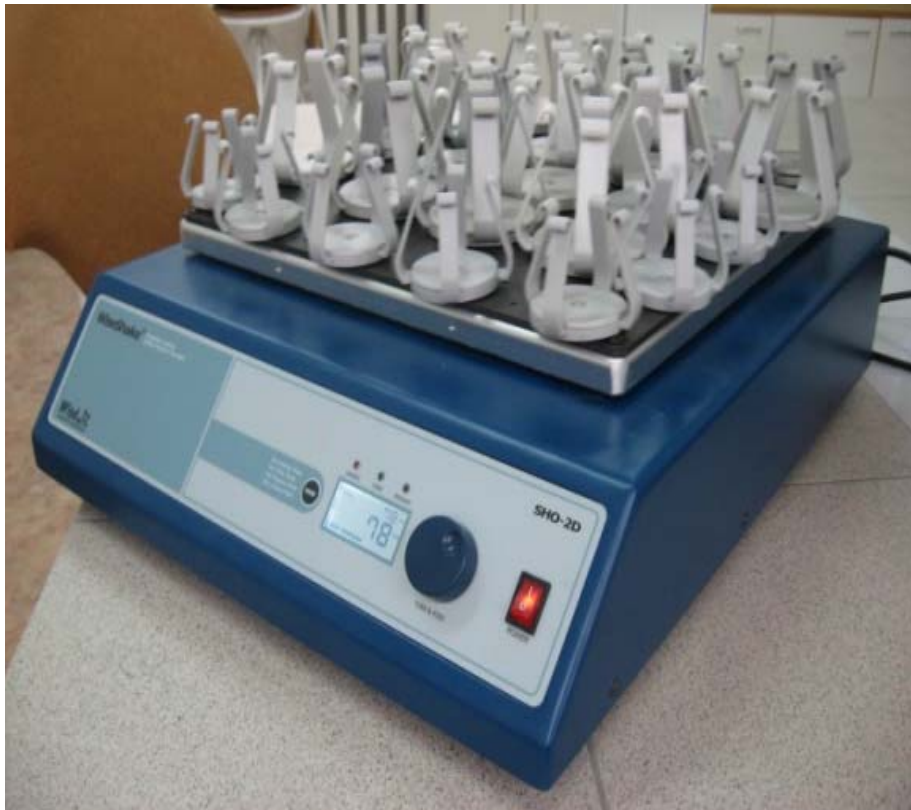
Требования к модельной среде - максимально имитировать состав и свойства фильтруемой среды:

- рН
- вязкость
- ионную силу
- осмолярность и др.
- Если модельная среда представляет собой раствор одного компонента*
  - фильтруют ЛС через мембранный фильтр (наихудший случай),
  - фильтр промывают,
  - фильтруют модельный раствор (растворитель), не содержащий антимикробные компоненты.



## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

### *Способы приготовления суспензии *Brevundimonas diminuta* для валидации процесса стерилизующей фильтрации*



1. Используют желатиновый (лиофилизированный) диск (таблетку, гранулу) либо микробную массу со скошенной агаризованной среды (СКА);
2. Асептически вносят в жидкую среду (СКБ) ;
3. Культивируют с аэрацией при температуре 30-35°C
4. Критерий приемлемости – титр по окончании культивирования должен составлять  $10^9 - 10^{10}$  КОЕ/мл;
5. Режим приготовления суспензии *Brevundimonas diminuta* для валидации процесса стерилизующей фильтрации устанавливается заранее.

# Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

## *Идентификация размера клеток и однородности суспензии *Brevundimonas diminuta**

- ✓ Необходимость процедуры вызвана:
  - возможностью наличия в суспензии клеток, размеры которых превышают приемлемые значения;
  - способностью клеток к агрегации.
- ✓ Методы:
  - Микроскопирование окрашенных по Граму препаратов:
    - Световой микроскоп, оснащенный калиброванным окуляр-микрометром и масляно-иммерсионным или суховоздушным объективом с высокой разрешающей способностью.
    - Рассматривают микроорганизмы в нескольких полях зрения для оценки их размеров и расположения.
  - Фильтрация через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм
    - 10 мл приготовленной суспензии фильтруют через шприцевые фильтрующие насадки (размер пор 0,45 мкм), фильтрат добавляют в 100 мл СКБ, инкубируют 24 - 48 ч. при температуре 30 – 35 °С с аэрацией.
    - По истечении инкубации наличие роста (визуальное) свидетельствует о присутствии в приготовленной суспензии микроорганизмов с размером до 0,4 мкм в ширину.
    - Для подтверждения присутствия в суспензии монокультуры *Brevundimonas diminuta* проводят микроскопирование мазков, окрашенных методом Грама и методом, позволяющим идентифицировать жгутики.

## **Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.**

### *Регистрация приготовления суспензии *Brevundimonas diminuta**

*Процедуру приготовления суспензии *Brevundimonas diminuta* для валидации стерилизующей фильтрации, регистрируют в соответствующих протоколах. Например:*

- Протоколе приготовления суспензии *Brevundimonas diminuta*;*
- Протоколе определения титра жизнеспособных клеток в суспензии *Brevundimonas diminuta*;*
- Протоколе идентификации размера клеток и однородности суспензии *Brevundimonas diminuta*.*

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

*Расчет объёма суспензии *Brevundimonas diminuta*, обеспечивающего необходимую бионагрузку.*

Объём бактериальной суспензии, например, с титром  $10^9$ , необходимый для проведения валидации стерилизующей фильтрации (удерживающей способности фильтра), рассчитывают исходя из активной площади фильтра и минимальной нагрузки на  $1 \text{ см}^2$  этой площади (не менее  $10^7 \text{ КОЕ/см}^2$ ).

Например, если площадь фильтра –  $0,8 \text{ м}^2$ :

$$V = \frac{10^7 (\text{КОЕ} / \text{см}^2) \cdot 0,8 \cdot 10^4 (\text{см}^2)}{10^9 (\text{КОЕ} / \text{мл})} = 80 \text{ мл},$$

Где:  $10^7 \text{ КОЕ/см}^2$  - минимальная нагрузка на  $1 \text{ см}^2$  активной площади фильтра;

$0,8 \cdot 10^4 \text{ см}^2$  - активная площадь фильтра (т. е.  $0,8 \text{ м}^2$ );

$10^9 \text{ КОЕ/мл}$  - титр *Brevundimonas diminuta* в 1 мл приготовленной суспензии

Таким образом, для обеспечения необходимой минимальной нагрузки на фильтр площадью  $0,8 \text{ м}^2$  требуется не менее 80 мл суспензии *Brevundimonas (Pseudomonas) diminuta* в бульоне на основе гидролизата казеина и соевых бобов с титром  $10^9 \text{ КОЕ/мл}$

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

### *Расчет бактериальной (предстерилизационной) нагрузки раствора лекарственного средства (модельного раствора)*

- 80 мл приготовленной суспензии *Brevundimonas diminuta* с содержанием в 1 мл  $10^9$  КОЕ вносят в раствор ЛС (10%•V), при этом минимальная нагрузка на 1 см<sup>2</sup> активной площади фильтра составляет  $10^7$  КОЕ/ см<sup>2</sup> при площади фильтра 0,8 м<sup>2</sup>.
- Суммарная нагрузка на фильтр площадью 0,8 м<sup>2</sup> составляет:  $80 \text{ мл} \cdot 10^9 \text{ КОЕ/мл} = 8 \cdot 10^{10} \text{ КОЕ}$ .
- (10%•V) л приготовленной суспензии *Brevundimonas diminuta* в растворе ЛС содержит  $8 \cdot 10^{10}$  КОЕ культуры *Brevundimonas diminuta*
- Количество КОЕ в 1 мл приготовленного раствора - бактериальная (предстерилизационная) нагрузка раствора лекарственного средства (модельного раствора) - составляет:

$$\frac{8 \cdot 10^{10} \text{ КОЕ}}{(10\% \cdot V) \cdot 10^3 \text{ мл}}, \text{ КОЕ/мл}$$

где:  $((10\% \cdot V) \cdot 10^3 \text{ мл})$  – объем раствора ЛС или модельного раствора в мл

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

Пример расчета бактериальной (предстерилизационной) нагрузки для различных объемов лекарственных средств для фильтра площадью 0,8 м<sup>2</sup> :

Стандартный объем серии ЛС, л	(10%•V), л	Бактериальная (предстерилизационная) нагрузка, КОЕ/мл
250	25	$\frac{8 \cdot 10^{10} \text{ КОЕ}}{25 \cdot 10^3 \text{ мл}} = 0,32 \cdot 10^7$
215	21,5	$\frac{8 \cdot 10^{10} \text{ КОЕ}}{21,5 \cdot 10^3 \text{ мл}} = 0,37 \cdot 10^7$

## Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.

### *Метод определения предстерилизационной нагрузки (титр жизнеспособных клеток в суспензии *Brevundimonas diminuta* )*

- Метод десятикратных разведений в стерильном 0,9% раствор натрия хлорида. Из пробирок с десятикратными разведениями суспензии культуры (  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  и  $10^{-9}$  ) делают высевы по 0,1 мл суспензии в чашки Петри с агаром на основе гидролизата казеина и соевых бобов. Для каждого разведения используют не менее 2-х чашек Петри. Чашки инкубируют при температуре 30 - 35°C в течение 48 - 72 ч., после чего проводят учет результатов.
- Параллельно осуществляют контроль чистоты культуры.
- Число жизнеспособных клеток в 1 мл исходной суспензии рассчитывают следующим образом:

$x = a \cdot 10^n \cdot 10$ , где

$x$  – титр клеток (КОЕ/мл),

$a$  – среднее число выросших колоний в чашке Петри для каждого разведения,

$n$  – степень соответствующего разведения,

10 – коэффициент пересчета для перевода 0,1 мл в 1 мл.

Полученное значение должно соответствовать рассчитанному.

## **Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.**

### *Проведение валидации (определение удерживающей способности)*

1. Приготовление испытуемого раствора ЛС и/или модельного раствора (10% от V);
2. Приготовление суспензии *Brevundimonas diminuta* с титром не менее  $10^9$  КОЕ/мл  
определение размера клеток и однородности суспензии;
3. Инокуляция раствора ЛС или модельного раствора суспензией *Brevundimonas diminuta* с учетом обеспечения бионагрузки не менее  $10^7$  КОЕ/см<sup>2</sup> полезной площади стерилизующего фильтра;
4. Определение предстерилизационной бионагрузки;
5. Проведение процесса стерилизующей фильтрации;
6. Контроль стерильности раствора после проведения стерилизующей фильтрации  
путем высева пробы в жидкую питательную среду (СКБ).

**Критерий приемлемости: фильтраты должны быть стерильны.**

7. Валидацию проводят на трех сериях ЛС (модельных растворов).



## **Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.**

### *Документирование процедуры:*

- Разработка плана валидации, в котором содержится:
  - подробное изложение цели и общей стратегии,
  - характеристика валидируемого объекта,
  - состав валидационной группы, обязанности и ответственность за этапы валидации,
  - условия проведения валидации,
  - контролируемые показатели и критерии приемлемости,
  - порядок проведения испытаний,
  - перечень отчетов и протоколов.
- Составление письменного отчета о проведении валидации: в соответствии с протоколом валидации.

## **Лекция 13. Валидация технологических процессов. Стерилизующая фильтрация жидких лекарственных средств.**

### *Микробиологический мониторинг производственной среды, контроль количества частиц в воздушной среде помещения стерилизующей фильтрации.*

Мониторинг проводится:

1. В оснащем состоянии (до начала процесса стерилизующей фильтрации, когда оборудование и помещение готовы к работе и персонал отсутствует):
  - контроль рук и технологической одежды сотрудников;
  - контроль материалов, внесенных в помещение фильтрации для отбора проб;
  - контроль количества частиц.
  -
2. В функционирующем (эксплуатируемом) состоянии (все системы помещения и технологическое оборудование функционируют установленным образом в присутствии необходимого количества персонала, выполняющего процесс):
  - контроль воздушной среды;
  - контроль рук и технологической одежды аппаратчика;
  - контроль количества частиц.