

2.1.6.24. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК

Данная общая фармакопейная статья не распространяется на испытания человеческой крови или ее компонентов.

1. ВВЕДЕНИЕ

Подходы к микробиологическим испытаниям лекарственных препаратов на основе клеток (далее – клеточные лекарственные препараты), изложенные в данной общей фармакопейной статье, могут быть применены, если испытание на стерильность (2.1.6.1) не может быть выполнено из-за особенностей конкретного клеточного лекарственного препарата (например, срок годности, который не всегда позволяет завершить общепринятые микробиологические испытания до введения пациенту, доступность необходимых для испытания объемов клеточного лекарственного препарата, проблемы, связанные с отбором проб). Все это требует применения подходов, учитывающих ограничения, вызванные природой лекарственного препарата.

1.1. ПОДХОД, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ КОРОТКИМ СРОКОМ ГОДНОСТИ КЛЕТОЧНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Срок годности клеточного лекарственного препарата зависит от характеристик клеток и условий их хранения. Если криоконсервация такого лекарственного препарата невозможна, срок его годности, как правило, не превышает 3–4 сут, а в отдельных случаях – нескольких часов. В результате соответствие клеточного лекарственного препарата требованиям общей фармакопейной статьи 2.1.6.1. *Стерильность* не может быть установлено к моменту его применения. В таком случае получаемый результат может быть определен как «предварительный отрицательный результат», то есть промежуточный результат испытания, проведение которого еще не окончено. Данный результат может приниматься как приемлемый для выпуска клеточного лекарственного препарата с ограниченным сроком годности при соответствующем обосновании, которое должно основываться на анализе рисков относительно характеристик и предполагаемого применения клеточного лекарственного препарата, а также учитывать результаты дополнительного микробиологического контроля, проведенного в рамках внутрипроизводственного контроля.

1.2. ПОДХОД, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ СОСТАВОМ ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА

Микробиологическая контаминация может быть обнаружена как внутри, так и на поверхности клеток и других компонентов клеточного лекарственного препарата. Микробиологическая контаминация может не обнаруживаться, если исследуется только супернатанты, такие как культуральная среда и среда переноса. Испытуемый образец должен быть репрезентативным относительно всех компонентов клеточного лекарственного препарата, если не обосновано иное.

1.3. ПОДХОД, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ РАЗМЕРОМ СЕРИИ КЛЕТОЧНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

По причинам, обусловленным используемыми производственными мощностями или наличием единственного донора, доступный объем клеточного лекарственного препарата в конце производственного процесса может быть ограничен. Тем не менее, размер испытуемого образца должен быть соразмерен допустимой чувствительности и специфичности выбранного метода испытания, чтобы избежать ошибки, когда микробиологическая контаминация не будет обнаружена. Ниже в таблице 2.1.6.24.-1 представлен инокулируемый объем для испытания клеточных лекарственных препаратов, когда серия представлена одной упаковкой объемом (V) от 1 мл до 1 л.

Таблица 2.1.6.24.-1. — *Количество образца для анализа*

Общий объем клеточного лекарственного препарата (мл)	Общий инокулируемый объем (разделенный между флаконами со средой для выделения аэробных и анаэробных микроорганизмов)
$10 \leq V \leq 1000$	1 % от общего объема клеточного лекарственного препарата, подлежащего испытанию
$1 \leq V < 10$	Не менее 100 мкл
$V < 1$	Не применимо

В случае иных объемов или большего количества упаковок в серии следует использовать обоснованные альтернативные подходы к отбору проб. Может быть предусмотрена возможность увеличения общего объема пробы путем разведения, чтобы обеспечить объем пробы не менее 100 мкл. Для клеточных лекарственных препаратов объемом менее 1 мл, где отбор образцов из лекарственного препарата невозможен, следует использовать косвенное испытание, испытание на стадии производственного процесса или другое соответствующее испытание, которое должно быть обосновано.

1.4. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА

Выбор метода осуществляют с учетом характеристик клеточного лекарственного препарата и производственного процесса и основываться на анализе рисков потенциального воздействия микробиологических контаминантов, а также на предполагаемом применении клеточного лекарственного препарата. Питательные среды и время инкубации, используемые при испытании, выбирают с учетом свойств исходных материалов и особенностей производственного процесса, которые могут оказать влияние на рост определенных микроорганизмов (таких как психрофилы, термофилы или чувствительные к питательным средам бактерии и грибы). Состав клеточного лекарственного препарата может препятствовать использованию определенного метода испытания в силу своих физических свойств, например, помутнения питательной среды при добавлении испытуемого образца.

Могут быть применены следующие методы микробиологических испытаний:

- автоматизированные методы, основанные на оценке роста микроорганизмов;
- сочетание предварительного культивирования и обнаружения контаминации инструментальными методами (*Валидация микробиологических испытаний*);
- прямое определение инструментальными методами (*Валидация микробиологических испытаний*);
- определение методами, основанными на испытании стерильности в соответствии с общей фармакопейной статьей 2.1.6.1. *Стерильность*.

2. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ

Испытание проводят в асептических условиях в соответствии с действующими правилами обращения с потенциально инфекционным материалом. Предпринимаемые меры предосторожности по предупреждению контаминации не должны оказывать влияния на микроорганизмы, которые должны быть обнаружены в данном испытании. Испытание выполняют в контролируемых рабочих условиях, регулярно проводя мониторинг, путем отбора проб в рабочей зоне и проведения соответствующего контроля. Необходимо учитывать возможность присутствия в испытуемом образце ингибирующих веществ, способных оказывать влияние на результаты испытания. Их действие должно быть нейтрализовано перед проведением анализа.

3. ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

3.1. АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ОЦЕНКЕ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

3.1.1. Определение ростовых свойств питательных сред

Исследуют по крайней мере 2 подходящие питательные среды, предназначенные для обнаружения грибов, аэробных и анаэробных бактерий. Определяют ростовые свойства каждой серии стерильной питательной среды, засевая флаконы с каждой питательной средой жизнеспособными микроорганизмами каждого вида, приведенного в таблице 2.1.6.24.-2, в количестве не более 100 КОЕ, в двух повторностях. Инкубируют максимум в течение 7 сут при температуре, установленной для испытания (таблица 2.1.6.24.-4). Испытуемые среды отвечают требованиям, если во всех засеянных контейнерах наблюдается четкий рост микроорганизмов в течение указанного периода.

Таблица 2.1.6.24.-2. — Микроорганизмы, используемые в испытании на ростовые свойства

Среда для аэробных бактерий и грибов	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Например, ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Bacillus subtilis</i>	Например, ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Например, ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118
<i>Candida albicans</i>	Например, ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Например, ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007
Среда для анаэробных бактерий	
<i>Clostridium sporogenes</i>	Например, ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 или ATCC 11437
<i>Bacteroides fragilis</i>	Например, ATCC 25285, CIP 77.16, NCTC 9343

3.1.2. Пригодность методики

Для подтверждения пригодности валидированной методики, основанной только на оценке роста микроорганизмов с использованием автоматизированного метода, должна быть подтверждена специфичность (отсутствие ложноположительного результата), чувствительность, воспроизводимость и робастность. Вне зависимости от типа клеточного лекарственного препарата, процесса производства, объема анализируемого образца или типа тест-системы, пригодность

методики должна быть подтверждена в присутствии испытуемого образца. Для подтверждения пригодности методики, в особенности при проверке чувствительности, проводят испытание с использованием микроорганизмов, перечисленных в таблице 2.1.6.24-3. Под чувствительностью понимают способность методики обнаруживать микроорганизмы при их присутствии в испытуемом образце в количестве 100 КОЕ или менее. Выбранные микроорганизмы в количестве не более 100 КОЕ вносят не менее чем в трех повторностях в питательную среду с испытуемым образцом. Количество микроорганизмов в суспензии, использованной для инокуляции, определяют, высевая соответствующий образец на чашки с агаром. Если за время проведения испытания для каждого штамма обнаруживается рост, то методика считается пригодной для данного испытуемого образца.

Перечень используемых микроорганизмов, приведенный в таблице 2.1.6.24.-3, может быть изменен в зависимости от происхождения клеток и от микроорганизмов, для которых существует высокая вероятность присутствия в клетках рассматриваемого типа.

Таблица 2.1.6.24-3. — Микроорганизмы, используемые для проверки пригодности методики

Среда для аэробных бактерий и грибов	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Например, ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007
<i>Bacillus subtilis</i>	Например, ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Candida albicans</i>	Например, ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Например, ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118
<i>Staphylococcus aureus</i>	Например, ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Например, ATCC 19615, CIP 1042.26, NCIMB 13285
<i>Micrococcus sp.</i>	Например, ATCC 700405
Среда для анаэробных бактерий	
<i>Clostridium sporogenes</i>	Например, ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 или ATCC 11437
<i>Cutibacterium acnes</i>	Например, ATCC 11827

3.1.3. Проведение испытания клеточного лекарственного препарата

Испытуемый образец помещают в питательную среду как можно скорее. При необходимости хранения испытуемых образцов, должно оцениваться влияние срока и условий хранения на потенциальную контаминацию.

Испытуемые образцы инокулируют во флаконы с питательной средой как можно быстрее и инкубируют в течение не менее 7 сут. В зависимости от результатов, полученных во время проверки пригодности методики для соответствующих микроорганизмов, инкубационный период может быть продлен до 14 сут. Выбор температуры инкубации должен позволять обнаруживать широкий спектр микроорганизмов и обычно находится в диапазоне 30–37 °С; при этом для клеточных лекарственных препаратов с очень коротким сроком годности может применяться более узкий диапазон температур 35–37 °С для ускорения роста микроорганизмов и получения адекватного «предварительного отрицательного результата». Кроме того, для клеточных лекарственных препаратов с высоким риском загрязнения из источников окружающей среды, используют 2 температурных диапазона, например, 20–25 °С (для аэробных микроорганизмов) и 30–37 °С (для анаэробных микроорганизмов), чтобы охватить как микроорганизмы окружающей среды, так и клинические микроорганизмы.

В таблице 2.1.6.24.-4 перечислены возможные альтернативные подходы к выбору температуры инкубации. Выбор температуры и времени инкубации должен быть основан на результатах исследования пригодности методики для конкретного клеточного лекарственного препарата.

Таблица 2.1.6.24.-4. — Допустимые температурные режимы для автоматизированных систем культивирования

Аэробная инкубация		Анаэробная инкубация
Вариант 1	20–25 °С (автоматизированная система), если необходимо 30–35 °С (автоматизированная система)	30–35 °С (автоматизированная система)
Вариант 2	35–37 °С (автоматизированная система); где уместно, дополнительная инкубация при более низкой температуре*	35–37 °С (автоматизированная система)
Вариант 3	30–32 °С (автоматизированная система)	30–32 °С (автоматизированная система)
Вариант 4	30–32 °С (автоматизированная система)	35–37 °С (автоматизированная система)
*Где применимо, добавляют инкубацию при температуре между 20 °С и 30 °С. Инкубация может выполняться с использованием коммерческих микробиологических		

сред (с использованием флаконов с питательной средой для выделения аэробных микроорганизмов, предназначенных для автоматизированных систем, или с использованием бульона на основе гидролизатов казеина и соевых бобов).

3.1.4. Наблюдение и интерпретация результатов

Для обнаружения роста микроорганизмов посеvy проверяют ежедневно и в конце периода наблюдения.

Если за время периода инкубации или в конце периода наблюдения рост микроорганизмов не обнаружен, результат испытания клеточного лекарственного препарата считается отрицательным. Если наблюдается рост микроорганизмов, результат испытания клеточного лекарственного препарата считается положительным.

Для проверки на наличие ложноотрицательных результатов выполняют субкультивирование каждой инкубированной емкости. Эти испытания проводят для исключения ложноотрицательных результатов, которые могут возникнуть по причине того, что в оптимальных условиях быстрорастущие микроорганизмы могут начать размножаться еще во время хранения и, как следствие, может не наблюдаться значительного увеличения соответствующих параметров во время испытания и микробиологические контаминанты могут не распознаваться системой.

3.2. СОЧЕТАНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ОБНАРУЖЕНИЯ КОНТАМИНАЦИИ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ

Испытуемые образцы инкубируют в аэробной и анаэробной жидких питательных средах или в эквивалентных твердых средах в течение короткого периода времени (например, 12–24 ч в зависимости от чувствительности методики используемого инструментального метода). Затем выполняется инструментальный метод (*Валидация микробиологических испытаний*), подходящий для быстрого обнаружения микроорганизмов (например, методы амплификации нуклеиновых кислот (2.1.6.21), проточная цитометрия (2.1.7.24)).

3.3. ПРЯМОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ КОНТАМИНАЦИИ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ

Если клеточный лекарственный препарат имеет очень короткий срок годности (например, несколько часов) или когда общепринятые методы не обеспечивают удовлетворительное обнаружение микроорганизмов, для микробиологических испытаний могут применяться прямые методы обнаружения, не основанные на оценке роста микроорганизмов (например, методы амплификации нуклеиновых

кислот (2.1.6.21), проточная цитометрия (2.1.7.24), биолюминесценция (*Валидация микробиологических испытаний*)).

Такой подход позволяет получить результат за очень короткое время, хотя и за счет более низкой чувствительности, по сравнению с методами, основанными на оценке роста микроорганизмов. В зависимости от используемого метода могут быть обнаружены как жизнеспособные, так и нежизнеспособные микроорганизмы.

3.4. ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК

Валидация проводится в соответствии с общими рекомендациями общей фармакопейной статьи *Валидация микробиологических испытаний*. Чувствительность методик должна быть подтверждена с учетом роста потенциальных микроорганизмов-контаминантов в пре-инкубационный период.