

«Микробиологическая чистота» сухих питательных сред, используемых для оценки стерильности иммунологических лекарственных препаратов

С. М. Суханова, Н. Е. Захарова*

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

Несоответствие лекарственных средств требованиям испытания по показателю «Стерильность» устанавливается при обнаружении роста микроорганизмов, определяемого визуально по наличию мутности, осадка, хлопьев и других изменений питательной среды (ПС). Определяющим фактором, позволяющим достоверно установить наличие изменений в посевах, подозрительных на контаминацию, является качество используемых ПС, а именно их прозрачность, а также отсутствие в них загрязнений, обнаруживаемых при микроскопии мазков ПС. Присутствие таких загрязнений особенно затрудняет интерпретацию результатов испытания иммунологических лекарственных препаратов (ИЛП), вызывающих помутнение среды вследствие особенностей своего состава, в частности живых бактериальных вакцин. В основу статьи положены исследования качества образцов сухих ПС, рекомендуемых Государственной фармакопеей Российской Федерации XIII издания ОФС.1.2.4.0003.15 для проведения испытания на стерильность ИЛП, по показателям «Прозрачность» и «Микробная обсемененность». Установлено, что среды обсеменены различной микрофлорой, в том числе и патогенной. Учитывая отсутствие в сертификатах качества и в технической документации на компоненты ПС и на сухие ПС большинства отечественных и зарубежных производителей информации об уровне их допустимой обсемененности, обоснована необходимость оценивать их качество по показателю «Микробная обсемененность». Изучена возможность улучшения качества изготовленных промышленным способом сухих ПС на этапе приготовления.

Ключевые слова: питательные среды; микробная обсемененность; микробиологическая безопасность; стерильность; оценка качества; мутность; контаминация; иммунологические лекарственные препараты

Для цитирования: Суханова СМ, Захарова НЕ. «Микробиологическая чистота» сухих питательных сред, используемых для оценки стерильности иммунологических лекарственных препаратов. БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(3):191–197. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-191-197>

* Контактное лицо: Захарова Наталия Евгеньевна; Zaharova@expmed.ru

Microbial Quality of Dehydrated Media Used in the Sterility Testing of Immunobiological Medicinal Products

S. M. Sukhanova, N. E. Zakharova*

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Medicinal products fail sterility testing if visual observation shows the growth of microorganisms that manifests itself as turbidity, sedimentation, flocculation and other changes in the growth medium. A key factor allowing robust determination of changes in the culture that may be suspected of contamination is the quality of growth media used, namely their transparency, and absence of foreign matter detectable by microscopic examination of the growth media smears. The presence of such foreign matter makes it especially difficult to interpret the results of testing of immunobiological products, namely live bacterial vaccines, because they cause turbidity of the media due to their specific composition. The article dwells upon the results of testing (in terms of Transparency and Microbial content) of dehydrated growth media recommended by the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed., General monograph 1.2.4.0003.15 for sterility testing of immunobiological medicinal products. The study revealed the presence of microorganisms, including pathogenic ones, in the growth media. In view of the fact that certificates of analysis and technical documentation accompanying components of growth media and dehydrated growth media produced by most national and foreign manufacturers do not contain any data on the acceptable levels of microorganisms it is argued that these products have to be tested for microbial content. The study also investigated the ways of improving the quality of commercial dehydrated growth media at the preparation stage.

Key words: growth media; microbial content; microbiological safety; sterility; quality evaluation; turbidity; contamination; immunobiological medicinal products

For citation: Sukhanova SM, Zakharova NE. Microbial quality of dehydrated media used in the sterility testing of immunobiological medicinal products. BИOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BИOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2018;18(3):191–197. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-191-197>

* Contact person: Nataliya E. Zakharova; Zaharova@expmed.ru

Достоверность результатов испытания лекарственных средств (ЛС) обеспечивается применением надежных методов, тщательностью их проведения, а также верной интерпретацией полученных данных. Правильная оценка результатов исследования ЛС по показателю «Стерильность» позволяет судить о его микробиологической безопасности, а также является важнейшим подтверждением соответствия условий производства требованиям надлежащих практик (Good Manufacturing Practice, GMP и Good Laboratory Practice, GLP). В соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XIII издания (ГФ РФ XIII) несоответствие ЛС требованиям испытания по показателю «Стерильность» устанавливается при обнаружении роста микроорганизмов, определяемого визуально по наличию мутности, осадка, хлопьев и других изменений питательной среды (ПС) и подтверждаемого микроскопическим исследованием [1].

Важным фактором, позволяющим достоверно установить наличие изменений в посевах, подозрительных на контаминацию, является качество используемых ПС, а именно их прозрачность, а также отсутствие в них загрязнений, обнаруживаемых при микроскопии мазков ПС. Присутствие таких загрязнений особенно затрудняет интерпретацию результатов испытания иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), в частности живых бактериальных вакцин, вызывающих вследствие особенностей своего состава помутнение среды. Наиболее значимо соответствие качества по этим показателям для жидких и полужидких сред, поскольку наличие мутности и/или опалесценции может быть принято в стерильной среде за диффузный рост контаминанта, и наоборот, пророст может быть расценен как свойство среды, что одинаково приводит к получению недостоверных результатов анализа [2, 3].

В соответствии с требованиями ГФ РФ XIII, для контроля стерильности ИЛП рекомендовано использовать тиогликолевую и соево-казеиновую ПС, приготовленные в лаборатории из отдельных компонентов или из сухих сред промышленного производства. Приготовленные в лаборатории ПС необходимо проверять на стерильность и определять их ростовые свойства. Дополнительные требования к качеству ПС не приводятся [1].

Наш опыт наблюдения за свойствами ПС, приготовленных из сухих препаратов в соответствии с инструкцией по их применению, в частности тиогликолевой среды, свидетельствует, что они не всегда оказываются прозрачными, в ряде случаев после стерилизации в толще среды может появляться довольно сильная опалесценция, располагающаяся сегментировано. Данное отклонение не является критичным и допускается требованиями к качеству согласно инструкциям по применению и сертификатам производителей, однако значительно затрудняет интерпретацию результатов. При микроскопии стерильной тиогликолевой среды в мазках могут обнаруживаться окрашиваемые загрязнения, схожие с фрагментами клеток и обусловленные, по всей видимости, исходной микробной загрязненностью сухой среды. Поскольку питательную ценность ПС обеспечивают ингредиенты животного и/или растительного происхождения (гидролизаты казеина и соевой муки, пептон, дрожжевой экстракт), среды сами могут служить субстратом для размножения различных микроорганизмов и могут также накапливать токсичные продукты их жизнедеятельности, приводящие к ухудшению качества ПС.

Одной из причин, оказывающих влияние на качество ПС, является обсемененность агара, входящего в их состав. Агар, содержащий более 10^4 колониеобразующих единиц (КОЕ) термоустойчивой микрофлоры на 1 г, не может быть использован в производстве ПС, так как среды, не подвергающиеся стерилизации, прорастают, а в стерилизуемых средах подавляется

рост искомым тест-штаммов как в количественном выражении, так и в изменении их морфологических свойств [4]. Для изготовления ПС используют агар микробиологический, соответствующий требованиям ГОСТ 17206-96. В 1 г сухого агара такого качества не допускается наличие плесневых грибов, а количество клеток мезофильной аэробной и факультативно-анаэробной термостабильной микрофлоры в 1 г агара может варьировать в зависимости от сорта (500 клеток — сорт экстра, 2000 — высший сорт, 5000 — первый сорт). Так, например, в составе питательного агара агара сорта экстра с бактериальной контаминацией не более 500 клеток обеспечивает рост регламентированных тест-штаммов, в том числе и *Pseudomonas aeruginosa*, используемых для оценки ростовых свойств тиогликолевой среды при испытании стерильности ЛС [5].

Качество ПС зависит от ее состава, свойств сырья, технологии изготовления [6] и может быть ухудшено при приготовлении, в частности, растворением ее деионизованной водой с высоким содержанием микроорганизмов [7].

В настоящее время требования к качеству ПС регламентируются ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации» [8], ГОСТ Р ЕН 12322-2010 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред» [9], а также МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [10]. В соответствии с этими документами, качество ПС зависит от качества основных ингредиентов, точной формулы и правильности изготовления, адекватного удаления микробного загрязнения, соответствующей упаковки и хранения, которое должно быть подтверждено. В технической документации на изделия медицинского назначения, к которым относятся ПС, должны быть регламентированы требования к компонентам (реагентам), входящим в изделия, с указанием квалификации, а также сорта либо марки. Учитывая, что на сегодняшний день, в большинстве случаев, информация об уровне допустимой обсемененности ПС и их компонентов в сертификатах качества и в технической документации отечественных и зарубежных производителей отсутствует, получение данных о микробиологической чистоте ПС является актуальным.

Целью работы являлось изучение микробной обсемененности питательных сред, рекомендуемых для проведения испытания иммунобиологических лекарственных препаратов на стерильность в соответствии с ГФ РФ XIII ОФС.1.2.4.0003.15.

В задачи исследования входило:

1. Оценить влияние первичных загрязнений ПС на результаты исследования качества ИЛП по показателю «Стерильность».
2. Установить уровень микробной обсемененности сухих ПС различных производителей.
3. Провести анализ микробного профиля загрязнений препаратов сухих ПС.
4. Изучить влияние этапов приготовления ПС на прозрачность и их микробную обсемененность.
5. Предложить возможные пути снижения первичных загрязнений коммерческих сухих ПС.

Материалы и методы

Объектами настоящего исследования были образцы сухих ПС: тиогликолевая среда — 4 серии (образцы № 1, 2, 3, 4), соево-казеиновый бульон — 2 серии (образцы № 5, 6) отечествен-

ного и зарубежного производства (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора), HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. (Индия), Merck KGaA (Германия) с паспортами (сертификатами) качества и действующими сроками годности.

Микробную обсемененность и выявление микроорганизмов из 10 г каждого образца оценивали в соответствии с требованиями ГФ РФ XIII ОФС.1.2.4.0002.15 [11], используя питательные среды: № 1-ГРМ, № 3-ГРМ, RVS-бульон производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, а также триптон-соевый бульон, агар Сабуру с глюкозой и хлорамфениколом, цетримидный агар, солевой агар с маннитом производства HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. (Индия). ПС готовили согласно инструкциям по их применению. Ростковые свойства, стерильность и чистоту розлива ПС оценивали по ГФ РФ XIII ОФС.1.2.4.0003.15 [1]. Величину микробной обсемененности определяли методом предельного разведения с подсчетом наиболее вероятного числа (НВЧ) микроорганизмов в 1 г ПС [12]. Идентификацию микроорганизмов проводили на бактериологическом автоматическом анализаторе VITEK® 2 Compact 30 производства bioMérieux (Франция) в соответствии с инструкцией производителя.

Для анализа влияния этапов приготовления (растворение, фильтрование, кипячение) на внешний вид, прозрачность и НВЧ использовали тиогликолевую среду, образец № 2. Навеску ПС в количестве, согласно указанному в инструкции по применению (31,0 г/л), растворяли в воде очищенной. Образцы получали, используя различные стадии приготовления: кипячение (2 мин) и фильтрование (фильтр ватно-марлевый, фильтр бумажный «Синяя лента» (ТУ 2642-001-13927158-2003) или фильтровальная бумага лабораторной марки «Ф» (ГОСТ 12026-76)).

Прозрачность растворов образцов ПС, охлажденных до 18–25 °С, оценивали визуально в проходящем свете на темном фоне и фотоколориметрически, определяя оптическую плотность с использованием фотоэлектроколориметра КФК-2 при $\lambda = 540$ нм [10, 13]. Мазки (по 3 с одного образца) ПС окрашивали по Граму и микроскопировали с иммерсией при увеличении $\times 1000$, просматривая не менее 10 полей зрения.

Результаты и обсуждение

Наличие мутности в приготовленных ПС не позволяет однозначно интерпретировать результаты дальнейших испытаний ИЛП на отсутствие контаминации. Для оценки влияния возможных артефактов на результаты исследования нами были изучены окрашенные мазки образцов сухих ПС, растворенных в воде очищенной, трех наиболее известных производителей: ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. и Merck KGaA. При микроскопировании мазков во всех образцах были обнаружены живые бактериальные клетки, а также в разной степени окрашенные полиморфные частицы среды, которые, по всей видимости, представляют собой разрушенные клетки, белковые преципитаты, агар-агар и т.п., но которые достаточно трудно отдифференцировать от живых бактериальных клеток или их спор (рис. 1).

После стерилизации образцов в мазках сохранялись объекты, похожие на контаминанты, несмотря на то что качество ПС, приготовленных из исследуемых препаратов, в отношении стерильности и ростовых свойств было предварительно подтверждено и соответствовало требованиям ГФ РФ XIII ОФС.1.2.4.0003.15 [1]. Несомненно, что данный факт может отразиться на ходе испытания и на принятии решения о ка-

честве ИЛП. Так, при наличии в мазках посевов вакцинных препаратов, содержащих живые культуры микроорганизмов, не типичных по окраске и морфологии бактерий, необходимо проводить их дальнейшую идентификацию, например с диагностическими иммуноглобулинами. Более того, интерпретация результатов микроскопии посевов в средах такого качества может привести как к ложноположительному, так и к ложноотрицательному результату.

В ходе дальнейшего исследования выявленных первичных загрязнений сухих ПС был изучен их микробный профиль и уровень обсемененности. Во всех испытанных образцах (№ 1–6) тиогликолевой и соево-казеиновой ПС был выявлен рост аэробных микроорганизмов с НВЧ от 75 до 15 000 КОЕ/г. Более того, в процессе хранения отдельных ПС (в течение 6 мес.) установлено увеличение НВЧ в 10 раз и более чем в 100 раз после окончания их срока годности, при соблюдении условий хранения. В соево-казеиновой среде рост наблюдался в виде диффузного помутнения, пленки на поверхности и осадка на дне, а на плотной среде № 1 ГРМ — в виде сухих матовых плоских колоний с ровными и фестончатыми краями с желтым или оранжевым пигментом и без пигмента, блестящих круглых гладких выпуклых колоний с ровным краем (рис. 2).

Наряду с этим, при посеве на соответствующие дифференцирующие среды ни в одном из образцов не был обнаружен рост дрожжевых и плесневых грибов, энтеробактерий, устойчивых к желчи, и *Escherichia coli*. Микроскопия окрашенных по Граму мазков из выросших на плотной среде колоний микроорганизмов подтвердила наличие грамположительных и грамотрицательных палочек и кокков, в том числе и споробразующих. При последующей идентификации, в том числе с помощью бактериологического автоматического анализатора VITEK® 2 Compact 30, установлено, что выделенные микроорганизмы принадлежат к родам *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Dermacoccus*, *Kytococcus*. Микроорганизмы рода *Micrococcus* (*Dermacoccus*, *Ку-*

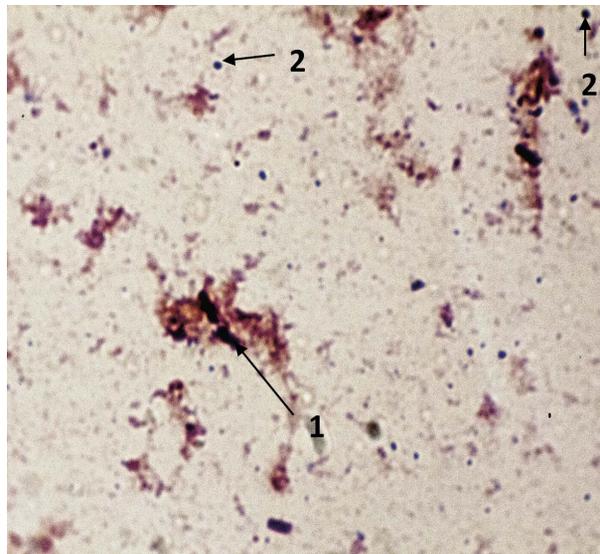


Рис. 1. Образец сухой тиогликолевой среды, растворенной в воде очищенной. Окраска по Граму (увеличение $\times 1000$); 1 — грамотрицательные крупные палочковидные бактериальные клетки, 2 — предположительно, грамположительные кокки.
Fig. 1. A sample of dehydrated thioglycollate medium dissolved in purified water. Gram staining (magnification 1000 \times); 1 — gram-negative large rod-shaped bacterial cells, 2 — presumably gram-positive cocci.

tococcus) устойчивы к высушиванию и нагреванию, способны к развитию при низких температурах, а также разлагают белки с образованием аммония и мочевины до аммонийных солей, редуцируют нитраты и нитриты до свободного азота. Кроме того, микроорганизмы выделенных родов могут вызывать инфекции респираторного и желудочно-кишечного тракта, эндокардиты, септицемию и сепсис, нагноения кожных покровов, оппортунистические инфекции [14–21]. Таким образом, результаты анализа микробного профиля показали, что выделенные из образцов ПС микроорганизмы могут снижать питательную ценность самих ПС, приводить к образованию токсичных продуктов, ухудшая тем самым качество ПС, а также могут представлять потенциальную опасность для человека.

Сравнительный анализ состава исследуемых ПС показал, что, несмотря на некоторые различия в содержании компонентов биологического происхождения (гидролизат казеина — 15–17 г/л, дрожжевой экстракт — 3–5 г/л), а также наличие в образцах тиогликолевой среды агара от 0,2 до 0,75 г/л, обуславливающих возможность присутствия компонентов, служащих источником загрязнения, достоверных различий, в рамках данного исследования, по влиянию на общую обсемененность конкретного компонента не было выявлено. Очевидно, что качество ПС определяется совокупностью факторов производства и в первую очередь качеством отдельных входящих в их состав компонентов.

Поскольку выявленная микробная контаминация обусловлена первичным загрязнением компонентов ПС, ее снижение при анализе рисков должно стать приоритетной задачей для производителей. С целью повышения качества сырья, полуфабрикатов может быть предложена оценка их качества по показателю «Микробная обсемененность» на этапе производства или при входном контроле в производстве самих ПС. В требованиях по микробиологической чистоте основ для ПС, безусловно, должна быть заложена норма: отсутствие таких патогенных для человека микроорганизмов, как *E. coli*, *Salmonella* spp., *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida albicans*, *Clostridium* spp. Достаточно обоснованной и приемлемой для сред и их компонентов, используемых в испытании стерильности ПС, может быть норма, принятая для агара микробиологического сорта экстра. Конкретные нормы по общему числу аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов должны быть

установлены с учетом безопасности при производстве, рисков при применении ПС, а также сохранения ее качества в течение срока годности, в том числе по уровню обсемененности.

С учетом полученных результатов проведено исследование влияния этапов приготовления ПС на прозрачность и микробную обсемененность. Согласно МУК 4.2.2316-08, сухие среды готовят в соответствии с инструкцией по применению, причем бульоны, как правило, фильтруют через бумажный фильтр, а агаровые среды — через ватно-марлевый. Анализ инструкций по применению исследуемых ПС показал, что способ приготовления аналогичных сред из сухих препаратов различается у разных производителей. Так, например, тиогликолевую среду одного производителя перед стерилизацией следует растворить в воде и прокипятить, а другого — после кипячения необходимо дополнительно профильтровать, однако тип фильтра обычно не указывается. Мы попытались оценить влияние этапов приготовления (кипячение, фильтрование) не только на прозрачность, но и на степень микробной обсемененности на примере тиогликолевой среды, для которой согласно инструкции по применению необходимо фильтрование (образец № 2). Выбор тиогликолевой среды был обусловлен также и тем фактором, что для оценки качества ИЛП по показателю «Стерильность» данная среда может быть использована в качестве единственной, «универсальной», что обуславливает особые требования к ее качеству.

Сравнительное изучение качества среды было проведено на образцах, полученных растворением навески ПС (этап 1) с последующими стадиями приготовления: фильтрование через ватно-марлевый фильтр (этап 2), через бумажные фильтры двух видов (фильтр «Синяя лента» («А») и по ГОСТ 12026-76 («Б»)), предназначенные для проведения лабораторных работ, но имеющих различные фильтрующие свойства (этапы 3 и 4), кипячение (этап 5), кипячение и фильтрование через ватно-марлевый фильтр (этап 6) или через бумажные фильтры (этапы 7 и 8) (табл. 1). Результаты свидетельствуют, что на стадии предварительного фильтрования через ватно-марлевый фильтр происходит освобождение раствора от крупных механических частиц, снижающее его мутность, но не влияющее на обсемененность. При замене на этой стадии ватно-марлевого фильтра на фильтрованную бумагу (этапы 3 и 4) жидкость становится прозрачной, а обсемененность после пропускания через фильтр «А» снижается примерно в 1,8–2 раза, а через фильтр «Б» — в 10 раз. Интересно, что такое же снижение обсемененности на порядок наблюдали и при использовании только стадии кипячения в течение 2 мин, при этом последующее фильтрование через ватно-марлевый фильтр было не результативно. Проведение этапа фильтрования через бумажный фильтр «А» после кипячения позволило снизить обсемененность дополнительно примерно в 45 раз, а через фильтр «Б» — в 100 раз. Последовательность проведения стадий фильтрования и кипячения при приготовлении не влияла на прозрачность и обсемененность среды.

Уменьшение мутности, подтвержденное фотоколориметрически, наблюдали в образцах, полученных фильтрованием через фильтровальную бумагу до процедуры кипячения. Выявлено, что после кипячения, а затем и после стерилизации во всех образцах отмечается повышение оптической плотности (за счет перехода растворов в гелеобразное состояние), не коррелирующее с изменением их обсемененности, при этом внешний вид всех образцов представляет собой слабо опалесцирующую гелеобразную жидкость. Использование фотоколориметрической оценки изменения мутности ПС в процессе ее приготовления было неинформативно.

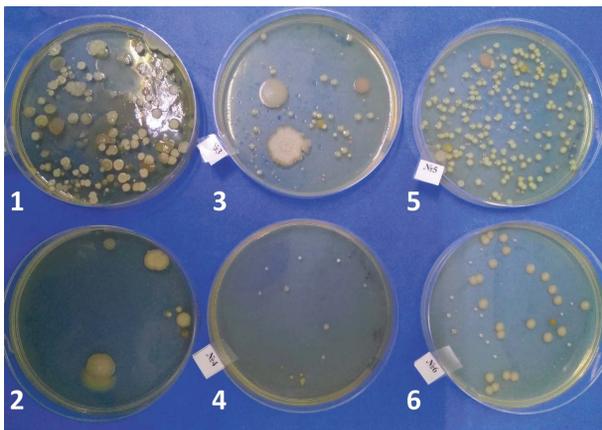


Рис. 2. Рост аэробных микроорганизмов, выделенных из образцов тиогликолевой среды (1–4) и соево-казеинового бульона (5, 6), на плотной среде № 1-ГРМ.

Fig. 2. Growth of aerobic microorganisms, isolated from the thioglycollate medium (1–4) and casein soybean digest broth (5, 6) on the solid medium No. 1-GRM (fish flour hydrolysate).

Таблица 1. Влияние этапов приготовления тиогликолевой среды на ее прозрачность и обсемененность
Table 1. Influence of the stages of thioglycollate medium preparation on its clarity and microbial content

Этапы приготовления среды из сухого образца	Внешний вид полученного образца тиогликолевой среды	Оптическая плотность ($D = 540 \text{ нм}$)	НВЧ в 1 г
1. Растворение	Непрозрачная жидкость	$0,024 \pm 0,002$ ($0,050 \pm 0,002$)*	4500
2. Фильтрация (ватно-марлевый фильтр)	Опалесцирующая жидкость	$0,020 \pm 0,001$ ($0,050 \pm 0,002$)*	4500
3. Фильтрация (бумажный фильтр «Синяя лента»)	Прозрачная жидкость	$0,020 \pm 0,001$ ($0,050 \pm 0,001$)*	2500
4. Фильтрация (фильтровальная бумага ГОСТ 12026–76)	Прозрачная жидкость	$0,018 \pm 0,002$ ($0,050 \pm 0,002$)*	450
5. Кипячение в течение 2 мин	Слабо опалесцирующая жидкость	$0,043 \pm 0,002$ ($0,135 \pm 0,002$)*	450
6. Кипячение + фильтрация (ватно-марлевый фильтр)	Слабо опалесцирующая жидкость	$0,042 \pm 0,003$ ($0,130 \pm 0,002$)*	450
7. Кипячение + фильтрация (фильтр «Синяя лента»)	Слабо опалесцирующая жидкость	$0,042 \pm 0,003$ ($0,130 \pm 0,002$)*	9,5
8. Кипячение + фильтрация (фильтровальная бумага ГОСТ 12026–76)	Слабо опалесцирующая жидкость	$0,041 \pm 0,002$ ($0,095 \pm 0,003$)*	4,5

Примечание. НВЧ — наиболее вероятное число.

*Значение оптической плотности образца после стерилизации.

Возможность уменьшения исходного загрязнения сухого образца коммерческой ПС при приготовлении была подтверждена микроскопически исследованием мазков стерильных образцов среды, окрашенных по Граму. В образцах, подготовленных в соответствии с инструкцией по применению фильтрованием через фильтры «А» и «Б», загрязнения практически отсутствовали. Несмотря на то что выполнение процедуры фильтрования через бумажный фильтр с практической точки зрения гораздо сложнее, чем через ватно-марлевый, особенно при больших объемах среды, именно ее применение повышает выход приготавливаемой среды и улучшает за счет удаления контаминантов ее качество. При необходимости для снижения уровня первичной загрязненности коммерческих сухих ПС рекомендуется подбирать материалы для фильтрования, обеспечивающие требуемое качество.

Выводы

1. Подтверждено влияние первичных загрязнений ПС на результаты исследования качества ИЛП по показателю «Стерильность».

2. Установлено, что уровень микробной обсемененности сухих ПС отечественных и зарубежных производителей, используемых для оценки стерильности ИЛП, составил от 75 до 15000 КОЕ/г.

3. Анализ микробного профиля загрязнений препаратов сухих ПС показал наличие в них микроорганизмов, в том числе и патогенных для человека, принадлежащих к родам *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Dermatococcus*, *Kytococcus*.

4. Установлено, что этапы кипячения и фильтрования позволяют повысить прозрачность, а также до 100 раз снизить уровень микробной обсемененности ПС в процессе их приготовления из сухого препарата.

5. Для снижения микробных загрязнений сухих ПС при их производстве обоснована необходимость учитывать качество сырья по уровню обсемененности. Предложены подходы

к установлению нормативных требований допустимого уровня микробной обсемененности ПС и их полуфабрикатов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

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

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

- Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 «Стерильность». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General monograph 1.2.4.0003.15 Sterility. The State pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)]
- 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. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(2):38–41 (In Russ.)]
- 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. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2015;(1):25–9 (In Russ.)]
- Гриднева НИ. Конструирование и стандартизация сухих диагностических питательных сред промышленного выпуска: дис. ... канд. мед. наук. М.; 1979. [Gridneva NI. Design and standardization of dry diagnostic nutrient media of industrial production. Cand. Med. Sci. [dissertation]. Moscow; 1979 (In Russ.)]
 - Суханова СМ, Захарова НЕ, Конду ЭИ. Оценка качества агара очищенного для бактериологических питательных сред. В кн.: *Материалы Всероссийской научной конференции, посвященной 100-летию со дня основания Томского «НПО» Вирион»: «Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов»*. Томск; 2004. С. 71–3. [Sukhanova SM, Zakharova NE, Condu EI. Evaluation of the quality of purified agar for bacteriological nutrient media. In: *Materials of the All-Russian scientific conference, dedicated to the 100th anniversary of the founding of the Tomsk «NGO» Virion»: «Actual Issues of Development, Production and Application of Immunobiological and Pharmaceutical Preparations»*. Tomsk; 2004. P. 71–3 (In Russ.)]
 - Поляк МС, Сухаревич ВИ, Сухаревич МЭ. *Питательные среды для медицинской микробиологии*. СПб.: ООО «Анатолия»; 2003. [Polyak MS, Suharevich VI, Suharevich ME. *Nutrient Media for Medical Microbiology*. St. Petersburg: ООО «Anatoliya»; 2003 (In Russ.)]
 - Merck Microbiology Manual 12th ed. Darmstadt: Merck KGaA. Available from: <https://ru.scribd.com/doc/94454909/Merck-Microbiology-Manual-12th>
 - ГОСТ Р 51088-2013. Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации. М.: Стандартинформ; 2014. [State Standard P 51088-2013 *In vitro* Diagnostic Medical Devices. Reagents, Kits, Test-Systems, Control Materials, Culture Media, Requirements to Devices, and to Supporting Documentation. Moscow: Standartinform; 2014 (In Russ.)]
 - Национальный стандарт РФ ГОСТ Р ЕН 12322-2010. «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред». М.: Стандартинформ; 2011 [State Standard R EN 12322-2010. *In vitro* Diagnostic Medical Devices. Culture Media for Microbiology. Performance Criteria for Culture Media. Moscow: Standartinform; 2011 (In Russ.)]
 - МУК 4.2.2316-08. *Методы контроля бактериологических питательных сред*. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008. [MUK 4.2.2316-08. *Methods of Control of Bacteriological Nutrient Media*. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2008 (In Russ.)]
 - Общая фармакопейная статья 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General monograph 1.2.4.0002.15 Microbiological purity. The State pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
 - Бакулин МК, Лещенко АА, Чеботарев ЕВ. Микробиология. Методические указания к лабораторным работам и учебной практике (специальность «Микробиология»). Киров; 2005. [Bakulin MK, Leschenko AA, Chebotarev EV. *Microbiology. Methodical Instructions to Laboratory Works and Training Practice (specialty «Microbiology»)*. Kirov; 2005 (In Russ.)] Available from: <https://studfiles.net/preview/4350266>
 - МУК 4.1/4.2.588-96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. [MUK 4.1/4.2.588-96. *Testing of Injectable Medical Immunobiological Preparations (In Russ.)*]
 - Воробьев АА, ред. *Медицинская микробиология, вирусология и иммунология*. М.: Медицинское информационное агентство; 2012. [Vorobiev AA, ed. *Medical Microbiology, Virology and Immunology*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2012 (In Russ.)]
 - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. V. 2. New York; 2009.
 - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. V. 3. New York; 2009.
 - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. V. 5. New York; 2012.
 - Мавлянов ИР, Мустафин РИ, Кенжаева ДХ. Характеристика микрофлоры желудка у больных с ревматоидным и реактивными артритами. В кн.: *Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции «Боткинские чтения» 11–12 мая 2017*. СПб.: Человек и его здоровье; 2017. С. 163–4. [Mavlyanov IR, Mustafin RI, Kenzhaeva DKh. Characteristics of Gastric Microflora in Patients with Rheumatoid and Reactive Arthritis. In: *Collection of abstracts of the All-Russian research-to-practice conference «Botkin Readings» 11–12 May, 2017*. St. Petersburg: Chelovek i ego zdorov'e; 2017. P. 163–4 (In Russ.)]
 - Джораева СК, Иванцова ЕК, Кочетова НВ, Васильева ЕС, Щеголева ЕВ, Ковалик АИ. Микробиологический мониторинг состава и антибиотикорезистентности возбудителей оппортунистических инфекций уrogenитального тракта. *Dermatologiya ta venerologiya = Дерматология та венерология*. 2012;(4):34–9. [Dzhoraeva SK, Ivantsova EK, Kochetova NV, Vasilyeva ES, Shchogoleva EV, Kovalic AI. The microbiological content and antibiotic resistance monitoring of the opportunistic infection pathogens in the urogenital tract. *Dermatology and Venereology*. 2012;(4):34–9 (In Russ.)]
 - Tsai CY, Su SH, Cheng YH, Chou YL, Tsai TH, Lieu AS. *Kocuria varians* infection associated with brain abscess: A Case Report. *BMC Infect Dis*. 2010;10:102. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-102>
 - Mousumi Paul, Renu Gupta, Suman Khushwaha, Rajeev Thakur. *Kocuria rosea*: an emerging pathogen in acute bacterial meningitis — Case Report. *JMAA*. 2015;1(1):4–7.

Об авторах

Суханова Светлана Михайловна, канд. биол. наук, начальник лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

Захарова Наталия Евгеньевна, канд. биол. наук, главный эксперт лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0985-3694>

Поступила 06.12.2017
Принята к публикации 26.04.2018

Authors

Svetlana M. Sukhanova, Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

Nataliya E. Zakharova, Candidate of Biological Sciences, Chief Expert of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0985-3694>

Received 6 December 2017
Accepted 26 April 2018