










ОЦЕНКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРИЛЬНОСТИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

С.У. Молдагулова *, Э.Ж. Калимолда , С.О. Садикалиева ,
Г.Б. Токкарина , Е.П. Воронина , Б.А. Еспембетов , А.С. Нурпейсова ,
М.М. Касенов , К.А. Шораева 

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, пгт Гвардейский
sabina_moldagulova@mail.ru

Аннотация: одним из основных критериев биологической безопасности иммунобиологических препаратов является их стерильность. В данной статье представлены результаты оценки двух методов – прямого посева и мембранной фильтрации. А также представлены результаты контроля стерильности инаktivированной вакцины против Covid-19 «QazCovid-in®», серии № 0400721, № 0410721, № 0420721. Оценка стерильности испытуемых образцов трех серий вакцины показала, что после инкубации питательная среда оставалась чистой как в образцах прямого посева, так и образцах мембранной фильтрации. Учет и оценка полученных данных исследований проведены в соответствии с Государственной Фармакопеей Республики Казахстан. Для оценки чувствительности двух методов определения стерильности, образцы иммунобиологических препаратов были экспериментально заражены культурами тест-штаммов *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Clostridium sporogenes*. В результате определения стерильности на двух методах, мембранной фильтрации и прямого посева, образцы показали одинаковую чувствительность, при обнаружении дрожжей и анаэробных организмов во всех исследуемых концентрациях тест-штаммов (10, 1, 0,1 КОЕ/мл). А для обнаружения аэробных микроорганизмов метод мембранной фильтрации оказался более чувствительным по сравнению с методом прямого посева, доказательством являются положительные результаты во всех пробах тест-штаммов при мембранной фильтрации (3/3 во всех концентрациях) и отрицательные при постановке метода прямого посева (в концентрациях 1 и 0,1 КОЕ/мл). Таким образом, цель настоящего исследования заключалась в оценке этих двух методов, используемых для определения стерильности иммунобиологических препаратов.

Ключевые слова: иммунобиологический препарат; стерильность; метод прямого посева; метод мембранной фильтрации; контаминация

Введение

Основными требованиями, предъявляемыми к применяемым практически в любой области медицины биопрепаратам, к которым отнесены иммунобиологические препараты (ИП), является их безопасность и эффективность [1]. Учитывая, что значительная часть ИП предназначена для парентерального применения, определяющим критерием их микробиологической безопасности является в первую очередь – стерильность. Получение стерильного медицинского препарата не контаминированного посторонней микрофлорой является первостепенной задачей производства, позволяющей исключить

дополнительный риск при применении препаратов, вводимых людям. Подтверждением микробиологической безопасности препаратов, наряду с соответствием условий их производства требованиям надлежащих практик GMP является использование при оценке их качества точных, высокочувствительных и адекватных методов, обеспечивающих достоверные результаты исследований [2, 3].

Испытание готовых продуктов на стерильность необходимо рассматривать только как завершающий этап в серии контрольных мероприятий, гарантирующих их чистоту. Методика испытания на стерильность должна быть валидирована для каждого продукта [4].

Испытания на стерильность должны проводиться в тех же условиях, что и асептическое производство: при использовании ламинар-боксов с потоком воздуха класса А, расположенные в чистом помещении класса В. Подготовка воздуха, подаваемого в чистое помещение проводится с помощью HEPA-фильтров (HEPA - High Efficiency Particulate Absorption - высокоэффективная задержка частиц), которые служат для практически полной очистки воздуха даже от самых мельчайших частиц, вплоть до 0.1 мкм [5-7]. Использование изолирующих технологий GMP сокращает необходимость присутствия человека в производственных зонах, в результате чего значительно сокращается риск микробной контаминации продукции, производимой в асептических условиях [8].

Испытание на стерильность, описанные в Государственной Фармакопее Республики Казахстан (ГФ РК) включают методы прямого посева и мембранной фильтрации.

Мембранная фильтрация – это разделение веществ в растворах на полупроницаемых мембранах. Данный метод позволяет осуществить разделение дисперсных систем на составляющие – отделить более крупные и более мелкие частицы. Метод мембранной фильтрации используют во всех случаях, когда природа препарата и его физико-химические свойства позволяют фильтровать его через мембранные фильтры.

Метод прямого посева используется для испытания стерильности ИП, не обладающих антимикробным действием или антимикробное действие у которых можно устранить разведением или инаktivированием, а также для препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

Из двух методов, мембранная фильтрация наиболее предпочтительный и высокоэффективный метод при испытаниях, тогда как метод прямого посева является наиболее простым экспресс-методом, предназначенный для испытания ИП.

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности двух описанных в данной статье микробиологических методов (прямой посев и мембранная фильтрация) в контроле качества определение стерильности ИП, производимых в НИИПББ.

Материалы и методы

Вакцина

Испытуемыми образцами ИП являются серии инаktivированной вакцины против COVID-19 – «QazCovid-in®»: № 0400721, № 0410721, № 0420721 производимые в НИИПББ. Все использованные образцы были протестированы методом прямого посева и мембранной фильтрации в рамках контроля качества с отрицательными результатами [2].

Штаммы и приготовление разведений микроорганизмов

В работе были использованы дрожжи, аэробные, анаэробные и спорообразующие микроорганизмы (штаммы АТСС), предоставленные из коллекции микроорганизмов НИИПББ (таблица 1). Для приготовления десятичных разведений культур был использован 0,9 % физиологический раствор, и были выбраны следующие единицы: 10, 1 и 0,1 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Данные растворы использовались для оценки эффективности

питательных сред и для экспериментального испытания ИП, чтобы оценить чувствительность методов прямого посева и мембранной фильтрации. Подсчет количества КОЕ проводился в мясепептонном агаре (МПА) для тест-штаммов *C. sporogenes* и *St. aureus* и на Сабура агар для тест-штамма *C. albicans* [2,9].

Методы определения стерильности

Испытание проводили в соответствии с методами, описанными в ГФ РК, т.1 ст. 2.6.1.

ИП, производимые в НИИПББ, тестируются методом прямого посева и методом мембранной фильтрации. Чувствительность двух методов определяется путем искусственного заражения ИП с использованием известных концентраций бактерий. ИП инокулируются 5 мл выросшими микроорганизмами *St. aureus*, *C. albicans* и *C. sporogenes* до конечных концентраций 0,1, 1 и 10 КОЕ/мл. Флаконы встряхивают вручную в течение 1 минуты до полной гомогенизации содержимого. Затем по 10 мл каждой пробы используют для оценки метода прямого посева и метода мембранной фильтрации. Прямой посев проводят, инокулируя 1 мл экспериментально контаминированной вакцины в пять флаконов со средой Сабура и тиогликолевой средой. Метод мембранной фильтрации проводят путем фильтрации 10 мл контаминированной ИП, с помощью вакуумно-насосной системы Steritest™ (Pump System), заранее ИП солюбилизируют в Triton X-100 для улучшения фильтрации. Далее инокулированные питательные среды Сабура и тиогликолевая инкубируются при температурах 20-25 °C и 30-35 °C, соответственно, для обнаружения грибов, дрожжей, аэробных и анаэробных бактерий. Среда инкубируют в течение 14 дней для выявления медленно растущих микроорганизмов, которые могут находиться в латентной стадии или ослаблены из-за экстремальных условий производственного процесса. Все образцы были эффективно отфильтрованы в вакуумно-насосной системе Steritest™ [2].

Оценка эффективности питательных сред

Для оценки качества питательных сред были инокулированы растворы по 0,1, 1 и 10 КОЕ/мл микроорганизмов *St. aureus* и *C. sporogenes* в тиогликолевую среду, а *C. albicans* в среду Сабура. Наблюдение проводилось в течение 14 дней при температурах, указанных в таблице 1. Для проверки концентрации КОЕ микроорганизмов и для подтверждения ростовых свойств питательных сред были использованы те же разведения инокулянтов для посева в Сабура агар и МПА, с дальнейшим инкубированием при 30-35 °C в течение 48 ч. Во всех анализах параллельно использованы отрицательные контроли, т.е. питательные среды инкубированы в тех же условиях, только без инокулята [2].

Таблица 1 – Список тест-штаммов, использованных при оценке прямой инокуляции и мембранной фильтрации

| Наименование штаммов | Идентификатор штамма | Анаэробный/аэробный | Окрашивание по Граму | Температура инкубации (°C) |
|-------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------------|----------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC6538 | аэробный | грамположительные кокки | 30-35 |
| <i>Clostridium sporogenes</i> | ATCC19404 | анаэробный | грамположительные палочки | 30-35 |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC10231 | аэробный | дрожжи | 20-25 |

Окраска по Граму




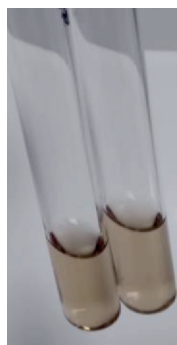
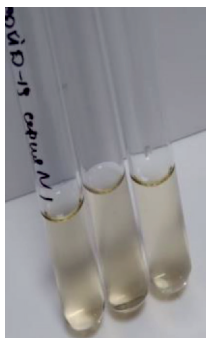

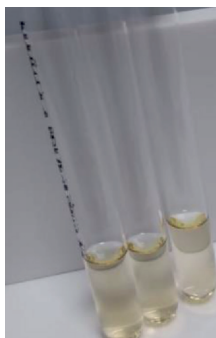

Для идентификации тест-штаммов необходимо нанести на обезжиренное предметное стекло в трех местах три капли воды и готовить три тонких мазка различных видом тест-штамм. По краям располагают контрольные мазки с заведомо известным отношением к окраске по Граму, а в центре мазок исследуемого тест-штамма. Мазки высушивают и фиксируют в пламени спиртовки. Для окрашивания мазков используют генцианвиолент. Мазок окрашивают в течении минуты, положив полоску фильтровальной бумаги пропитанной красителем и водой на стекло, затем бумажку с красителем удаляют, а на препарат наносят раствор Люголя и выдерживают минуту.

Важно четко соблюдать время обесцвечивания, так как при увеличении или уменьшении его продолжительности наблюдается обесцвечивание грамположительных бактерий. Препарат обрабатывают 96% спиртом, не промывая водой в течении 15-20 сек. После промывания водой предметное стекло, на его поверхность кладут полоску фильтровальной бумаги, пропитанной фуксином Пфайфер, смачивая ее водой и далее окрашивая в течении минуты. После удаления фильтровальной бумаги с красителем стекло промывают водой и осушают чистой фильтровальной бумагой, далее на стекло наносят каплю иммерсионной жидкости [10]. Результаты окрашивания по Граму проверяют микроскопированием.

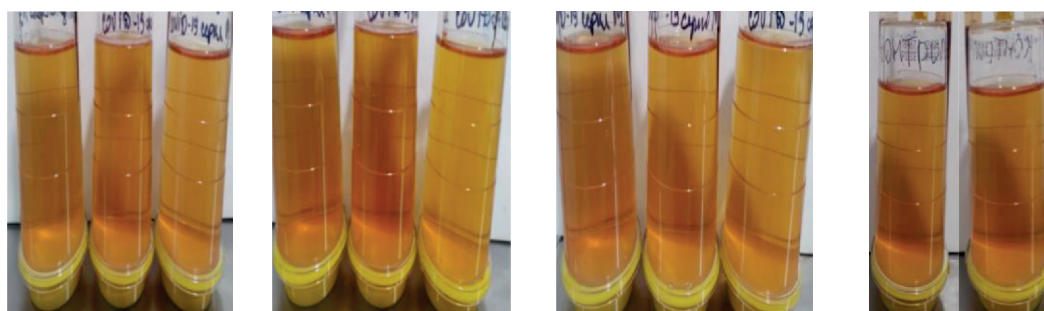
Результаты

В результате определили стерильность испытуемой вакцины QazCovid-in на питательных средах Сабуро и тиогликолевой среде с помощью методов прямого посева и мембранной фильтрации. Результаты испытания стерильности испытуемой вакцины QazCovid-in представлены ниже в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты испытания вакцины QazCovid-in на стерильность

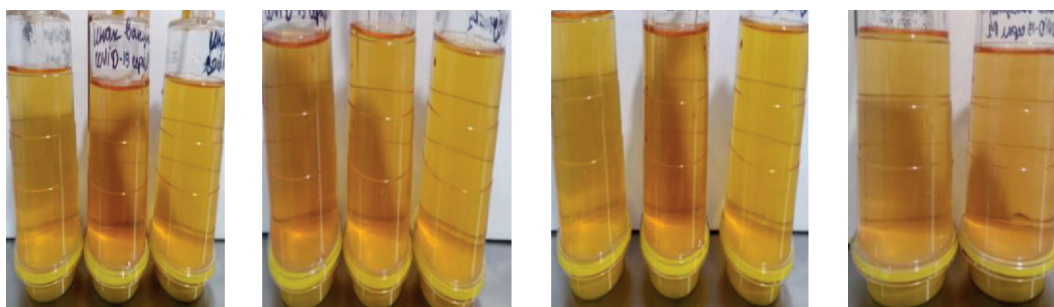
| Методы | Инактивированной вакцины против Covid-19 «QazCovid-in®» | | | Отрицательный контроль |
|---------------------|---|---|--|---|
| | № 0400721 | № 0410721 | № 0420721 | |
| Тиогликолевая среда | | | | |
| |  |  |  |  |
| Сабуро бульон | | | | |
| Прямой посев |  |  |  |  |

Тиогликолевая среда



Сабуро бульон

Мембранная фильтрация



Из результатов, представленных в таблице 2 видно, что все питательные среды, инокулированные вакциной стерильные, так как наблюдается отсутствие каких-либо помутнений и изменений их цвета, которые соответствуют отрицательным контролям.

Далее, для оценки чувствительности двух методов определения стерильности, образцы ИП были экспериментально заражены культурами тест-штаммов *St. aureus*, *C. albicans* и *C. sporogenes* согласно протоколу, описанному выше. Визуальный осмотр проводился каждые два дня. Рост микроорганизмов наблюдался в тиогликолевой среде и среде Сабуро с образованием пленок, осадков, появлением мутности и других микроскопических изменений, результаты анализа на чувствительность (КОЕ/мл) при прямом посеве и мембранной фильтрации представлены ниже в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты (КОЕ/мл) анализов на чувствительность при прямом посеве и мембранной фильтрации

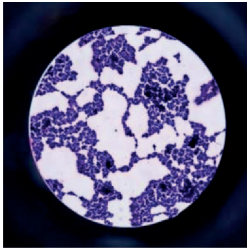
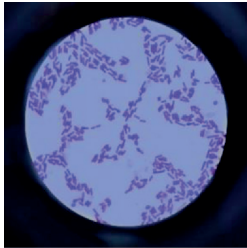
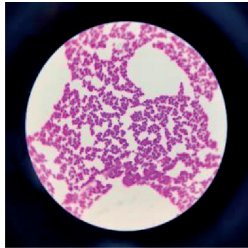
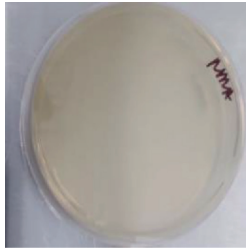
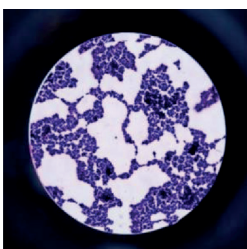
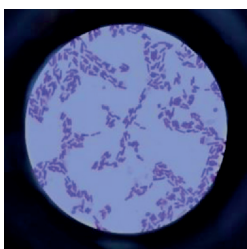
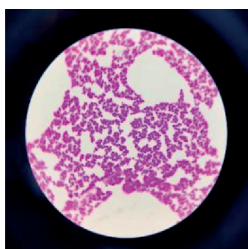
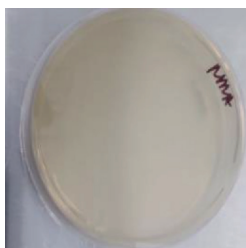
| Методы | Среда | <i>Candida albicans</i> | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | <i>Clostridium sporogenes</i> | | | Инактивированная вакцина «QazCovid-in®» серия | | | Отрицательный контроль |
|-----------------------|------------|-------------------------|-----|-----|------------------------------|-----|-----|-------------------------------|-----|-----|---|---------|---------|------------------------|
| | | 10 | 1 | 0,1 | 10 | 1 | 0,1 | 10 | 1 | 0,1 | 0400721 | 0410721 | 0420721 | |
| Прямой посев | Тиогликоль | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/2 |
| | Сабуро | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/2 |
| Мембранная фильтрация | Тиогликоль | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/2 |
| | Сабуро | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/2 |

В таблице 3 показаны результаты чувствительности двух методов определения стерильности с использованием тест-штаммов испытуемой вакцины и отрицательного контроля. Различные микробные разведения тестировались (в трех повторностях) при

прямом посеве. Повторы одного и того же разведения показали одинаковые результаты (положительный или отрицательный). Методы мембранной фильтрации и прямого посева показали одинаковую чувствительность при обнаружении дрожжей и анаэробных организмов во всех исследуемых концентрациях тест-штаммов (10, 1, 0,1 КОЕ/мл). А для обнаружения аэробных микроорганизмов метод мембранной фильтрации оказался более чувствительным по сравнению с методом прямого посева, доказательством чего являются положительные результаты во всех пробах тест-штаммов при мембранной фильтрации (3/3 во всех концентрациях) и отрицательные при постановке метода прямого посева (в концентрациях 1 и 0,1 КОЕ/мл). При этом отрицательный контроль показал отрицательный результат.

Помутненные среды тест-штаммов, инокулированные с образцами ИП далее были посеяны на твердые среды для их идентификации, результаты испытания представлены ниже в таблице 4.

Таблица 4 – Макро- и микроскопические характеристики тест-штаммов

| Методы | Staphylococcus aureus | Clostridium sporogenes | Candida albicans | Отрицательный контроль |
|-------------|---|---|--|---|
| Колония |  |  |  |  |
| Микроскопия |  |  |  |  |

Полученные результаты из рисунка 4 показали, что рост бактерий в чашках Петри с МПА соответствует типичным для *C. sporogenes* (мелкие и средние плоские колонии с приподнятыми желто-серым центром и уплощенной периферией) бактериям. В то время как в чашках Петри с Сабуро агар для *C. albicans* наблюдались обычные дрожжевые культуры (гладкие, блестящие, бело-желтоватые культуры) и в МПА наблюдался рост бактерии *St. aureus* (круглые с ровными краями, золотистого цвета).

Колонии *C. sporogenes* на МПА имели типичную морфологию и цвет при окрашивании по Граму наблюдались плеоморфные и грамположительные колонии, *C. albicans* на Сабуро агар были крупные, образующие своеобразные пирамиды. А колонии *St. aureus* образовали грамположительные кокки.

Обсуждение

Как и любой другой продукт биологического происхождения, ИП производятся в асептических условиях и проверяются на стерильность на различных этапах производства. Поэтому оценка стерильности, а также асептика процессов, контроль окружающей среды и использование стерильного оборудования и реактивов обеспечивают соответствие

конечного продукта по требованиям ГФ РК [2]. Стерильность подразумевает отсутствие любых жизнеспособных микроорганизмов, способных представить опасность во время, после введения или при использовании продукта [11]. Уровень стерильности 10^{-6} обычно является приемлемым в процессах, принятых в фармацевтической промышленности. То есть, это означает менее одного жизнеспособного микроорганизма в одном миллионе произведенных единиц [12].

В данной статье представлены результаты контроля стерильности инактивированной вакцины против Covid-19 «QazCovid-in[®]», серии №0400721, №0410721, №0420721. Оценка стерильности испытуемых образцов трех серии ИП, показало, что после инкубации питательная среда оставалась чистой как в образцах прямого посева, так и образцах мембранной фильтрации.

Далее с целью имитации контаминации в процессе производства вакцины были инокулированы известными концентрациями микроорганизмов. Оценивали разведение микробных культур в концентрациях 10, 1 и 0,1 КОЕ/мл, как рекомендовано в литературе [13].

Также в данной статье представлены результаты методы мембранной фильтрации и прямого посева показали одинаковую чувствительность при обнаружении дрожжей и анаэробных организмов во всех исследуемых концентрациях тест-штаммов (10, 1, 0,1 КОЕ/мл). Что касается обнаружения аэробных микроорганизмов метод мембранной фильтрации оказалась более чувствительной по сравнению с методом прямого посева, доказательством чего положительные являются результаты во всех пробах тест-штаммов при мембранной фильтрации (3/3 во всех концентрациях) и отрицательные при постановке метода прямого посева (в концентрациях 1 и 0,1 КОЕ/мл). При этом отрицательный контроль показал отрицательный результат. Высокая чувствительность метода мембранной фильтрации объясняется тем, что микроорганизм отделяется от продукта во время инкубации (что не происходит при прямом посеве). В конечном итоге, такая сегрегация позволяет ослабленным патогенам восстанавливаться более эффективно [14].

Из литературных данных известно, что мембранная фильтрация имеет ряд преимуществ перед прямым посевом: уменьшает контаминацию при анализе, так как проводится в закрытом вакуумном насосе [3]; это позволяет анализировать больший объем образцов [15]; снижает вероятность ложноположительных результатов, поскольку из среды удаляется избыток вакцины, что в противном случае привело бы к увеличению мутности, влияющей на результаты [3]. Результаты полученных в данной статье также свидетельствуют аналогичные закономерности в сравнении двух методов определения стерильности.

Таким образом, данная работа показывает, что использование мембранной фильтрации для определения стерильности ИП, используемых для здравоохранения, является наиболее эффективным и точным по сравнению с методом прямого посева.

Заключение

На основе литературных данных, в статье подробно описаны правила и методы по определению стерильности иммунобиологических препаратов. В зависимости от времени и эффективности можно применять методы прямого посева, мембранной фильтрации для определения стерильности ИП.

В целом пригодность методов определения стерильности должны быть оценены для каждого продукта (ИП) с использованием конкретных контрольных микроорганизмов, которые представляют соответствующие экологические изоляты. В заключение следует отметить, что чувствительность метода мембранной фильтрации аналогична чувствительности метода прямого посева при выявлении грибов, дрожжей и анаэробных бактерий в ИП, хотя он более чувствителен для выявления аэробных микроорганизмов. В этом смысле

метод мембранной фильтрации является наиболее подходящим для определения стерильности ИП, определяя как грибковые, анаэробные, так и аэробные микроорганизмы.

Финансирование: Работа выполнена в рамках программы целевого финансирования, код №О.0927, регистрационный номер 67419/ПЦФ-МОН РК-ОТ-21 Комитетом науки Министерства науки и высшего образования и Республики Казахстан.

Благодарности: Авторы выражают благодарность лаборатории «Коллекция микроорганизмов» НИИПББ МЗ РК за предоставленные тест-штаммы АТСС и для проведения данного исследования, и лабораторию «Микробиологии» за совместное участие.

Конфликт интересов: Авторы не имеют потенциального конфликта интересов.










Литература

- 1 Суханова С.М., Бердникова З.Е., Захарова Н.Е., Меркулов В.А. Испытание на стерильность иммунобиологических лекарственных препаратов в России. История вопроса и современные требования // Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Вып. 18 (часть 1). – С.5-15. <http://doi:10.30895/2221-996X-2018-18-1-5-15>
- 2 Государственная Фармакопеи Республики Казахстан. I изданной в 2008 г. – С.165-172.
- 3 Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств [Электрон. ресурс]. URL: <http://www.gmpua.com/QC/Sterilitytesting>
- 4 Edward C.T., James P.A., Radha T. Sterility Assurance-Current and Future State // J. Pharm. Sci. Technol. – 2022. – Vol. 76:3. – P. 263-277. <http://doi:10.5731/pdajpst.2020.012526>
- 5 Производство стерильных лекарственных средств. Приложение №1 к Правилам надлежащей производственной практики (GMP) Евразийского экономического союза [Электрон. ресурс]. <https://pharmacopoeia.ru/pravila-nadlezhashhej-proizvodstvennoj-praktiki-evrazijskogo-ekonomicheskogo-soyuza>
- 6 Winkler D., Lukaszewicz V. Long-term analysis of sterility testing of immunobiological preparations // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. – 1989. – Vol. 33:3. – P.317-322.
- 7 Parveen S., Kaur S., Wilson S.A., Kenney J.L., William M.M., Gupta R.K. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products // Vaccine. – 2011. – Vol.29:45. – P.2012-23. <http://doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.055>
- 8 England M.R., Stock F., Gebo J.E., Frank K.M., Lau A.F. Comprehensive Evaluation of Compendial USP <71>, BacT/Alert Dual-T, and Bactec FX for Detection of Product Sterility Testing Contaminants // J.Clin.Microbiol. – 2019. – Vol. 57:2. – P.1548-18. <http://doi:10.1128/JCM.01548-18>
- 9 Shiota T. Microbiology // J.Am. Dent. Assoc. – 1956. – Vol. 52:4. – P. 409-11. <http://doi:10.14219/jada.archive.1956.007>
- 10 Moyes R.B., Reynolds J., Breakwell D.P. Differential staining of bacteria: gram stain // J.Curr. Protoc. Microbiol. – 2009. – Vol. 3:3. – 3 p. <http://doi:10.1002/9780471729259.mca03cs15>
- 11 Sanders E.R. Aseptic laboratory techniques: plating methods // J. Vis. Exp. – 2012. – Vol. 11:63. – P. 3064. <http://doi:10.3791/3064>
- 12 Cortés A., Sandino C., Arias J. Validación de la prueba de esterilidad para vacunas virales en vehículos oleoso y acuoso // Revista de la facultad de farmacia. – 2003. – Vol. 45:1. – P.55-59.
- 13 Mukherjee S., Sukdev M., Mahto R., Basu D., Javed R., Goel G., Bhattacharya S., Basu S., Chandy M. Importance and results of sterility testing of various products in a microbiology laboratory of eastern India // J. Me. Microbiol. – 2022. – Vol. 40:1. – P. 138-140. <http://doi:10.1016/j.ijmmb.2021.10.008>
- 14 Woedtke T., Крамер A. Limits of sterility guarantee // GMS Krankenhhyg Interdiszip. – 2008. – Vol. 3:3. – 19 p.
- 15 Seema P., Simleen K., Selwyn A., James L., William M., Rajesh K. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products // J.Vac. – 2011. – Vol. 29:45. – P. 8012-8023. 055 <http://doi:10.14219/jada.archive.1956.0070>

References

- 1 Suhanova S.M., Berdnikova Z.E., Zaharova N.E., Merkulov V.A. Ispytanie na steril'nost' immunobiologicheskikh lekarstvennykh preparatov v Rossii. Istoriya voprosa i sovremennye trebovaniya // Profilaktika, diagnostika, lechenie. – 2018. – Vyp.18 (chast' 1). – S. 5-15. <http://doi:10.30895/2221-996H-2018-18-1-5-15>
- 2 Gosudarstvennaya Farmakopei Respubliki Kazakhstan. I izdannoj v 2008 g. – S. 165-172.
- 3 Mikrobiologicheskij kontrol' steril'nosti lekarstvennykh sredstv [Elektron. resurs]. URL: <http://www.gmpua.com/QC/Sterilitytesting>
- 4 Edward C.T., James P.A., Radha T. Sterility Assurance-Current and Future State // J. Pharm. Sci. Technol. – 2022. – Vol.76:3. – P. 263-277. <http://doi:10.5731/pdajpst.2020.012526>
- 5 Proizvodstvo steril'nykh lekarstvennykh sredstv. Prilozhenie N 1 k Pravilam nadležhashchej proizvodstvennoj praktiki (GMP) Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza [Elektron. resurs]. <https://pharmacopoeia.ru/pravila-nadlezhashhej-proizvodstvennoj-praktiki-evrazijskogo-ekonomicheskogo-soyuz>
- 6 Winkler D., Lukaszewicz V. Long-term analysis of sterility testing of immunobiological preparations // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. – 1989. – Vol. 33:3. – P.317-322.
- 7 Parveen S., Kaur S., Wilson S.A., Kenney J.L., William M.M., Gupta R.K. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products // Vaccine. – 2011. – Vol. 29:45. – P. 2012-23. <http://doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.055>
- 8 England M.R., Stock F., Gebo J.E., Frank K.M., Lau A.F. Comprehensive Evaluation of Compendial USP <71>, BacT/Alert Dual-T, and Bactec FX for Detection of Product Sterility Testing Contaminants // J.Clin.Microbiol. – 2019. – Vol. 57:2. – P.1548-18. <http://doi:10.1128/JCM.01548-18>
- 9 Shiota T. Microbiology // J.Am. Dent. Assoc. – 1956. – Vol.52:4. – P. 409-11. <http://doi:10.14219/jada.archive.1956.007>
- 10 Moyes R.B., Reynolds J., Breakwell D.P. Differential staining of bacteria: gram stain // J.Curr. Protoc. Microbiol. – 2009. – Vol. 3:3. – 3 p. <http://doi:10.1002/9780471729259.mca03cs15>
- 11 Sanders E.R. Aseptic laboratory techniques: plating methods // J. Vis. Exp. – 2012. – Vol.11:63. – P. 3064. <http://doi:10.3791/3064>
- 12 Cortés A., Sandino C., Arias J. Validación de la prueba de esterilidad para vacunas virales en vehículos oleoso y acuoso // Revista de la facultad de farmacia. – 2003. – Vol. 45:1. – P.55-59.
- 13 Mukherjee S., Sukdev M., Mahto R., Basu D., Javed R., Goel G., Bhattacharya S., Basu S., Chandy M. Importance and results of sterility testing of various products in a microbiology laboratory of eastern India // J. Me. Microbiol. – 2022. – Vol. 40:1. – P. 138-140. <http://doi:10.1016/j.ijmmb.2021.10.008>
- 14 Woedtke T., Kpamep A. Limits of sterility guarantee // GMS Krankenhhyg Interdiszip. – 2008. – Vol. 3:3. – 19 p.
- 15 Seema P., Simleen K., Selwyn A., James L., William M., Rajesh K. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products // J. Vac. – 2011. – Vol. 29:45. – P. 8012-8023. 055 <http://doi:10.14219/jada.archive.1956.0070>

ИММУНОБИОЛОГИЯЛЫҚ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ СТЕРИЛЬДІЛІГІН АНЫҚТАУДЫҢ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ ӘДІСТЕРІН БАҒАЛАУ







С.У. Молдагулова , Э.Ж. Калимолда , С.О. Садикалиева ,
Г.Б. Токкарина , Е.П. Воронина , Б.А. Еспембетов , А.С. Нурпейсова ,
М.М. Касенов , К.А. Шораева 

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, Гвардейск құқ
sabina_moldagulova@mail.ru

Аннотация: иммунобиологиялық препараттардың биологиялық қауіпсіздігінің негізгі критерийлерінің бірі – олардың стерильділігі. Бұл мақалада тікелей себу мен мембраналық сүзудің екі әдісін бағалау нәтижелері келтірілген. Сондай-ақ, Covid-19-ға қарсы инактивтелген вакцинаның «QazCovid-in®», № 0400721, № 0410721, №0420721 сериялы стерильділігін бақылау нәтижелері ұсынылды. Вакцинаның үш сериясының үлгілірі инкубациядан кейін қоректік орталарда тікелей себу әдісінде және мембраналық фильтрация әдісінде таза болғаны көрсетілген, сонымен қатар алынған зерттеу деректері Қазақстан Республикасының Мемлекеттік Фармакопеясына сәйкес болып табылды. Стерильділікті анықтаудың екі әдісінің сезімталдығын бағалау үшін иммунобиологиялық препараттардың үлгілері эксперименталды түрде *St. aureus*, *C. albicans* және *C. sporogenes* сынақ штаммыдарымен ластандырылған. Нәтижесінде, мембраналық сүзу және тікелей себу әдістері ашытқылар мен анаэробты организмдерді сынақ штаммдарының барлық зерттелетін концентрацияларында (10, 1, 0,1 CFU/мл) анықтаған кезде бірдей сезімталдықты көрсетті. Ал аэробты микроорганизмдерді анықтау үшін мембраналық сүзу әдісі мен тікелей себу әдісінен салыстырғанда анағұрлым сезімтал болып шықты, мұның дәлелі мембраналық сүзу кезіндегі сынақ штаммдарының барлық сынамаларында (барлық концентрацияларында 3/3) және тікелей себу әдісін қою кезінде теріс (1 және 0,1 КОЭ/мл концентрацияларда) нәтижелер болып табылады. Осылайша, осы зерттеудің мақсаты иммунобиологиялық препараттардың стерильділігін анықтау үшін қолданылатын осы екі әдісті бағалау болды: тікелей себу және мембраналық сүзу.

Түйінді сөздер: иммунобиологиялық препарат; стерильділік; тікелей себу әдісі; мембраналық фильтрация әдісі; ластану

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF WATER QUALITY FOR THE PRODUCTION OF BIOLOGICAL PRODUCTS

S.U. Moldagulova , E.Zh. Kalimolda , S.O. Sadikaliyeva ,
G.B. Tokkarina , E.P. Voronina , B.A. Espembetov , A.S. Nurpeisova ,
M.M. Kasenov , K.A. Shorayeva 

Scientific Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeysky
sabina_moldagulova@mail.ru

Abstract: one of the main criteria for the biological safety of immunobiological preparations is their sterility. This article presents the results of the evaluation of two methods of direct seeding and membrane filtration. The results of sterility control of the inactivated vaccine

against Covid-19 «QazCovid-in®», series № 0400721, № 0410721, № 0420721 are also presented. Evaluation of the sterility of the tested samples of the three vaccine series showed that after incubation, the nutrient medium remained clean both in direct seeding samples and membrane filtration samples, as well as accounting and evaluation of the obtained research data in accordance with the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. To assess the sensitivity of two methods for determining sterility, samples of immunobiological preparations were experimentally infected with cultures of test strains of *St. aureus*, *C. albicans* and *C. sporogenes*. As a result, the methods of membrane filtration and direct seeding showed the same sensitivity when detecting yeast and anaerobic organisms in all studied concentrations of test strains (10, 1, 0.1 CFU/ml). And for the detection of aerobic microorganisms, the membrane filtration method turned out to be more sensitive compared to the direct seeding method, which is proved by positive results in all samples of test strains with membrane filtration (3/3 in all concentrations) and negative results when setting the direct seeding method (in concentrations of 1 and 0.1 CFU/ml). Thus, the purpose of this study was to evaluate these two methods used to determine the sterility of immunobiological preparations using two methods: direct seeding and membrane filtration.

Keywords: immunobiological preparation; sterility; direct seeding method; membrane filtration method, contamination