



М.В. Рощина 
Н.Г. Сахно 
О.В. Гунар  

Контроль стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов: влияние питательной среды, времени анализа и количества образца

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

✉ Гунар Ольга Викторовна; gunar@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Контроль стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов (ВТЛП) осложнен рядом факторов, в том числе: ограничением объема доступной пробы, чувствительностью препаратов к условиям тестирования, ограничением срока хранения препаратов. Контроль классическими фармакопейными методами зачастую не позволяет своевременно и достоверно подтвердить стерильность ВТЛП, что снижает доступность препаратов для пациентов и возможность быстрого проведения необходимой терапии. Повысить скорость и эффективность проведения контроля стерильности можно путем разработки альтернативных ускоренных микробиологических методик, учитывающих специфику ВТЛП.

ЦЕЛЬ. Оптимизация методики контроля стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов методом колориметрического определения углекислого газа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объект исследования — образец высокотехнологичного лекарственного генотерапевтического препарата. Используемые тест-штампы: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) NCTC 737, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* ВКПМ F-62, *Aspergillus terreus* ВКПМ F-1269, *Penicillium chrysogenum* ВКПМ F-3. Питательные среды: SA, SN и iLYM для прибора BacT/ALERT 3D Dual T — флаконы с модифицированными средами на основе триптиказо-соевого бульона; триптиказо-соевый бульон (TSB) и жидкая тиогликолевая среда (FTM) — пробирки с фармакопейными питательными средами, предусмотренными для проведения испытания по показателю «Стерильность» методом прямого посева. Оборудование: ламинарный шкаф Purifier Logic A2, система BacT/ALERT 3D Dual T с автоматическим мониторингом и детекцией контаминированных флаконов и построением кривых роста микроорганизмов. Контаминированные образцы ВТЛП готовили с теоретической концентрацией тест-штаммов 3 КОЕ/мл. Посев осуществляли в объемах 0,1; 0,5 и 1,0 мл в двадцатикратной повторности в пробирки и флаконы с соответствующими питательными средами. Использовали как фармакопейные среды (TSB, FTM), так и модифицированные, предназначенные для системы BacT/ALERT (SA, SN, iLYM). Инкубацию при прямом посеве проводили в течение 14 сут; анализ в системе BacT/ALERT длился 7 сут при непрерывном автоматическом мониторинге при температурах 32,5±2,5 и 22,5±2,5 °C для бактерий и грибов соответственно. Результаты учитывали визуально (прямой посев) и по кривым роста содержания CO₂ (альтернативный метод).

РЕЗУЛЬТАТЫ. В ходе исследования установлено, что чувствительность BacT/ALERT 3D Dual T при анализе проб объемом 0,5 мл составила ≥80% для аэробных и анаэробных бактерий, а также ≥90% для дрожжевых и плесневых грибов при использовании модифицированной среды iLYM с предварительной

аэрацией. В условиях прямого посева тот же уровень выявления требовал не менее 1,0 мл пробы. Сроки выявления контаминации с использованием ВаСТ/ALERT были на 0,38–2,4 сут меньше, чем при фармакопейной методике прямого посева, при сохранении полноты обнаружения всех тест-штаммов, за исключением *Candida albicans*, время детектирования которого одинаково при использовании обеих методик. Частота получения ложноотрицательных результатов при выявлении плесневых грибов на среде SA достигала 13–70% в зависимости от штамма. Введение этапа кратковременной аэрации (5–7 с) при использовании среды iLYM снижало частоту ложноотрицательных результатов до 0–3%. Все тестируемые микроорганизмы, кроме *Cutibacterium acnes*, были полностью детектированы в течение ≤ 28 ч; для *C. acnes* время инкубации составило около 134 ч.

ВЫВОДЫ. Альтернативный метод ВаСТ/ALERT 3D Dual T превосходит традиционную фармакопейную методику по чувствительности, воспроизводимости и скорости анализа. Ложноотрицательные результаты при выявлении плесневых грибов на среде SA достигали 70%, но показана возможность их практически полного устранения при использовании аэрированной среды iLYM. Полный спектр тест-микроорганизмов достоверно выявляется за 7 сут обеими методиками, при этом время обнаружения контаминации с использованием альтернативной методики снижается на 0,38–2,4 сут. Объем пробы 0,5 мл в системе ВаСТ/ALERT обеспечивает эффективное выявление контаминантов, что вдвое снижает расход ВТЛП по сравнению с фармакопейным методом (1,0 мл).

Ключевые слова: высокотехнологичные лекарственные препараты; контроль стерильности; альтернативные микробиологические методы; ВаСТ/ALERT

Для цитирования: Рощина М.В., Сахно Н.Г., Гунар О.В. Контроль стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов: влияние питательной среды, времени анализа и количества образца. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):583–594. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-583-594>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200093-9).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Marina V. Roshchina 
Nadezhda G. Sakhno 
Olga V. Gunar  

Sterility Control of Advanced Therapy Medicinal Products: Impact of Growth Medium, Analysis Time, and Sample Quantity

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

✉ **Olga V. Gunar;** gunar@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Sterility testing of advanced therapy medicinal products (ATMP) implies several challenges, including limited volume of available sample, product sensitivity to test conditions, and short shelf life. Classical pharmacopoeial test methods often fail to confirm sterility in a timely and reliable manner. The resulting drug availability for patients is reduced, as well as the opportunity for fast treatment with high-quality medicines. Faster alternative microbiological methods that reflect ATMP specificity of advanced therapy medicinal products can speed up and enhance sterility control.

AIM. This study aimed to optimise ATMP sterility control using colorimetric carbon dioxide detection.

MATERIALS AND METHODS. We used an experimental sample of an ATMP as the test object. We challenged the system with the following test strains: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium*

acnes) NCTC 737, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* VKPM F-62, *Aspergillus terreus* VKPM F-1269, *Penicillium chrysogenum* VKPM F-3. We used SA, SN, and iLYM bottles with pharmacopoeial growth media: modified tryptic soy broth for the BacT/ALERT 3D Dual T system, tryptic soy broth, and fluid thioglycollate medium in test tubes designed for sterility testing using direct inoculation. All manipulations took place in a Purifier Logic A2 laminar flow cabinet, with BacT/ALERT 3D Dual T system to automatically monitor cultures, detect contamination, and record microbial growth curves. We prepared artificially contaminated samples by adding 3 CFU/mL of each test strain. We inoculated 0.1, 0.5, and 1.0 mL sample volumes into appropriate media, performing 20 replicates for each condition. Growth media included both pharmacopoeial (tryptic soy broth, fluid thioglycollate) ones and modified media for BacT/ALERT (SA, SN, iLYM). We incubated the direct inoculation samples for 14 days. In the BacT/ALERT system, we ran a 7-day incubation with continuous monitoring at 32.5 ± 2.5 °C for bacteria and 22.5 ± 2.5 °C for fungi. We evaluated direct inoculation results visually and assessed BacT/ALERT results based on CO₂ growth curves (alternative method).

RESULTS. The BacT/ALERT 3D Dual T system detected $\geq 80\%$ of aerobic and anaerobic bacteria and $\geq 90\%$ of yeasts and molds at 0.5 mL sample volume using pre-aerated iLYM medium. In contrast, direct inoculation required 1.0 mL to reach similar detection levels. BacT/ALERT reduced the time to contamination detection by 0.38–2.4 days compared to direct inoculation, while identifying all test strains except *Candida albicans* that showed similar detectability in both methods. When using SA medium, false-negative results for molds made 13–70 % of cases, depending on the strain. Short-time iLYM aerating for 5–7 s before incubation reduced false negatives to 0–3 %. We successfully detected all tested microorganisms within 28 h, except for *Cutibacterium acnes*, which required up to 134 h.

CONCLUSIONS. The BacT/ALERT 3D Dual T system delivers higher sensitivity, reproducibility, and faster detection compared to traditional pharmacopoeial methods. False negative results for mold fungi in SA medium were as high as 70%. However, they can be significantly reduced using aerated iLYM medium. Both methods reliably detect all test organisms within 7 days, but alternative BacT/ALERT achieves detection 0.38–2.4 days sooner. Using a 0.5 mL sample volume with BacT/ALERT effectively detects contamination and reduces product use by half compared to pharmacopoeial testing (1.0 mL).

Keywords: advanced therapy medicinal products; ATMP; sterility testing; alternative microbiological methods; BacT/ALERT

For citation: Roshchina M.V., Sakhno N.G., Gunar O.V. Sterility control of advanced therapy medicinal products: Impact of growth medium, analysis time, and sample quantity. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):583–594. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-583-594>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of State Assignment No. 056-00001-25-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D Registry No. 124022200093-9).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка высокотехнологичных лекарственных препаратов (ВТЛП) сопряжена с применением сложных биоинженерных платформ, включая гены и клеточные системы, моноклональные антитела, использование РНК-интерференционных подходов, рекомбинантные технологии и нанотехнологии, что принципиально отличает данный класс препаратов от традиционных лекарственных препаратов [1].

ВТЛП характеризуются выраженной биологической активностью, имеют сложную структуру, как правило, неустойчивы к физико-химическим

воздействиям. Эти особенности определяют повышенные требования к качеству ВТЛП. Одним из критически значимых параметров является их стерильность, поскольку наличие даже единичных микроорганизмов может повлечь тяжелые последствия для пациента, особенно в условиях парентерального введения, иммуносупрессии или иммунодефицита — состояниях, при которых часто используются ВТЛП [2].

Контроль стерильности ВТЛП может быть сопряжен с рядом методологических трудностей. Компоненты препаратов (стабилизаторы, антибиотики, сурфактанты, консерванты

и другие вспомогательные вещества) могут проявлять выраженное ингибирующее действие на рост микроорганизмов, детектируемых стандартными методиками контроля стерильности, что приводит к получению ложноотрицательных результатов и снижению достоверности контроля [3]. При использовании метода мембранной фильтрации возможна закупорка пор мембран и нарушение фильтрации в целом из-за высокой вязкости препарата, пенообразования, наличия белковых агрегатов. Кроме того, ВТЛП могут быть контаминированы специфическими микроорганизмами, что вызовет необходимость коррекции условий инкубации.

Состав ВТЛП (живые клетки, рекомбинантные белки, генно-инженерные конструкции и другие потенциально нестабильные компоненты) определяет ограничение срока их хранения¹. Это, в свою очередь, требует сокращения времени проведения обязательных испытаний качества, в том числе подтверждения стерильности. Однако классическая фармакопейная методика, основанная на фиксации роста микроорганизмов, предусматривает инкубацию образцов не менее 14 сут [4], что делает невозможным быстрое принятие решений о выпуске серии и требует совершенствования подходов.

ВТЛП могут использоваться в рамках персонализированной терапии как препараты, предназначенные для индивидуального применения, в малых объемах [5]. Это означает, что количество доступного для испытаний материала строго ограничено, а потеря даже небольшого объема может критично сказаться на обеспечении пациента необходимой терапией².

Одним из возможных решений описанных проблем является разработка альтернативных микробиологических методов, учитывающих специфику ВТЛП, позволяющих сократить сроки анализа по показателю «Стерильность», снизить необходимый объем исследуемой пробы и при этом сохранить высокую чувствительность и надежность микробиологического контроля³.

Цель работы — оптимизация методики контроля стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов методом колориметрического определения углекислого газа.

Задачами исследования являются:

- анализ данных научной литературы, фармакопейной и нормативной документации для оценки перспективности применения альтернативного микробиологического метода колориметрического определения углекислого газа в питательной среде для контроля стерильности ВТЛП;
- сравнительный анализ питательных сред и оценка вероятности возникновения ложноотрицательных результатов, с особым вниманием к возможности выявления контаминации ВТЛП плесневыми грибами;
- определение сроков инкубации, необходимых для обнаружения микробной контаминации ВТЛП;
- определение минимального объема образца, достаточного для достоверной детекции контаминантов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В качестве объекта исследования был использован экспериментальный образец генотерапевтического ВТЛП. Тест-штаммы микроорганизмов и условия инкубации приведены в таблице 1.

Питательные среды:

- SA, SN и iLYM (bioMerieux SA, Франция, кат. № 259789; 259790; 259788) — флаконы с модифицированными средами на основе триптиказо-соевого бульона для прибора BacT/ALERT 3D Dual T (bioMerieux SA, Франция);
- триптиказо-соевый бульон (Tryptic Soy Broth, TSB, bioMerieux SA, Франция, кат. № 42100) и жидкая тиогликолевая среда (Fluid Thioglycollate Medium, FTM, bioMerieux SA, Франция, кат. № 42018) — пробирки с фармакопейными питательными средами, предусмотренными для проведения испытания по показателю «Стерильность» методом прямого посева⁴.

Методы. В соответствии с требованиями Европейской фармакопеи и Фармакопеи США⁵ при контроле стерильности ВТЛП наряду с классическими методами — прямым посевом и мембранной фильтрацией — допускается применение альтернативных методик, включая автоматизированные системы, обеспечивающие

¹ 2.6.27. Microbiological examination of cell-based preparations. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

² Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

³ 2.6.27. Microbiological examination of cell-based preparations. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

⁴ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁵ 2.6.27. Microbiological examination of cell-based preparations. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021. <1046> Cell-based advanced therapies and tissue-based products. United State Pharmacopoeia. 47–NF42. 2024.

Таблица 1. Условия методик контроля стерильности образцов

Table 1. Test conditions of sample sterility

Название микроорганизма, номер штамма <i>Microorganism, strain number</i>	Питательные среды <i>Nutrient media</i>	Температура инкубации, °C <i>Incubation temperature, °C</i>
Аэробные бактерии <i>Aerobic bacteria</i>		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	SA, FTM	32,5±2,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		
Анаэробные бактерии <i>Anaerobic bacteria</i>		
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	SN, FTM	32,5±2,5
<i>Cutibacterium acnes</i> (<i>Propionibacterium acnes</i>) NCTC 737		
Дрожжевые грибы <i>Yeast</i>		
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	iLYM, TSB	22,5±2,5
Плесневые грибы <i>Mold</i>		
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	iLYM, SA, TSB	22,5±2,5
<i>Aspergillus fumigatus</i> ВКПМ F-62		
<i>Aspergillus terreus</i> ВКПМ F-1269		
<i>Penicillium chrysogenum</i> ВКПМ F-3		

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

эквивалентную чувствительность и воспроизводимость. В настоящее время не существует универсального альтернативного подхода к оценке стерильности лекарственных средств, что обуславливает необходимость подбора альтернативного микробиологического метода с учетом специфики каждого анализируемого препарата⁶. При выборе метода учитывают физико-химические свойства исследуемого образца, возможность фильтрации, наличие антимикробного действия, а также другие свойства препарата, способные повлиять на достоверность и воспроизводимость результатов.

Проведена сравнительная оценка методов, применимых для контроля стерильности ВТЛП: классического фармакопейного метода прямого посева и альтернативной методики, основанной на колориметрическом определении углекислого газа (CO₂), продуцируемого в процессе микробного метаболизма [6].

Культуры микроорганизмов, инкубированные в течение 24 ч на скошенных агаризованных питательных средах, смывали стерильным 0,9% раствором натрия хлорида. Полученные

суспензии стандартизировали с использованием международного стандарта мутности ВОЗ 10 МЕ. В работе использовали суспензии конидий плесневых грибов и спор *Bacillus subtilis* с заранее установленной концентрацией клеток.

Путем последовательных разведений получали взвеси тест-штаммов с теоретической концентрацией 30 КОЕ/мл. Фактическое содержание клеток в суспензии подтверждали путем поверхностного посева на соответствующие агаризованные питательные среды (триптиказо-соевый агар и агар Сабуро с декстрозой и хлорамфениколом, HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия, кат. № M290-500G, M1067-500G). Отклонение фактического значения от теоретического составляло не более 8,3%.

При подтверждении оптимального количества ВТЛП и времени инкубации посевов для анализа стерильности в асептических условиях ламинарного шкафа Purifier Logic A2 (Labconco, США) в пробирки и флаконы с подходящими питательными средами вносили в двадцатикратной повторности по 0,1; 0,5 и 1,0 мл контаминированных тест-штаммами образцов ВТЛП, при этом концентрация клеток составляла ~3 КОЕ/мл.

⁶ 5.1.6. Alternative methods for control of microbiological quality. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021. <1223> Validation of alternative microbiological methods. United State Pharmacopeia. 47–NF42. 2024.

На данном этапе исследования использовали 5 видов аэробных и анаэробных бактерий (*B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. sporogenes*, *C. acnes*) и 2 вида дрожжевых и плесневых грибов (*C. albicans*, *A. brasiliensis*). Пробирки инкубировали в термостатах в течение 14 сут. Инокулированные флаконы помещали в инкубационный модуль прибора BacT/ALERT 3D Dual T и культивировали 7 сут. Наблюдение и учет результатов проводили ежедневно, просматривая пробирки в проходящем свете. При наличии помутнения питательной среды, образования пленки или появлении осадка фиксировали наличие роста микроорганизмов. Автоматический мониторинг с детекцией контаминированных флаконов и построением кривых роста микроорганизмов проводили с использованием системы BacT/ALERT 3D Dual T.

Правильность методики оценивали как долю обнаружения контаминированных образцов (К, %), выраженную в виде отношения числа положительных проб к истинному (фактическому) количеству инокулированных образцов. Правильность методики считали приемлемой, если доля обнаружения контаминированных образцов составляла не менее 70% от установленного фактического значения⁷.

Оценка и интерпретация ключевых валидационных характеристик методики, включая предел обнаружения (LOD_{50}), правильность и прецизионность, отражающих возможность детектировать микроорганизмы с уровнем чувствительности и воспроизводимости, не уступающим фармакопейному методу прямого посева, были описаны ранее [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Применимость метода контроля стерильности лекарственных препаратов путем колориметрического определения CO_2 . Альтернативный метод определения стерильности представляет собой микробиологическую методику, предназначенную для выявления контаминантной микрофлоры в различных типах лекарственных препаратов, отличающуюся от классического фармакопейного подхода по ряду технологических и методологических параметров — включая способ проведения анализа, тип применяемого оборудования, используемые питательные среды, а также продолжительность исследования [7].

Такие методики разрабатываются с целью повышения чувствительности, специфичности, воспроизводимости и оперативности получения аналитических данных по сравнению с традиционными фармакопейными методами [7, 8]. В ряде случаев альтернативные методики реализуются в автоматизированных форматах, что обеспечивает регистрацию, обработку и предоставление результатов в виде стандартизированного отчета по проведенному исследованию.

В 2000 г. Американской ассоциацией по парентеральным лекарственным средствам (Parenteral Drug Association, PDA) был выпущен первый официальный документ, регламентирующий принципы оценки, валидации и внедрения альтернативных микробиологических методик⁸. В 2006 г. Центром по оценке и исследованию биологических препаратов (Center for Drug Evaluation and Research, CDER) Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) была опубликована статья, посвященная применению ускоренных микробиологических методов, в которой авторы продемонстрировали преимущества новых подходов по сравнению с фармакопейными — в первую очередь по скорости получения результата и точности при контроле качества лекарственных средств [9].

В Европейской фармакопее⁹ все альтернативные микробиологические методики разделены на 3 типа:

- основанные на росте клетки (позволяют обнаружить жизнеспособные микроорганизмы после короткого инкубационного периода в жидких или на плотных модифицированных питательных средах);
- прямого определения/подсчета (позволяют обнаружить жизнеспособные клетки без культивирования микроорганизмов);
- компонентный анализ клетки (например, амплификация ДНК или РНК с помощью полимеразной цепной реакции).

Некоторые альтернативные методики сочетают фармакопейные и альтернативные подходы к анализу стерильности.

Близкой к традиционным методам испытания является методика, основанная на способности микроорганизмов к росту с выделением CO_2 и возможности его обнаружения в среде

⁷ ОФС.1.1.0021.18 Валидация микробиологических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁸ Validation of growth-based rapid microbiological methods for sterility testing of cellular and gene therapy products. Guidance for industry. FDA, CDER; 2008.

⁹ 5.1.6. Alternative methods for control of microbiological quality. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

культивирования. Одним из ключевых достоинств этой методики является высокая чувствительность, что позволяет фиксировать минимальные концентрации CO_2 , выделяемого на ранних стадиях роста микроорганизмов. В отличие от фармакопейного метода, предполагающего визуальную оценку прозрачности среды, колориметрическая методика основана на регистрации изменений pH питательной среды вследствие растворения образовавшегося CO_2 , что сопровождается изменением цвета встроенного во флакон индикатора.

В результате метаболической активности аэробные и анаэробные микроорганизмы, включая дрожжевые и плесневые грибы, при инкубации в соответствующих жидких питательных средах выделяют CO_2 . Кумулятивная концентрация CO_2 и изменение кислотности среды в герметично закрытых инкубационных флаконах коррелирует с уровнем микробной контаминации и может быть детектирована с использованием специализированных сенсорных систем [6]. Непрерывный автоматизированный мониторинг (с интервалом измерений около 10–15 мин) и автоматизация построения кривых роста микроорганизмов позволяют исключить влияние человеческого фактора. Еще одним важным преимуществом является существенное сокращение времени анализа — при использовании колориметрических систем регистрация сигнала возможна уже через 24–120 ч в зависимости от вида оборудования и типа микроорганизмов, в то время как фармакопейные методы требуют инкубации продолжительностью до 14 сут¹⁰.

Данный принцип реализован, в частности, в автоматизированной системе микробиологического контроля BacT/ALERT 3D Dual T (bioMérieux SA, Франция), позволяющей проводить непрерывный мониторинг роста микроорганизмов по уровню продуцируемого CO_2 . BacT/ALERT 3D Dual T представляет собой высокотехнологичную платформу, обеспечивающую инкубацию флаконов с тестируемыми образцами в специализированных модулях с одновременным их покачиванием, что способствует оптимизации условий для микробного роста. Одновременно осуществляется непрерывный мониторинг оптических изменений, регистрируемых цветопеременными сенсорами, отражающими метаболическую активность микроорганизмов.

Анализатор характеризуется высокой пропускной способностью: до 240 флаконов могут инкубироваться и анализироваться параллельно в автоматическом режиме. На территории Российской Федерации и в других странах данный прибор широко используется для контроля стерильности гемопрепаратов, а также других стерильных биологических жидкостей, включая ликвор, лимфу и синовиальную жидкость [10]. Результаты многих исследований подтверждают, что система позволяет выявить присутствие в том числе и медленно растущих микроорганизмов в течение сравнительно короткого периода времени — от 24 до 72 ч [11]. В соответствии с требованиями Европейской фармакопеи инкубация флаконов с отсутствием признаков роста продолжается вплоть до 7 сут¹¹, что обеспечивает необходимую чувствительность и соответствие нормативным стандартам.

В 2010 г. исследовательская группа под руководством С. Mastronardi выполнила комплексную валидационную оценку функциональных характеристик системы BacT/ALERT, в ходе которой было установлено, что все целенаправленно внесенные в образцы аэробные и анаэробные микроорганизмы были обнаружены в течение 28 ч, за исключением *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*), инкубация которых до момента выявления составила около 134 ч [12]. Авторами данной работы ранее было проведено валидационное исследование, подтвердившее применимость альтернативной методики, реализованной в системе BacT/ALERT 3D Dual T, для анализа стерильности различных групп лекарственных средств, включая субстанции, биотехнологические, биологические ЛП, биомедицинские клеточные продукты и высокотехнологичные лекарственные средства¹² [13–15].

Питательные среды в контроле стерильности методом определения CO_2 . Фармакопейные методы определения стерильности традиционно основываются на применении двух стандартных жидких питательных сред — триптиказо-соевого бульона и жидкой тиогликолевой среды, обеспечивающих рост аэробных и анаэробных микроорганизмов соответственно¹³. Однако корректировка условий выполнения методик в части используемых питательных сред остается важным направлением микробиологической практики. Были созданы

¹⁰ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

¹¹ 5.1.6. Alternative methods for control of microbiological quality. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

¹² Рощина МВ. Применение альтернативных микробиологических методов для испытания стерильности лекарственных препаратов: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М.; 2018.

¹³ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

модифицированные среды, рецептурный состав которых изменен с целью их адаптации под специфические задачи (например, создание анаэробной среды и др.) и требования к чувствительности, селективности и воспроизводимости методики [15].

TSB и FTM предназначены для выявления стандартного набора тест-штаммов, рекомендованных фармакопеями (например, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans* и др.). Однако в случае медленнорастущих бактерий (например, *Cutibacterium acnes*), поврежденных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов с длительным периодом латентности может потребоваться до 9–14 сут инкубации при строгом анаэробии [16], что неприемлемо для потенциально нестабильных ВТЛП, требующих быстрого выпуска и применения.

Значимой проблемой при использовании автоматизированных систем является оценка возможности получения ложноотрицательных результатов [17]. Их недооценка может повлечь за собой искажение результатов испытаний. При использовании питательной среды SA для детекции плесневых грибов было зафиксировано от 13 до 70% ложноотрицательных результатов в зависимости от вида исследуемых микроорганизмов. На рисунке 1 видна локализованная микробная колонизация в пригорловом участке флаконов iLYM и одиночные микромицетные включения сферической формы, свободно плавающие в питательной среде SA. Это свидетельствует о том, что система

не регистрировала рост, несмотря на его визуальное наличие во флаконах. В ходе оценки ростовых характеристик питательной среды iLYM было установлено, что кратковременная аэрация флакона с помощью стерильной полый иглы в течение 5–7 с позволяет существенно уменьшить частоту ложноотрицательных результатов (табл. 2).

При проведении испытаний с использованием питательных сред TSB и FTM случаев получения ложноотрицательных результатов не выявлено, так как детекцию микробного роста осуществляли визуально, а при возникновении сомнений в интерпретации признаков помутнения или осадка выполняли пересев исследуемых образцов на питательные среды, рекомендованные ведущими фармакопеями для выявления бактерий и дрожжевых и плесневых грибов. Применение данного подтверждающего этапа обеспечивало достоверность полученных результатов. Использование питательных сред SA и SN для выявления аэробных и анаэробных бактерий соответственно не сопровождалось получением ложноотрицательных результатов, что указывает на достаточную чувствительность и пригодность данных сред для контроля в соответствии с установленными требованиями [13]. При применении питательных сред SA и iLYM для выявления *Candida albicans* ложноотрицательные результаты не зафиксированы, различия во времени детекции между средами не достигали статистической значимости ($p > 0,05$).



Фотография выполнена авторами / The photo is taken by the authors

Рис. 1. Флаконы с выявленными ложноотрицательными результатами определения плесневых грибов. Зеленая крышка — среда iLYM без аэрации; синяя крышка — среда SA; ложноотрицательные результаты отмечены красным

Fig. 1. Bottles with false negative results of mold detection. Green cap, iLYM medium non aerated; blue cap, SA medium; false negative results are marked in red

Таблица 2. Количество ложноотрицательных результатов при определении плесневых грибов с помощью системы BacT/ALERT 3D Dual T**Table 2.** The number of false negative results of mold determination using the BacT/ALERT 3D Dual T system

Название микроорганизма <i>Microorganism</i>	Ложноотрицательные результаты при применении питательных сред, % <i>False-negative results for growth media, %</i>		
	SA	iLYM без аэрации <i>iLYM not aerated</i>	iLYM с аэрацией <i>iLYM aerated</i>
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	27	17	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	68	14	0
<i>Aspergillus terreus</i>	13	12	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	70	33	3

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Продолжительность инкубации. Согласно предписаниям большинства ведущих фармакопей¹⁴, вне зависимости от применяемой методики (прямой посев, мембранная фильтрация) продолжительность инкубации при проведении анализа стерильности должна составлять не менее 14 сут. Исключение представляет Индийская фармакопея¹⁵, допускающая сокращение инкубационного периода до 7 сут в случае анализа лекарственных препаратов, подвергшихся финишной стерилизации. Кроме того, Европейская фармакопея предусматривает возможность сокращения срока инкубации до 7 сут для отдельных категорий лекарственных средств при применении альтернативных подходов к определению стерильности при условии демонстрации эквивалентной чувствительности метода и его соответствующей валидации¹⁶.

Современные требования Надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice, GMP)¹⁷ и Управления рисками при обеспечении качества (Quality Risk Management, QRM, ICH Q9)¹⁸ предполагают соответствие применяемых аналитических стратегий уровню рисков, присущих конкретному продукту. Для ВТЛП, особенно нестабильных или используемых при неотложных состояниях пациентов, применение альтернативных валидированных методов микробиологического анализа с сокращенным временем получения результата — не только допустимая, но и рекомендованная

практика, отражающая принцип «контроль, ориентированный на продукт».

Авторами было проведено сравнение времени детекции микроорганизмов, внесенных в ВТЛП, в рамках анализа их стерильности при использовании традиционной и альтернативной методики (рис. 2). Полный спектр контаминирующих ВТЛП микроорганизмов может быть обнаружен в течение 7 сут инкубации вне зависимости от используемого для анализа объема образца. При использовании автоматизированной системы BacT/ALERT 3D Dual T время выявления микробной контаминации (за исключением *C. albicans*) сокращается на 0,38–2,4 сут по сравнению с традиционным методом прямого посева, что согласуется с литературными данными [18]. При варьировании объемов ВТЛП время детекции контаминации альтернативной методикой не изменяется, различия между группами не достигают уровня статистической значимости ($p > 0,05$).

Объем образца. Одним из ключевых факторов, влияющих на получение достоверных результатов анализа стерильности, является объем исследуемого образца. Снижение объема пробы ВТЛП при проведении испытаний — это критически важный аспект, имеющий большое практическое значение. Большинство ВТЛП производятся малыми партиями, часто в условиях персонализированной или экспериментальной

¹⁴ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

2.6.1. Sterility. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

〈71〉 Sterility Tests. United State Pharmacopeia. 47–NF42. 2024.

4.06. Sterility Test. Japanese Pharmacopoeia. XVIII ed. V. 1. Tokyo; 2021.

¹⁵ 2.6.1. Test for Sterility. Indian Pharmacopoeia. V. 1. New Delhi; 2021.

¹⁶ 2.6.27. Microbiological examination of cell-based preparations. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

¹⁷ Current Good Manufacturing Practice (CGMP) Regulations. FDA; 2013.

¹⁸ ICH guideline Q9 on quality risk management. EMA; 2015.

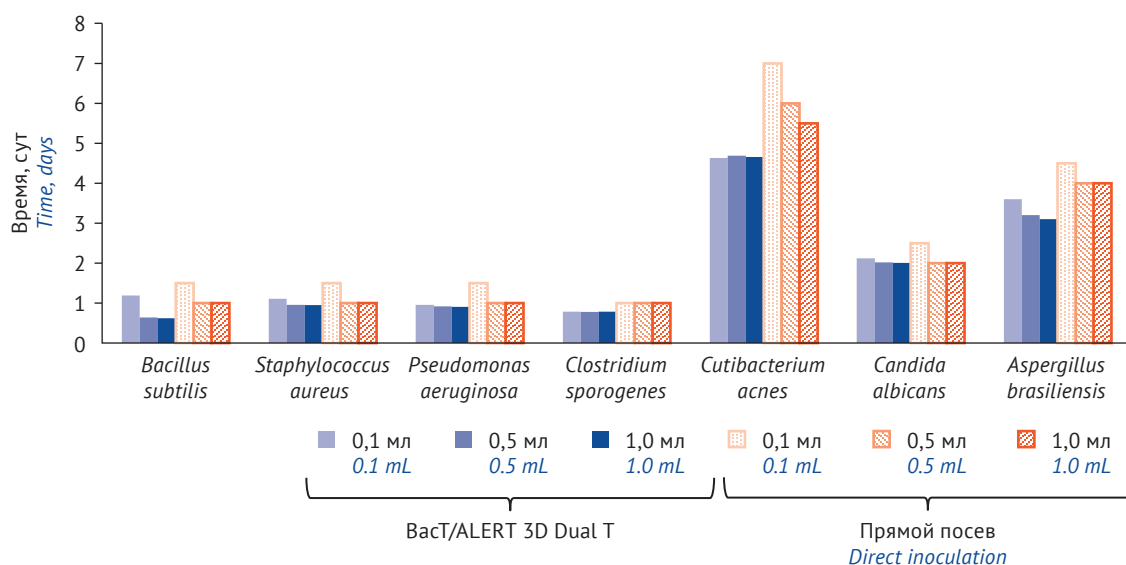


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Медиана времени выявления микроорганизмов, контаминирующих пробы высокотехнологичного лекарственного препарата разного объема, с применением фармакопейной и альтернативной методик

Fig. 2. Median time of microorganism contamination detection of advanced therapy medicinal product in different volumes using pharmacopoeial and alternative methods

терапии. Объем готовой продукции может быть ограничен миллилитрами, а стоимость – достигать миллионов рублей за дозу [19]. Поэтому отбор даже нескольких миллилитров, необходимых для классического микробиологического исследования, может существенно повлиять на доступность терапии для пациента.

ВТЛП часто выпускают в режиме «точно в срок» строго для лечения конкретного пациента. Повторный отбор той же серии невозможен из-за нестабильности действующего вещества, биологических ограничений (модифицированные клетки теряют жизнеспособность), индивидуального характера терапии (например, аутологичный клеточный продукт). Соответственно, снижение объема пробы для анализа критично для обеспечения сохранности терапевтической дозы.

В связи с вышесказанным было проведено исследование, позволяющее экспериментально установить минимальное количество ВТЛП, которое позволяет обнаружить микроорганизмы в исследуемом образце (табл. 3).

Оптимальный объем пробы ВТЛП, обеспечивающий надежную детекцию микроорганизмов при использовании фармакопейных питательных сред, составляет 1,0 мл на каждую среду. В то же время при применении автоматизированной системы BacT/ALERT 3D Dual T эффективным для посева объемом образца на каждую из сред является 0,5 мл (табл. 3).

Данные результаты демонстрируют высокую чувствительность и эффективность автоматизированной системы при меньшем расходе исследуемого образца, что особенно актуально при контроле качества дорогостоящих и ограниченных по объему ВТЛП.

ВЫВОДЫ

1. Колориметрическое определение углекислого газа в питательной среде с использованием системы BacT/ALERT 3D Dual T характеризуется более высокой чувствительностью, скоростью выполнения анализа и воспроизводимостью результатов по сравнению с традиционной фармакопейной методикой, что позволяет считать указанный метод перспективным для определения стерильности ВТЛП.
2. При использовании стандартных фармакопейных сред (TSB и FTM), а также модифицированных сред SA и SN при детекции аэробных и анаэробных бактерий из ВТЛП ложноотрицательные результаты не были зафиксированы, тогда как при выявлении плесневых грибов на питательной среде SA их количество составило от 15 до 70%. Применение питательной среды iLYM при условии ее кратковременной аэрации устраняло данное ограничение автоматизированной системы, значительно повышая надежность альтернативного метода.
3. Достоверно выявить полный спектр потенциальных контаминантов с помощью альтер-

Таблица 3. Правильность выявления групп микроорганизмов в высокотехнологичных лекарственных препаратах с использованием различных методик (К, %)**Table 3.** Accuracy of microorganism group identification introduced in different volumes of advanced therapy medicinal products (K, %)

Микроорганизмы <i>Microorganisms</i>	Питательная среда <i>Nutrient media</i>	Объем исследуемой пробы, мл <i>Volume of the studied sample, mL</i>					
		0,1		0,5		1,0	
		ВакТ/ ALERT	Прямой посев <i>Direct inoculation</i>	ВакТ/ ALERT	Прямой посев <i>Direct inoculation</i>	ВакТ/ ALERT	Прямой посев <i>Direct inoculation</i>
Аэробные бактерии <i>Aerobic bacteria</i>	SA/FTM	50–70	20–60	80–100	50–90	90–100	80–100
Анаэробные бактерии <i>Anaerobic bacteria</i>	SN/FTM	30–50	10–40	80–90	50–90	100	80–100
Дрожжевые грибы <i>Yeast</i>	iLYM аэрированная <i>iLYM aerated</i> /TSB	30	20	90	80	100	100
Плесневые грибы <i>Mold</i>	iLYM аэрированная <i>iLYM aerated</i> /TSB	40	20	80	60	100	90

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Данные, выделенные красным цветом, не удовлетворяют критерию приемлемости $\geq 70\%$ **Note.** Data marked in red does not meet the acceptance criterion $\geq 70\%$

нативной методики колориметрического определения концентрации CO_2 с использованием модифицированных питательных сред возможно на 0,38–2,4 сут быстрее, что оптимизирует контроль качества ВТЛП.

4. Для определения стерильности изучаемого ВТЛП альтернативным методом минимально необходимым количеством образца при внесении в каждую питательную среду является проба объемом 0,5 мл.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gonçalves E. Advanced therapy medicinal products: Value judgment and ethical evaluation in health technology assessment. *Eur J Health Econ.* 2019;21(3):311–20. <https://doi.org/10.1007/s10198-019-01147-x>
- Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of fungal infection associated with injection of methylprednisolone acetate solution from a single compounding pharmacy. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012; 61(41):839–42. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6141a2>
- Bertoletti da Silva S, Rebello Lourenço F. Risk of false compliance/non-compliance decisions for sterility test due to false-negative and false-positive test results. *Chemometr Intell Lab Syst.* 2020;200:104005. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104005>
- Deutschmann S, Paul M, Claassen-Willems M, et al. Rapid sterility test systems in the pharmaceutical industry: Applying a structured approach to their evaluation, validation and global implementation. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2023;77(3):211–35. <https://doi.org/10.5731/pda-jpst.2021.012672>
- Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al. BacT/Alert: An automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Microbiol.* 1990;28(7):1608–12. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.7.1608-1612.1990>
- Goula A, Gkioka V, Michalopoulos E, et al. Advanced therapy medicinal products: challenges and perspectives in regenerative medicine. *J Clin Med Res.* 2020;12(12):780–6. <https://doi.org/10.14740/jocmr3964>
- Рощина МВ, Сахно НГ, Гунар ОВ. Подходы к валидации альтернативной методики определения стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов. *Химико-фармацевтический журнал.* 2025;59(2):58–64. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2025-59-2-58-64>
- Roshchina MV, Sakhno NG, Gunar OV. Approaches to the validation of an alternative method for determining the sterility of high-tech medicines. *Pharm Chem J.* 2025;59(2):258–63. <https://doi.org/10.1007/s11094-025-03386-0>
- Woods M, Lu H-Y, Benard F. Validation of the BacT/ALERT® 3D System for Sterility Testing of a ^{177}Lu -radiopharmaceutical. *J Nucl Med.* 2025;66(Suppl 1):25146.
- Jimenez L, Rana N, Amalraj J, et al. Validation of the BacT/ALERT® 3D system for rapid sterility testing of biopharmaceutical samples. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2012;66(1):38–54. <https://doi.org/10.5731/pda-jpst.2012.00790>
- Hussong D, Mello R. Alternative microbiology methods and pharmaceutical quality control. *Am Pharm Rev.* 2006;9(1):62–9.
- Rohner P, Peppey B, Auckenthaler R. Comparison of BacT/ALERT with Signal blood culture system. *J Clin Microbiol.* 1995;33(2):313–7. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.2.313-317.1995>
- Mastronardi C, Perkins H, Derksen P, et al. Evaluation of the BacT/ALERT 3D system for the implementation of in-house quality control sterility testing at Canadian Blood Services. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(8):1179–87. <https://doi.org/10.1515/ccclm.2010.240>
- Рощина МВ, Гунар ОВ, Сахно НГ. Применимость альтернативного метода для анализа стерильности лекарственных препаратов. *Химико-фармацевтический журнал.* 2017;51(11):61–4. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-11-61-64>
- Roshchina MV, Gunar OV, Sakhno NG. Applicability of an alternative method for sterility

- Testing of medicinal preparations. *Pharm Chem J.* 2018; 51(11):1045–8. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1737-1>
14. Рощина МВ, Гунар ОВ, Сахно НГ. Методические особенности анализа стерильности биомедицинских клеточных продуктов. *Биофармацевтический журнал.* 2017;9(6):3–8. Roshchina MV, Gunar OV, Sakhno NG. Methodological features of sterility testing of biomedical cellular products. *Biopharmaceutical Journal.* 2017;9(6):3–8 (In Russ.). EDN: [XHAWNY](https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-6-62-64)
 15. Рощина МВ, Гунар ОВ, Сахно НГ. Предел обнаружения микроорганизмов при определении стерильности лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал.* 2017;51(6):62–4. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-6-62-64>. Roshchina MV, Gunar OV, Sakhno NG. Limit of detection of microorganisms in drug sterility testing. *Pharm Chem J.* 2017;51(6):508–10. <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1644-x>
 16. Kvich L, Jensen PØ, Justesen US, et al. Incidence of *Propionibacterium acnes* in initially culture-negative thioglycollate broths: A prospective cohort study at a Danish university hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(11):941–5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.036>
 17. Kocoglu ME, Bayram A, Balci I. Evaluation of negative results of BacT/Alert 3D automated blood culture system. *J Microbiol.* 2005;43(3):257–9. PMID: 15995643
 18. Bugno A, Lira RS, Oliveira WA, et al. Application of the BacT/ALERT® 3D system for sterility testing of injectable products. *Braz J Microbiol.* 2015;46(3):743–7. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140587>
 19. Hanna E, Rémuzat C, Auquier P, et al. Advanced therapy medicinal products: Current and future perspectives. *J Mark Access Health Policy.* 2016;4(1):31036. <https://doi.org/10.3402/jmahp.v4.31036>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *М.В. Рощина* — работа с источниками литературы, выполнение эксперимента, написание текста рукописи; *Н.Г. Сахно* — проведение эксперимента, обработка первичных данных и проведение вычислений; *О.В. Гунар* — концепция исследования, редактирование, критический пересмотр и утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contribution were as follows. *Marina V. Roshchina* analysed literature, performed experiments, and composed the manuscript. *Nadezhda G. Sakhno* performed the experiments, processed primary data, and provided basic calculations. *Olga V. Gunar* conceptualised the research, edited the manuscript, and critically reviewed the text.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Рощина Марина Владимировна, канд. фарм. наук / **Marina V. Roshchina**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5966-5822>

Сахно Надежда Геннадьевна, канд. фарм. наук / **Nadezhda G. Sakhno**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1773-7423>

Гунар Ольга Викторовна, д-р фарм. наук / **Olga V. Gunar**, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4825-8356>

Поступила 04.07.2025

После доработки 22.07.2025

Принята к публикации 07.08.2025

Received 4 July 2025

Revised 22 July 2025

Accepted 7 August 2025