первинного контролю виявлена одна серія нестерильного препарату, під час подальшого державного – нестерильних препаратів не виявлено.

Ключові слова: *препарати донорської крові, мікробна контамінація, контроль стерильності, валідація.*

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ИСПЫТАНИИ ГЕМОТРАНСФУЗИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

В.В. Любич

ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», Киев

Резюме. Цель – *провести анализ результатов испытаний на стерильность препаратов донорской крови во время первичного и последующего контроля качества.*

Материалы и методы. *Исследование препаратов донорской крови (раствор альбумина 5%, раствор альбумина 10%, иммуноглобулин человека нормальный, иммуноглобулин человека антистафилококковый, иммуноглобулин человека антирезус RH_0 (D), иммуноглобулин человека противостолбнячный, инфузамин) согласно требованиям Государственной Фармакопеи Украины и аналитической нормативной документации .*

Результаты. *Проанализированы результаты исследований стерильности препаратов донорской крови за 2011–2013 гг. За указанный период при первичном контроле обнаружена одна серия нестерильного препарата, во время дальнейшего государственного – нестерильных препаратов не выявлено.*

Ключевые слова: *препараты донорской крови, микробная контаминация, контроль стерильности, валидация.*

FEATURES OF MICROBIOLOGICAL STUDIES DURING THE TEST OF HAEMOTRANSFUSION PREPARATIONS FOR STERILITY

V.V. Lyubych

SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. The aim – *to analyze the test results for sterility of donor blood preparations during the primary and the subsequent control of quality.*

Materials and methods. *Research of quality of donor blood preparations (albumin solution 5%, albumin solution 10%, normal human immunoglobulin, human immunoglobulin antistaphylococcal, human immunoglobulin antirhesus RH_0(D), tetanus human immunoglobulin, infuzamin) as required by the State Pharmacopoeia of Ukraine and analytical and normative documents.*

Results. *There have been analyzed the results of studies of sterility of donor blood preparations in Ukraine for the 2011–2013. During that period the primary*

control revealed a series of non-sterile preparation, during the subsequent state control – non-sterile preparations were not found.

Key words: *donor blood preparations, microbial contamination, control of sterility, validation.*

Мікробна контамінація донорської крові, її компонентів і препаратів є однією з актуальних проблем виробничої трансфузіології. Ризик мікробної контамінації існує на всіх етапах виготовлення гемотрансфузійних середовищ, тому під час оцінки їхньої якості особлива увага приділяється мікробіологічним дослідженням, зокрема випробуванням на стерильність.

Випробування на стерильність – це єдиний аналітичний метод, що дозволяє оцінити стерильність лікарського засобу, виготовленого за асептичних умов. Стерильність гемотрансфузійних препаратів обумовлена як чистотою вихідної сировини, так і умовами виробництва. Особливого значення набуває вибір методів і режимів стерилізації готової продукції. Виробництво трансфузійних препаратів передбачає застосування різних видів стерилізації, що мають гарантувати збереження їхньої стерильності. Це парова, сухожарова, радіаційна, газова стерилізація, використання фільтрів, що здатні затримувати мікроорганізми, та виробництво за асептичних умов. Однак відомо, що процес інактивації мікроорганізмів фізичними і хімічними методами підпорядкований експоненціальному (логарифмічному) закону, отже, завжди існує ймовірність виживання мікроорганізмів у процесі стерилізації. Ця ймовірність залежить від величини популяції, виду та стійкості мікроорганізмів, які потрапили в трансфузійне середовище під час його виготовлення. Тому необхідно звести до мінімуму біозабруднення вихідної сировини перед інактивацією чи стерилізацією та використовувати інгредієнти з допустимими межами мікробного забруднення [1–4]. Слід враховувати можливість контамінування вихідної сировини, інгредієнтів та препаратів мікроорганізмами, які у відповідь на стресові умови (стерилізація, опромінення, дія дезінфектантів, особливості технологічних процесів тощо) втратили здатність росту на штучних живильних середовищах. Однак завдяки перебудові свого генетичного апарату за допомогою сенсорних і регуляторних механізмів залишилися здатними до активного метаболізму. Це так звані дормантні форми мікроорганізмів (англ. dormant – дрімотний, сплячий). У разі зміни несприятливих умов існування вони можуть «рекультивуватись», тобто знову набувати здатності до розмноження і росту на звичайних для них живильних середовищах. Здатність до переходу в стан спокою виявлена для багатьох видів умовно-патогенних і патогенних бактерій. Не виключено, що дормантні форми

мікроорганізмів після попадання в організм людини під час трансфузій можуть реверсувати у вегетативний стан і викликати відповідну негативну реакцію – пірогенну, токсичну або сепсис. Виявлення формантних форм мікроорганізмів – це складний процес. Їх важко ідентифікувати класичними мікробіологічними методами дослідження. Найперспективнішим при цьому є застосування полімеразної ланцюгової реакції, яка дає можливість виявити в досліджуваному матеріалі специфічний, характерний тільки для даного виду бактерії фрагмент нуклеїнової кислоти і далі ампліфікувати цей фрагмент [5]. Однак в умовах виробництва препаратів нині це здійснити неможливо. Тому нагальною проблемою під час виготовлення гемотрансфузійних препаратів є забезпечення належних умов, які виключали б можливість бактеріального забруднення на всіх етапах виробництва.

Мета. Провести аналіз результатів первинного контролю якості білкових препаратів крові, що проводився у відділах з контролю якості (ВКЯ) Центрів крові (ЦК), обласних станцій переливання крові (ОСПК) і станцій переливання крові (СПК) України, і подальшого випробування у Центральній лабораторії державного контролю за якістю білкових препаратів плазми крові, компонентів та кровозамінників (ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України») за період від 2011р. по 2013 р.

Матеріали і методи досліджень. Впродовж 2011-2013 рр. відповідно до «План-завдань» у Центральну лабораторію державного контролю за якістю білкових препаратів плазми крові, компонентів та кровозамінників із ЦК (ОСПК) та СПК України на подальший контроль було надіслано наступі препарати: розчин альбуміну 5%; розчин альбуміну 10%; імуноглобулін людини нормальний, рідкий; імуноглобулін людини антистафілококовий, рідкий; імуноглобулін людини антирезус Rh0(D), рідкий; імуноглобулін людини протиправцевий, рідкий; інфузамін. Після первинного контролю препаратів донорської крові у відділах з контролю якості ЦК (ОСПК), СПК у Центральній лабораторії державного контролю проведено подальший контроль у таких напрямках: визначення фізико-хімічних властивостей; біологічні випробування на стерильність і специфічну активність; біологічні випробування на відсутність пірогенності та токсичності; випробування на інфекційну безпечність.

Державний контроль якості білкових препаратів донорської крові, зокрема випробування препаратів на стерильність, проводили відповідно до вимог Державної Фармакопеї України, Настанов з якості медичних імунобіологічних препаратів [6-10], аналітично-нормативної документації виробника (АНД), чинної Інструкції з контролю стерильності [11] з

використанням методик, що регламентовані нормативними документами, та класичних мікробіологічних методів досліджень. У роботі використовували державні та галузеві стандарти.

Результати та їх обговорення. За період 2011–2013 рр. у Центральній лабораторії державного контролю проконтрольовано 202 серії білкових препаратів донорської крові (табл. 1), при цьому проведено 19712 аналізів, зокрема: фізико-хімічні дослідження – 10319; бактеріологічні – 6598; визначення специфічної активності імунних препаратів – 1216; біологічний контроль – 1579.

Таблиця 1

Державний контроль якості білкових препаратів донорської крові, надісланих у Центральну лабораторію державного контролю з ЦК(ОСПК), СПК у 2011–2013 рр.

Рік	Усього проконт-рольовано серій	АНД		Препарат не відповідає вимогам АНД за пунктом:		СПК
		Відпо-відає	Не відпо-відає			
2011	72 (20 к)	69 (17 к)	(3 к)	Інфузамін с. 080511 с. 090611 с. 100611	Загальний азот за К'єльдалем, сумарний вміст амінокислот, вміст хлоріону	СПК м. Горлівка
2012	73 (25 к)	72 (25 к)	1	Розчин альбуміну 10% с. 71211	Пірогенність	Черкаська ОСПК
2013	57 (7 к)	55 (7 к)	2	Розчин альбуміну 10% с. 070413	Механічні включення, прозорість, термостабільність	КУ «Запорізька ОСПК»
				«Імуноглобулін людини антистафілококовий, рідкий» с. № 090713	***Пірогенність***	***КРУ «Центр служби крові»***

Примітка: «к» – консультативний контроль.

Як видно з наведених у табл. 1 даних, під час проведення подальшого державного контролю за зазначений період нестерильних зразків препаратів не було виявлено. За пірогенністю забраковано дві серії препаратів, однак ріст мікроорганізмів у цих зразках не виявлено.

Відповідно до Наказу МОЗ України № 252 від 23. 12. 1993 р. Центральна лабораторія державного контролю проводить аналіз річних звітів із первинного контролю якості білкових препаратів плазми донорської крові, що подають щорічно ВКЯ ЦК(ОСПК) і СПК України в ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України». Результати з первинного контролю якості представлені в табл. 2

Таблиця 2

Первинний контроль якості білкових препаратів донорської крові, за результатами звітів ВКЯ, надісланих у Центральну лабораторію державного контролю з ЦК(ОСПК), СПК у 2011–2013 рр.

Рік	Усього випущено серій	АНД		Препарат не відповідає вимогам АНД за пунктом		СПК
		Відповідає	Не відповідає			
2011	455	454	1	Розчин альбуміну 10% с. 111210	Пірогенність	КЗ «Дніпропетровська ОСПК»
2012	425	425	–	–	–	–
2013	409	408	1	Розчин альбуміну 10% с. 130713	Стерильність	КУ «Херсонський ОЦСК»

Як видно із наведених у табл. 2 даних, під час проведення первинного контролю якості у ВКЯ за період 2011–2013 рр. була виявлена одна нестерильна серія і одна пірогенна.

Слід зазначити, що під час випробувань на стерильність гемотрансфузійних середовищ можливість виявлення мікроорганізмів прямо пропорційна їхній кількості у випробовуваному зразку і залежить від здатності цих мікроорганізмів давати видимий ріст на живильних середовищах. При низькому рівні забруднення серії ймовірність виявлення мікроорганізмів дуже мала, навіть у разі рівномірної мікробної контамінації. Інтерпретація результатів випробування на стерильність ґрунтується лише на тому принципі, що отримані результати мають бути

ідентичними для кожної одиниці, що входить до складу серії гемотрансфузійного середовища. Оскільки випробування кожної одиниці провести неможливо, проводять мікробіологічний аналіз певної розрахованої кількості зразків випробовуваної серії, враховуючи при цьому кількість одиниць у серії, об'єм зразка, метод стерилізації, а також інші фактори, що можуть чинити вплив на стерильність препаратів. І через те, що всі одиниці випробовуваної серії піддавались однаковій обробці, під час якої мікроорганізми, що знаходились у препараті, були видалені або знешкоджені до такого рівня, що втратили здатність до розмноження, результати мікробіологічного аналізу зразків переносять на всю серію. Однак теоретично можна припустити, що в певній кількості одиниць серії, що не випробовувалась, мікроорганізми можуть залишитися не виявленими, тому довести абсолютну відсутність мікроорганізмів у випробовуваній серії препарату практично неможливо. Тому метою дослідження на стерильність є доказ відсутності життєздатних мікроорганізмів у зразку препарату з максимально можливою достовірністю. Основними факторами, що визначають ефективність дослідження на стерильність, є об'єм зразка для аналізу, техніка посіву, склад живильних середовищ, час і температура інкубації посівів.

Окрім цього, стерильність препаратів має забезпечуватися валідованим процесом виробництва, тобто його надійністю. Згідно із загальними принципами забезпечення якості [12] об'єктами валідації під час виробництва стерильних гемотрансфузійних препаратів є наступні стадії:

- забезпечення відповідних умов виробництва (класів чистоти): моніторинг середовища по кількості часток, що знаходяться у повітрі робочої зони, перепадів тиску, кількість мікроорганізмів у повітрі та на поверхнях, мікробіологічний контроль працівників;

- підготовка обладнання: стерилізація всіх задіяних одиниць обладнання та допоміжного устаткування. Методи стерилізації такого обладнання мають бути валідованими. Методи дезінфекції зовнішніх поверхонь обладнання, поверхонь чистих приміщень, допоміжного матеріалу, що не контактує з продукцією, також мають бути валідованими;

- технологічний процес виробництва: контроль критичних точок на всіх стадіях (підготовка ампул/пляшок, приготування розчину препарату, стерилізуючої фільтрації, наповнення ампул/пляшок, контроль на механічні включення, маркування ампул/пляшок, пакування у споживчу тару).

Порушення технологічного процесу виробництва може призвести до отримання препаратів, що не відповідають стандартам з якості, зокрема стерильності.

Висновки

1. Ризик мікробної контамінації гемотрансфузійних препаратів існує на всіх етапах виробництва, тому під час їх виготовлення необхідно забезпечувати належні умови, які виключали б можливість бактеріального забруднення.

2. Рівень надійності, за яким у разі відсутності нестерильних зразків у випробовуваній серії препарату можна зробити висновок щодо якості всієї серії, залежить від однорідності серії, умов виробництва, встановленого порядку відбору проб для аналізу та професіоналізму працівників.

Література

1. Державна Фармакопея України: перше видання / Державне підприємство «Науково – експертний фармакопейний центр». – Харків : РІРЕГ, 2001. – 556 с.

2. Державна Фармакопея України: перше видання. Доповнення 1 / Державне підприємство «Науково – експертний фармакопейний центр». – Харків : РІРЕГ, 2004. – 492 с.

3. Державна Фармакопея України: перше видання. Доповнення 2 / – Харків : НЕФЦ, 2008. – 620 с.

4. Державна Фармакопея України: перше видання. Доповнення 4 / – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. – 538 с.

5. Федоровська О.О. Дормантні форми бактерій: стисла характеристика, значення (огляд літератури) / О.О. Федоровська, В.В. Любич // Медичний всесвіт. – 2004. – Т. 4, № 1. – С. 54–58.

6. Настанова з якості 42-3002-002-2005 від 02.06.2005 р. № 247. Керівництво по складанню аналітично-нормативної документації на розчин альбуміну донорського 5, 10 і 20%. – К. : 2005. – 22 с.

7. Настанова з якості 42-3002-003-2005 від 02.06.2005 р. № 247. Керівництво по складанню аналітично-нормативної документації на імуноглобулін людини нормальний, рідкий. – К. : 2005. – 27 с.

8. Настанова з якості 42-3002-004 -2005 від 02.06.2005 р. № 247. Керівництво по складанню аналітично-нормативної документації на імуноглобулін людини антирезус Rh_0(D), рідкий. – К. : 2005. – 8 с.

9. Настанова з якості 42-3002-005-2005 від 02.06.2005 р. № 247. Керівництво по складанню аналітично-нормативної документації на імуноглобулін людини антистафілококовий, рідкий. – К. : 2005. – 9 с.

10. Настанова з якості 42-3002-011-2005 від 26.07.2005р. №376 Методичні рекомендації щодо викладення технологічних регламентів на виробництво препаратів крові. – К. : 2005. – 192 с.

11. Інструкція «Контроль стерильності консервованої крові, її компонентів, препаратів, консервованого кісткового мозку, плазмозаміщуючих та консервуючих розчинів, умов їх заготівлі». Наказ МОЗ України від 05.07.1999 р. № 164. – К. : 1999. – с.

12. Шестопал О.А. Розробка підходів до валідації технологічного процесу виробництва стерильних лікарських засобів [Електронний ресурс] / О.А. Шестопал, Ю.В. Підпружников– Режим доступу: http: // dspace. nuph.edu. ua/handle.