

УДК 602.641:604

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-65-75>

Научно-методическая статья | Scientific methodology article



Анализ подходов к проведению испытания вакцин для профилактики COVID-19 по показателю «Стерильность»

С.М. Суханова, А.С. Тихонова[✉], З.Е. Бердникова

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

✉ Тихонова Александра Сергеевна; alehina@expmed.ru

Резюме

В настоящее время в Российской Федерации пристальное внимание уделяется вопросам, связанным с вакцинопрофилактикой инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. Повышение доверия населения к проведению вакцинации новыми препаратами в большой степени связано с гарантией отсутствия побочного действия, вызванного контаминацией. Высокий риск загрязнения биологических препаратов, в числе которых вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, обусловленный природой используемого сырья и свойствами препаратов, служит дополнительным фактором необходимости применения эффективных подходов к выявлению контаминирующих агентов.

Цель работы — оценить возможность усовершенствования процедуры проведения испытания на стерильность вакцин для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2.

В статье представлены результаты анализа методик, предложенных разработчиками для проведения испытания по показателю «Стерильность» десяти зарегистрированных в нашей стране отечественных препаратов вакцин для профилактики COVID-19. Изучены специфические особенности препаратов, включая физико-химические свойства, наличие антимикробных компонентов и другие критически значимые факторы, влияющие на правильность постановки испытания. Показана возможность усовершенствования процедуры исследования препаратов по показателю «Стерильность». В качестве основных направлений авторами рассматривается предложение разработки альтернативной методики на основе второго фармакопейного метода (ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность, Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд.), а также применение универсальной питательной среды. Использование данных рекомендаций для усовершенствования утвержденных и разработки новых методик позволит повысить надежность и расширит возможности проведения испытания как в процессе производства, так и при экспертизе с целью регистрации обновленных вариантов вакцин для профилактики коронавирусной инфекции и последующего их ввода в гражданский оборот. Предложенные подходы могут быть применены для оценки качества по показателю «Стерильность» и других лекарственных средств.

Ключевые слова: стерильность; мембранная фильтрация; прямой посев; безопасность вакцин; оценка качества вакцин для профилактики COVID-19

Для цитирования: Суханова С.М., Тихонова А.С., Бердникова З.Е. Анализ подходов к проведению испытания вакцин для профилактики COVID-19 по показателю «Стерильность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):65–75. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-65-75>

© С.М. Суханова, А.С. Тихонова, З.Е. Бердникова, 2023

Analysis of approaches to sterility testing of COVID-19 prevention vaccines

S.M. Sukhanova, A.S. Tikhonova ✉, Z.E. Berdnikova

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

✉ Aleksandra S. Tikhonova; alehina@expmed.ru

Abstract

Preventive vaccination against SARS-CoV-2 infection is currently receiving close attention in the Russian Federation. Improving public confidence in immunisation with new vaccines largely depends on a guarantee of the absence of side effects caused by contamination. A high risk of contamination is inherent to biological products, including coronavirus prevention vaccines, due to their properties and the nature of raw materials used. This risk adds to the need for using effective contaminant detection approaches.

The aim of the study was to evaluate the possibility to improve sterility testing of preventive vaccines against SARS-CoV-2 infection.

This article presents an analysis of the procedures proposed by pharmaceutical developers for sterility testing of ten Russian vaccines approved in the country for COVID-19 prevention. The authors considered specific characteristics of these vaccines, including their physical and chemical properties, the presence of antimicrobial components, and other critical factors affecting the correctness of the experimental setup. The results suggest that it is possible to improve sterility testing. According to the authors, the main directions for its improvement are the proposal to develop an alternative procedure based on compendial method 2 (OFS.1.2.4.0003.15, Ph. Rus. XIV), as well as the use of a universal culture medium. If used for refining the established procedures and developing new ones, the authors' recommendations will improve the reliability and applicability of sterility testing during both manufacturing and pre-approval regulatory assessment of updated coronavirus vaccines for subsequent release to the market. The proposed approaches can be applied to testing other medicinal products for sterility.

Key words:

sterility; membrane filtration; direct inoculation; safety of vaccines; quality assessment of COVID-19 prevention vaccines

For citation:

Sukhanova S.M., Tikhonova A.S., Berdnikova Z.E. Analysis of approaches to sterility testing of COVID-19 prevention vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):65–75. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-65-75>

Введение

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19), вспышка которой произошла в конце 2019 г. в Китайской Народной Республике (КНР) с эпицентром в городе Ухань и впоследствии принявшая характер пандемии, довольно длительно сохраняла высокие темпы распространения, несмотря на принимаемые во всем мире усиленные меры неспецифической профилактики и лечения¹. Большой процент летальности среди заболевших был связан с высокой контагиозностью возбудителя и отсутствием врожденного иммунитета к новому высокопатогенному и смертельно опасному вирусу SARS-CoV-2 [1].

Отсутствие способов специфической профилактики и средств эффективного лечения вызвали во всем мире стремительный рост научных разработок жизненно необходимых лекарственных препаратов и тест-систем для *in vitro* диагностики новой инфекции. Учитывая, что вакцинация является наиболее эффективным и экономичным методом профилактики и борьбы с инфекционными заболеваниями, наибольшие усилия были направлены на разработку вакцин, вызывающих формирование приобретенного иммунитета [2, 3].

Только своевременно принятые строгие меры ограничения и массовая вакцинация различных

¹ Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 5 (08.04.2020) (утв. Министерством здравоохранения Российской Федерации).

возрастных групп населения, в первую очередь препаратами отечественного производства, стали решающими мерами для снижения смертности и уровня заболеваемости в нашей стране. Высокие темпы вакцинации против COVID-19 стали возможны благодаря созданию и производству в ускоренные сроки широкого спектра эффективных вакцин для профилактики вирусной инфекции [4].

В настоящее время в Российской Федерации внедрено в практику здравоохранения десять наименований препаратов вакцин, которые предназначены для парентерального (внутримышечного, в/м) или назального применения².

Одним из наиболее важных показателей безопасности профилактических препаратов для данных способов введения является отсутствие микробной контаминации, подтверждение которого проводится в испытании по показателю «Стерильность». Учитывая ускоренные сроки разработки, сложность получения и выборочный характер контроля, огромную важность для здравоохранения, а также пристальное внимание и настороженность населения к вакцинам для профилактики коронавирусной инфекции³, поиск путей повышения надежности испытания по данному показателю принимает особое значение и актуальность.

Цель работы – оценить возможность усовершенствования процедуры проведения испытания на стерильность вакцин для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2.

Основная часть

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность⁴ испытание на стерильность лекарственных препаратов проводят методом прямого посева или методом мембранной фильтрации. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и ограничения, которые должны быть учтены на стадии разработки методики испытания нового лекарственного средства (ЛС). Большинство исследователей, как правило, отдают предпочтение методу мембранной фильтрации, поскольку риск контаминирования испытуемого препарата и питательной среды в данном случае сведен к минимуму, а антимикробное действие препарата

без дополнительных манипуляций может быть достаточно легко устранено. Поэтому использование при испытании на стерильность вакцин метода мембранной фильтрации, снижающего вероятность получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов, является эффективным инструментом улучшения контроля качества продукта.

Вместе с тем для контроля труднорастворимых ЛС, к которым часто относятся биологические лекарственные препараты (БЛП), представляющие собой живые клетки, вязкие белковые суспензии или другие нефiltrующиеся субстанции, метод мембранной фильтрации не применим [5]. Дополнительным существенным ограничением для использования данного метода в настоящее время может оказаться отсутствие необходимого оборудования и расходных материалов.

Более простой и доступной альтернативой, особенно для проведения рутинного контроля при внутрипроизводственном мониторинге, может служить метод прямого посева. Однако в этом случае количество испытуемого материала согласно требованиям ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность будет лимитировано объемом питательной среды и нормами отбора образцов, что может вызвать затруднения при решении вопроса о способе устранения потенциального антимикробного действия препарата. Следствием неэффективной процедуры инактивации может стать получение недостоверных ложноположительных результатов. Кроме того, увеличение количества используемых вспомогательных материалов (пробирки, пробки, пипетки и др.), а также манипуляций с открытыми емкостями ведет к повышению риска контаминирования испытуемого образца и получения ложноотрицательного результата. Помимо этого, для правильной оценки результатов испытания БЛП, вызывающих изменение внешнего вида питательной среды, визуально затрудняющее оценку наличия микробного роста, на 5–7 сут требуется проведение пересева исследуемого материала на свежую питательную среду. Введение дополнительной процедуры может увеличить риск получения ложноотрицательных результатов до 15% [5]. Поэтому метод прямого посева рекомендуется использовать для препаратов или материалов, испытание которых невозможно или экономи-

² Стопкоронавирус.рф. <https://xn--80aesfpebagmfb1c0a.xn--p1ai/>

³ COVID-19: Vaccines to prevent SARS-CoV-2 infection. https://www.uptodate.com/contents/covid-19-vaccines-to-prevent-sars-cov-2-infection?search=undefined&source=covid19_landing&usage_type=main_section#H2043777381

⁴ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

чески нецелесообразно выполнить методом мембранной фильтрации, не обладающих антимикробным действием или антимикробное действие которых можно устранить.

Для расширения возможностей проведения испытания и повышения надежности оценки качества наиболее рациональная и надежная схема выявления контаминации в вводимых людям препаратах, к которым относятся в том числе и вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, должна включать разработку адекватных методик, разработанных с учетом особенностей новых вакцин, на основе каждого из двух фармакопейных методов – метода прямого посева и мембранной фильтрации.

С целью определения возможности усовершенствования процедуры нами был проведен расширенный теоретический анализ методов и подходов, предложенных разработчиками для испытания по показателю «Стерильность» десяти зарегистрированных в нашей стране препаратов отечественных вакцин для профилактики COVID-19: Гам-КОВИД-Вак (в/м⁵ и капли назальные⁶), Спутник Лайт⁷, Гам-КОВИД-Вак-Лео⁸, Гам-КОВИД-Вак-М⁹, Салнавак¹⁰, ЭпиВакКорона¹¹, ЭпиВакКорона-Н¹², Конвасэл¹³ и КовиВак¹⁴ (табл. 1).

Новые профилактические препараты по своему происхождению и составу условно можно отнести к следующим трем типам вакцин: векторные рекомбинантные (6 наименований), субъединичные/пептидные (3 наименования) и инактивированные (цельновирионные) (1 наименование). На первом этапе нами были рассмотрены критически значимые для правильности постановки испытания на стерильность как мето-

дом прямого посева, так и методом мембранной фильтрации, специфические особенности самих препаратов, в числе которых физико-химические свойства (прозрачность, pH, содержание белка), а также наличие в их составе антимикробных компонентов или других факторов, препятствующих прохождению образца через поры мембран (0,45 мкм) или мешающих однозначной интерпретации результатов (табл. 1).

Анализ данных показал, что, в отличие от готовых к применению форм препаратов векторных вакцин, представляющих собой прозрачный раствор, субъединичные (пептидные) и цельновирионная вакцины, выпускаемые в виде непрозрачной эмульсии или суспензии, при внесении в питательную среду методом прямого посева могут вызывать сходное с ростом контаминанта помутнение, затрудняющее интерпретацию результатов испытания. Вместе с тем низкое содержание белка (0,05–0,3 мг) при номинальном объеме первичных упаковок всех исследуемых препаратов не более 0,5–3 мл, согласно нашим ранее проведенным исследованиям [5], не станет ограничением для пропускания этих образцов через мембранные фильтры при испытании соответствующим методом. Установленное производителями нормативное требование pH в диапазоне нейтральных значений (6,0–8,0) является физиологическим и оптимальным для посева образцов в тиогликолевую (pH 7,1±0,2) и соево-казеиновую (pH 7,3±0,2) среды, а также для выявления в них возможного контаминанта любым из двух методов.

Сравнительное изучение состава исследуемых препаратов позволило установить особенности субъединичных (пептидных)

⁵ Гам-КОВИД-Вак, Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, РУ №: ЛП-006395. <https://grls.rosminzdrav.ru>

⁶ Гам-КОВИД-Вак, Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, капли назальные, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, РУ №: ЛП-008005. <https://grls.rosminzdrav.ru>

⁷ Спутник Лайт, Векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, РУ №: ЛП-006993. <https://grls.rosminzdrav.ru>

⁸ Гам-КОВИД-Вак-Лео, Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, РУ №: ЛП-006423. <https://grls.rosminzdrav.ru>

⁹ Гам-КОВИД-Вак-М, Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, РУ №: ЛП-007632. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹⁰ Салнавак, Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, АО «ГЕНЕРИУМ», Россия, РУ №: ЛП-008297. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹¹ ЭпиВакКорона, Вакцина на основе пептидных антигенов для профилактики COVID-19, ФБУН ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия, РУ №: ЛП-006504. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹² ЭпиВакКорона-Н, Вакцина на основе пептидных антигенов для профилактики COVID-19, ФБУН ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия, РУ №: ЛП-007326. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹³ Конвасэл®, Вакцина субъединичная рекомбинантная для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, Россия, РУ №: ЛП-007967. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹⁴ КовиВак (Вакцина коронавирусная инактивированная цельновирионная концентрированная очищенная), ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия, РУ №: ЛП-006800. <https://grls.rosminzdrav.ru>

Таблица 1. Сравнение свойств вакцин для профилактики коронавирусной инфекции и подходов к проведению их испытаний по показателю «Стерильность»
Table 1. Comparison of prophylactic coronavirus vaccine characteristics and sterility testing approaches

Критерий <i>Criterion</i>	Наименование препарата <i>Name of the medicinal product</i>									
	Гам-КОВИД-Вак <i>Gam-COVID-Vac</i>	Гам-КОВИД-Вак — капли назальные <i>Gam-COVID-Vac (nasal drops)</i>	Гам-КОВИД-Вак-М <i>Gam-COVID-Vac-M</i>	Спутник Лайт <i>Sputnik Light</i>	Гам-КОВИД-Вак-Лео <i>Gam-COVID-Vac-Lyo</i>	Салнавак — спрей назальный <i>Salnavac (nasal spray)</i>	ЭпиВак Корона <i>EpiVac-Corona</i>	ЭпиВак Корона-Н <i>EpiVac-Corona-N</i>	Конвасэл® <i>Convacell®</i>	КовиВак <i>CoviVac</i>
Тип <i>Type</i>	Векторная <i>Vector</i>	Векторная <i>Vector</i>	Векторная <i>Vector</i>	Векторная <i>Vector</i>	Векторная <i>Vector</i>	Векторная <i>Vector</i>	Пептидная <i>Subunit</i>	Пептидная <i>Subunit</i>	Субъединичная <i>Subunit</i>	Инактивированная <i>Inactivated</i>
Внешний вид <i>Appearance</i>	Раствор <i>Solution</i>	Раствор <i>Solution</i>	Раствор <i>Solution</i>	Раствор <i>Solution</i>	Лиофилизат <i>Lyophilisate</i>	Жидкость <i>Liquid</i>	Суспензия <i>Suspension</i>	Суспензия <i>Suspension</i>	Эмульсия <i>Emulsion</i>	Суспензия <i>Suspension</i>
Прозрачность <i>Clarity</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Не прозрачная <i>Turbid</i>	Не прозрачная <i>Turbid</i>	Не прозрачный <i>Turbid</i>	Не прозрачный <i>Turbid</i>
Особенности состава (антибиотики, сорбенты) <i>Specific components (antibiotics, sorbents)</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Алюминия гидроксид 0,5–0,7 мг/доза <i>Aluminium hydroxide 0.5–0.7 mg/dose</i>	Алюминия гидроксид 0,5–0,7 мг/доза <i>Aluminium hydroxide 0.5–0.7 mg/dose</i>	Канамицин не более 50 нг/мл <i>Kanamycin not more than 50 ng/mL</i>	Алюминия гидроксид 0,3–0,5 мг/доза <i>Aluminium hydroxide 0.3–0.5mg/dose</i>
pH	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0	6,8–7,8	6,8–7,8	6,9–7,6	6,8–7,8
Белок <i>Protein</i>	Не более 50 мкг/доза <i>Not more than 50 µg/dose</i>	Не более 50 мкг/доза <i>Not more than 50 µg/dose</i>	Не более 10 мкг/доза <i>Not more than 10 µg/dose</i>	Не более 50 мкг/доза <i>Not more than 50 µg/dose</i>	Не более 50 мкг/доза <i>Not more than 50 µg/dose</i>	–	180–270 мкг/доза <i>180–270 µg/dose</i>	180–270 мкг/доза <i>180–270 µg/dose</i>	–	–
Антимикробное действие <i>Antimicrobial action</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>
Метод (прямой посев) (соотношение/пересев) <i>Method (direct inoculation) (sample–medium ratio / subculture)</i>	ПП (1:20) <i>DI (1:20)</i>	ПП (1:20) <i>DI (1:20)</i>	ПП (1:20) <i>DI (1:20)</i>	ПП (1:20) <i>DI (1:20)</i>	ПП (1:20) <i>DI (1:20)</i>	–	ПП (1:20/пересев) <i>DI (1:20/ subculture)</i>	ПП (1:20/пересев) <i>DI (1:20/ subculture)</i>	–	ПП (1:20/пересев) <i>DI (1:20/ subculture)</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Критерий <i>Criterion</i>	Наименование препарата <i>Name of the medicinal product</i>							
	Гам-КОВИД-Вак <i>Gam-COVID-Vac</i>	Гам-КОВИД-Вак – капли назальные <i>Gam-COVID-Vac (nasal drops)</i>	Гам-КОВИД-Вак-М <i>Gam-COVID-Vac-M</i>	Спутник Лайт <i>Sputnik Light</i>	Гам-КОВИД-Вак-Лео <i>Gam-COVID-Vac-Lyo</i>	Салнавак – спрей назальный <i>Salnavac (nasal spray)</i>	ЭпиВак Корона <i>EpiVac-Corona</i>	ЭпиВак Корона-Н <i>EpiVac-Corona-N</i>
Метод (мембранная фильтрация)/особенности <i>Method (membrane filtration), details</i>	-	-	-	-	-	МФ/ 0.9% NaCl – 3×100 мл MF/ 0.9% NaCl, 3×100 ml	МФ/ 0.9% NaCl MF/ 0.9% NaCl	МФ/ 0.9% NaCl MF/ 0.9% NaCl
Питательная среда <i>Culture media</i>	Тиоглико-левая среда (универсальная) <i>Fluid thioglycollate medium (universal)</i>	Тиоглико-левая среда (универсальная) <i>Fluid thioglycollate medium (universal)</i>	Тиоглико-левая среда (универсальная) <i>Fluid thioglycollate medium (universal)</i>	Тиоглико-левая среда (универсальная) <i>Fluid thioglycollate medium (universal)</i>	Тиоглико-левая среда (универсальная) <i>Fluid thioglycollate medium (universal)</i>	Тиоглико-левая/соево-казеиновая среда <i>Fluid thioglycollate medium/soybean-casein digest medium</i>	Тиоглико-левая среда (универсальная) <i>Fluid thioglycollate medium (universal)</i>	Тиоглико-левая среда (универсальная) <i>Fluid thioglycollate medium (universal)</i>
Рекомендации (метод, соотношение, пересев, питательная среда) <i>Recommendations (method, sample-medium ratio, subculture, culture media)</i>	МФ/ПП (1:10) <i>MF/DI (1:10)</i>	МФ/ПП (1:10) <i>MF/DI (1:10)</i>	МФ/ПП (1:10) <i>MF/DI (1:10)</i>	МФ/ПП (1:10) <i>MF/DI (1:10)</i>	МФ/ПП (1:10) <i>MF/DI (1:10)</i>	ПП (1:10)/универсальная тиогликолевая среда <i>DI (1:10)/universal fluid thioglycollate medium</i>	МФ/ПП (1:20)/пересев <i>DI (1:20)/subculture</i>	МФ/ПП универсальная тиогликолевая среда <i>MF/DI universal fluid thioglycollate medium</i>

Примечание. МФ – мембранная фильтрация; ПП – прямой посев; «-» – не применимо.
Note. MF, membrane filtration; DI, direct inoculation; -, not applicable.

и инактивированной вакцин, связанные с наличием дополнительных компонентов в виде минерального адъюванта алюминия гидроксида или антибиотика канамицина. При внесении в питательную среду адсорбированных препаратов, содержащих адъювант алюминия гидроксид, наблюдается локальное диффузное помутнение питательной среды, которое может вызывать определенную настороженность при выборе метода испытания и при последующей оценке результатов. Наличие антимикробного компонента потребует дополнительного изучения его влияния на возможную контаминацию в модельных условиях испытания и определения способа его устранения. Препараты векторных вакцин, напротив, не содержат антимикробных или других критичных для проведения испытания агентов любым из двух фармакопейных методов.

В ходе анализа представленных в нормативной документации (НД) методик установлено, что испытание вакцин всех типов проводится в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15. Стерильность преимущественно одним методом (90%), из них в 70% случаев методом прямого посева (рис. 1). Наиболее часто (83%) данный метод применяется для оценки качества препаратов векторного типа. Испытуемый образец вносят в питательную среду в соотношении 1:20 (табл. 1). Такой подход производителей к выбору одного метода может быть обусловлен, с одной стороны, необходимостью скорейшей регистрации и последующего внедрения вакцин в практику здравоохранения. С другой стороны, отсутствием в условиях проводимого испытания у данных препаратов антимикробного действия.

Вместе с тем более детальный анализ препаратов векторных вакцин, выпускаемых ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, имеющих сходное происхождение, состав и фи-

зико-химические свойства, небольшой объем первичной упаковки, не обладающих антимикробным действием и не вызывающих визуальных изменений питательной среды, свидетельствует об отсутствии критических факторов, препятствующих проведению испытания стерильности этих препаратов альтернативным методом – методом мембранной фильтрации. На рисунке 2 представлен пример инкубирования векторной вакцины в условиях, предусмотренных требованиями НД. Посевы – прозрачные, пересев не требуется.

Методика не потребует введения дополнительной процедуры разведения образца, а также подбора специфической жидкости для промывки мембран. Еще одним аргументом в пользу возможности оценки контаминации данных вакцин с использованием методики на основе метода мембранной фильтрации является утвержденная и успешно используемая процедура испытания аналогичной по физико-химическим свойствам зарегистрированной вакцины для профилактики коронавирусной инфекции – Салнавак.

Испытание на стерильность единственной инактивированной вакцины КовиВак, представляющей собой очищенную концентрированную суспензию коронавируса SARS-CoV-2, согласно НД совершенно обоснованно проводят методом прямого посева в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность», используя соотношение количества испытуемого препарата и питательной среды 1:20. Для снижения эффекта помутнения питательной среды, связанного с наличием в составе препарата алюминия гидроксида, на 5–7 сут инкубирования проводят пересев на свежие питательные среды в том же соотношении (1:20) (рис. 3).

Многолетний опыт авторов в области экспертизы качества по показателю «Стерильность» адсорбированных инактивированных вирусных

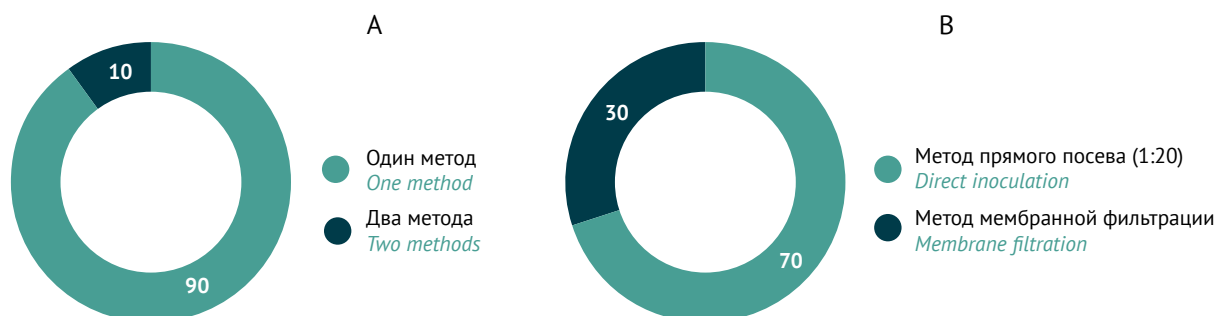


Рис. 1. А – количество (%) методов испытания, используемых для оценки качества вакцин для профилактики COVID-19 по показателю «Стерильность»; В – соотношение методов испытания, используемых для оценки вакцин для профилактики COVID-19 по показателю «Стерильность».

Fig. 1. A, number of test methods (%) used to assess the quality of prophylactic COVID-19 vaccines in terms of sterility; B, ratio of test methods used to assess the sterility of prophylactic COVID-19 vaccines.

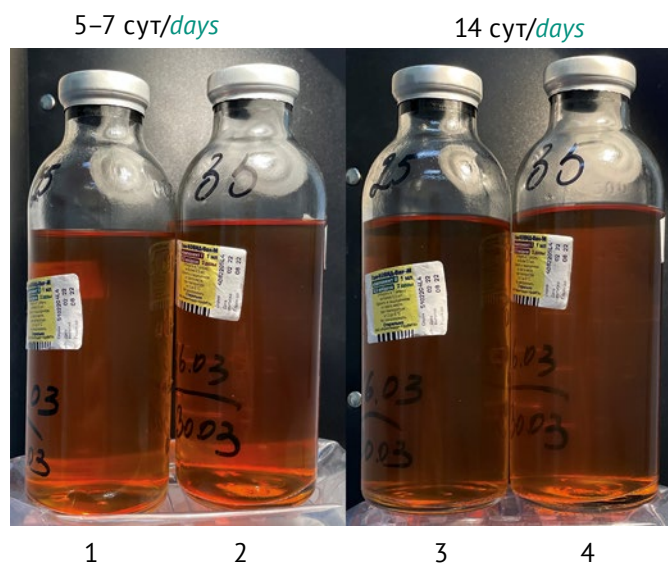


Рис. 2. Пример инкубирования образцов вакцины Гам-КОВИД-Вак-М на жидкой тиогликолевой среде на 5–7 и 14 сут при испытании на стерильность. 1, 3 – при температуре 25 °С и 2, 4 – при температуре 35 °С.

Fig. 2. Examples of incubation of Gam-COVID-Vac-M vaccine samples in a fluid thioglycollate medium observed on days 5–7 and day 14 of a sterility test. 1 and 3, at 25 °C; 2 and 4, at 35 °C.



Рис. 3. Пример инкубирования образцов вакцины КовиВак на 14 сут при испытании на стерильность. 1, 2 – посев и пересев при температуре 30–35 °С на жидкой тиогликолевой среде и 3, 4 – посев и пересев при температуре 20–25 °С на соево-казеиновой среде методом прямого посева.

Fig. 3. Examples of incubation of CoviVac vaccine samples observed on day 14 of a sterility test. 1 and 2, direct inoculation and subculture into a fluid thioglycollate medium at 30–35 °C; 3 and 4, direct inoculation and subculture into a soybean casein digest medium at 20–25 °C.

препаратов, в том числе таких, как Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная сухая¹⁵,

Клещ-Э-Вак (Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная)¹⁶, Вакцина

¹⁵ Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная сухая, ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия, РУ №: Р N002816/01. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹⁶ Клещ-Э-Вак (Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная), ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия, РУ №: ЛП-001584. <https://grls.rosminzdrav.ru>

гепатита В рекомбинантная дрожжевая¹⁷, в состав которых помимо инактивированных вирусных частиц входит также алюминия гидроксид, позволяет сделать вывод о теоретической возможности проведения испытания вакцины КовиВак методом мембранной фильтрации. Использование методики, разработанной на основе данного метода, исключит необходимость проведения процедуры пересева и значительно упростит учет результатов, поскольку компоненты препарата, вызывающие эффект помутнения, будут удалены в процессе фильтрации.

Адекватные методики на основе другого метода – метода мембранной фильтрации – разработаны для испытания двух препаратов: векторной и субъединичной вакцин, Салнавак и Конвасэл® соответственно. Выбор производителя вакцины Конвасэл® в пользу данного метода закономерно обусловлен непрозрачностью суспензии и наличием в составе препарата антибиотика, что требует особого внимания в случае использования метода прямого посева. Для устранения антимикробного действия препарата после фильтрации образца мембранные фильтры промывают раствором натрия хлорида 0,9%. Использование метода прямого посева для оценки микробиологического качества данных вакцин не предусмотрено. Однако, учитывая физико-химические свойства вакцины Салнавак и применимость этого метода для оценки качества рассмотренных нами аналогичных векторных вакцин, в случае необходимости возможна замена метода мембранной фильтрации и проведение испытания этого препарата по стандартной методике в рамках метода прямого посева.

Для контроля субъединичной вакцины Конвасэл® методика на основе метода прямого посева должна быть разработана более тщательно с учетом непрозрачности эмульсии и наличия в составе антибиотика канамицина. Логичным решением этих вопросов станет использование при посеве соотношения количества испытуемого образца и питательной среды 1:20 и проведение (при необходимости) процедуры пересева, позволяющей за счет снижения мутности более надежно интерпретировать результаты испытания.

Наиболее полно на сегодняшний день проведено исследование возможности проведения контроля на стерильность разработчиком препарата ЭпиВакКорона-Н. Испытание этого препарата согласно НД может быть проведено

любым из двух фармакопейных методов. Учитывая особенности состава, а именно наличие в суспензии препарата алюминия гидроксида, вызывающего диффузное помутнение питательной среды, при проведении испытания методом прямого посева в случае возникновения сомнений при предварительном учете результатов на 5–7 сут предусмотрен пересев на свежую тиогликолевую среду в соотношении 1:20. Наличие в составе препарата адсорбента не является препятствием для испытания препарата методом мембранной фильтрации, а возможное помутнение в этом случае устраняется промывкой мембранных фильтров стерильным 0,9% раствором натрия хлорида в количестве не более 100 мл, что позволяет исключить сомнения при учете результатов, когда визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов.

Очевидно, что, помимо утвержденного в НД метода прямого посева, аналогичный подход применим для оценки контаминации методом мембранной фильтрации идентичного по составу препарата того же производителя – ЭпиВакКорона, который был разработан и подан на регистрацию ранее. В настоящее время вакцина тестируется только методом прямого посева (рис. 4).

Наряду с определением возможности введения альтернативного метода в процедуру испытания исследуемых препаратов нами были рассмотрены способы усовершенствования уже разработанных методик, включая набор питательных сред и используемое при посеве соотношение количества испытуемого образца и питательной среды. В ходе анализа методик было установлено, что при выборе питательных сред для выявления аэробных бактерий и грибов большинство производителей (80%) справедливо отдают предпочтение только тиогликолевой среде, неоднократно подтвердившей свою более высокую чувствительность к обнаружению наиболее прихотливых микроорганизмов, и используют ее для инкубирования посевов при двух температурных режимах в качестве универсальной [6].

При подтверждении ростовых свойств в отношении тест-штаммов в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность¹⁸ тиогликолевая среда такого качества позволяет выявлять контаминацию аэробными и анаэроб-

¹⁷ Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая, ЗАО НПК «КОМБИОТЕХ», Россия, РУ №: Р N000738/01. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹⁸ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.



Рис. 4. Пример инкубирования образцов вакцины ЭпиВакКорона на 14 сут при испытании на стерильность в жидкой тиогликолевой среде. 1, 3 — посев и пересев при температуре 35 °С и 2, 4 — посев и пересев при температуре 25 °С.

Fig. 4. Examples of incubation of EpiVacCorona vaccine samples in a fluid thioglycollate medium observed on day 14 of a sterility test. 1 and 3, inoculation and subculture at 35 °C; 2 and 4, inoculation and subculture at 25 °C.

ными бактериями и грибами. К тому же такой подход имеет определенные преимущества перед методикой, предполагающей применение соево-казеиновой среды, не выпускаемой отечественными производителями. Именно поэтому процедура, применяемая для испытания вакцин Солнавак и Ковивак, может быть пересмотрена в пользу процедуры посева на одну тиогликолевую среду, соответствующую по ростовым свойствам требованиям ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность, предусмотренным в случае использования среды в качестве универсальной.

Учитывая, что испытание на стерильность является выборочным, а не сплошным контролем всех образцов серии препарата, и носит статистический характер, для повышения выявляемости контаминации при проведении испытания векторных вакцин методом прямого посева также может быть предложено рассмотрение возможности изменения соотношения испытуемой пробы и питательной среды (1:10), которое установлено большинством фармакопей для испытания образцов, не обладающих антимикробным действием¹⁹. Основные рекомендации по повышению надежности методик и достоверности результатов испытания вакцин для профилактики COVID-19 обобщены и приведены в *таблице 1*.

Таким образом, при последующем пересмотре нормативных документов, рекомендуемом, в частности Европейским агентством

по лекарственным средствам (EMA)²⁰, в случае обновления антигенного состава вакцин для профилактики коронавирусной инфекции, производители после оценки пригодности дополнительных методик могут внести соответствующие изменения в раздел «Стерильность».

Заключение

Анализ подходов к оценке качества зарегистрированных в Российской Федерации вакцин для профилактики COVID-19 свидетельствует о возможности усовершенствования процедуры их испытания по показателю «Стерильность». В качестве основных направлений рассматривается предложение разработки методики на основе альтернативного метода, и в первую очередь метода мембранной фильтрации, уменьшение соотношения объема препарата и питательной среды и применение для выявления бактерий и грибов одной универсальной тиогликолевой среды. Использование данных рекомендаций позволит повысить достоверность результатов и расширит возможности проведения испытания вакцин для профилактики коронавирусной инфекции как в процессе производства, так и при экспертизе с целью регистрации обновленных вариантов вакцин и при последующем их вводе в гражданский оборот. Предложенные подходы могут быть использованы для оценки качества по показателю «Стерильность» и других лекарственных средств.

¹⁹ The International Pharmacopoeia (First and Second Supl.). Tenth Edition, 2020. <https://digicollections.net/phint/2020/index.html#d/b.1>

²⁰ Variantopdatering af COVID-19-vaccinerne er i process. 4. juli 2022. <https://laegemiddelstyrelsen.dk/da/nyheder/2022/variantopdatering-af-covid-19-vaccinerne-er-i-proces/>

Литература/References

1. Харченко ЕП. Коронавирус SARS-Cov-2: особенности структурных белков, контагиозность и возможные иммунные коллизии. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2020;19(2):13–30. Kharchenko EP. The coronavirus SARS-Cov-2: the characteristics of structural proteins, contagiousness, and possible immune collisions. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020;19(2):13–30 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-13-30>
2. Zhang J, Zeng H, Gu J, Li H, Zheng L, Zou Q. Progress and prospects on vaccine development against SARS-CoV-2. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(2):153.
<https://doi.org/10.3390/vaccines8020153>
3. Петров ВИ, Герасименко АС, Горбатенко ВС, Шаталова ОВ, Пономарева АВ. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики COVID-19. *Лекарственный вестник*. 2021;15(2):3–9. Petrov VI, Gerasimenko AS, Gorbatenko VS, Shatalova OV, Ponomareva AV. Efficacy and safety of vaccines for the prevention of COVID-19. *Lekarstvennyj vestnik*. 2021;15(2):3–9 (In Russ.).
4. Пахомов ДВ. Вакцинопрофилактика COVID-19. *Практическая пульмонология*. 2020;(3):74–9. Pakhomov DV. Vaccine prevention of COVID-19. *Practical pulmonology*. 2020;(3):74–9 (In Russ.).
5. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ. Разработка подходов к проведению испытания гетерологичных сывороточных препаратов по показателю «Стерильность» методом мембранной фильтрации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(2):103–9. Sukhanova SM, Berdnikova ZE. Development of new approaches to sterility testing of heterologous serum products by membrane filtration method. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(2):103–9 (In Russ.).
6. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Захарова НЕ, Меркулов ВА. Испытание на стерильность иммунобиологических лекарственных препаратов в России. История вопроса и современные требования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):5–15. Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Zakharov NE, Merkulov VA. Sterility testing of immunobiological medicinal products in Russia. Historical background and current requirements. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):5–15 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-5-15>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.М. Суханова** – концепция исследования, написание текста рукописи, анализ и интерпретация материалов; формулировка выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **А.С. Тихонова** – анализ и обобщение данных литературы, написание текста рукописи; работа с табличным и иллюстративным материалом; **З.Е. Бердникова** – критический пересмотр, редактирование и переработка текста рукописи.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

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

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **S.M. Sukhanova** conceptualised the study, drafted the manuscript, analysed and interpreted the material, formulated the conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication. **A.S. Tikhonova** analysed and summarised literature data, drafted the manuscript, and prepared the tabular and graphical material. **Z.E. Berdnikova** critically reviewed the manuscript, edited and revised the text.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

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

Об авторах/Authors

Суханова Светлана Михайловна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6621-4384>
suhanovasm@expmed.ru

Тихонова Александра Сергеевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7281-1249>
alehina@expmed.ru

Бердникова Зинаида Евтропиевна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-4250>
berdnikova@expmed.ru

Svetlana M. Sukhanova, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6621-4384>
suhanovasm@expmed.ru

Aleksandra S. Tikhonova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7281-1249>
alehina@expmed.ru

Zinaida E. Berdnikova, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-4250>
berdnikova@expmed.ru

Поступила 29.11.2022

После доработки 02.02.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Received 29 November 2022

Revised 2 February 2023

Accepted 13 March 2023