

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Стерильность

ОФС.1.2.4.0003.15

Взамен ГФ XII ОФС 42-0066-07

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы испытания на стерильность различных лекарственных средств (ЛС) – препаратов для инъекций, инфузий, глазных капель, пленок, фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, включая биологические лекарственные препараты и их растворители, которые в соответствии с нормативной документацией или фармакопейными статьями должны быть стерильными.

Условия проведения испытания

Испытание на стерильность проводят в асептических условиях в ламинарных установках, чистых помещениях или изоляторах класса чистоты А. Меры, предотвращающие контаминацию, не должны оказывать губительного влияния на микроорганизмы, которые могут содержаться в испытуемых образцах иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП). Условия проведения испытания регулярно контролируют в соответствии с соблюдением надлежащих правил производства и лабораторной практикой.

Методы испытания стерильности

Испытание на стерильность проводят двумя методами: методом прямого посева или методом мембранной фильтрации. Метод мембранной

фильтрации используют во всех случаях, когда природа препарата, его физико-химические свойства позволяют фильтровать его через мембранные фильтры.

Метод прямого посева используют для испытания на стерильность ЛС, не обладающих антимикробным действием или антимикробное действие которых можно устранить разведением или инактивированием, а также для препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

При испытании на стерильность параллельно проводятся соответствующие отрицательные контроли.

1. Проверка пригодности методики испытания (определение антимикробного действия)

Проверку пригодности методики испытания на стерильность следует проводить в следующих случаях:

- а) при проведении испытания на стерильность нового препарата;
- б) при внесении любых изменений в экспериментальные условия испытания;
- в) в случае изменения состава препарата или при изменениях в технологии его производства.

Для проверки антимикробного действия используют те же тест-штаммы, что и при оценке ростовых свойств питательных сред (Таблица 3).

Определение антимикробного действия проводят теми же методами и в тех же условиях, что и испытание на стерильность.

Мембранная фильтрация. Проверка пригодности (определении антимикробного действия) может выполняться одновременно с испытанием на стерильность испытуемого препарата (п. 2.2.). После переноса требуемого количества испытуемого препарата на фильтр в последнюю порцию жидкости для промывания вносят не более 100 колониеобразующих единиц (КОЕ) тест-штаммов микроорганизмов (п. 2.2.8.).

Прямой посев. При проверке пригодности (определении антимикробного действия) готовят взвеси тест-штаммов с конечной

концентрацией не более 100 КОЕ в 1 мл. Испытание проводят с каждым видом микроорганизмов.

Используют по 4 пробирки для каждого тест-штамма с 10 или 20 мл (для ИЛП) соответствующей питательной среды. В первые две пробирки с культурой микроорганизма вносят по 1 мл испытуемого образца, а в две другие – по 1 мл растворителя (положительный контроль). Во все четыре пробирки вносят по 1 мл соответствующего тест-штамма.

Посевы на тиогликолевой среде инкубируют при температуре $32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ в течение 3 сут. Посевы на жидкой соево-казеиновой среде или жидкой среде Сабуро инкубируют при температуре $22,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ в течение 5 сут.

Учет результатов проводят визуально в проходящем свете, сравнивая рост тест-штаммов микроорганизмов в опытных и контрольных посевах. Если обнаруженный рост в опытных пробирках визуально сравним с ростом в контрольных посевах, не содержащих испытуемый препарат, делают вывод о том, что препарат в условиях испытания не обладает антимикробным действием. В этом случае испытание на стерильность проводят стандартными методами.

В случае если в контроле наблюдают рост тест-штамма, а в опыте рост отсутствует, считают, что испытуемый препарат обладает антимикробным действием, которое следует устранить.

1.1. Устранение антимикробного действия препарата

Для устранения антимикробного действия препарата используют следующее:

А) Увеличивают разведение препарата, взяв больший объем растворителя/разбавителя/питательной среды (но не более 200 мл). Для ИЛП допускается только разбавление питательной средой.

Экспериментально установленное соотношение объемов питательной среды и посевного материала, обеспечивающее нейтрализацию антимикробного действия препарата, должно соблюдаться при испытании препарата на стерильность.

Б) Применяют метод мембранной фильтрации с последующим промыванием фильтров, если препарат растворим в водных разбавителях или в изопропилмиристате (ИПМ).

В) Вместо стандартного разбавителя можно использовать стерильную нейтрализующую жидкость, промышленного производства или приготовленную в лаборатории, следующего состава:

- Твина-80 -30,0 г
 - Лецитина яичного -3,0 г
 - L-гистидина гидрохлорида -1,0 г
 - Пептона (мясного или казеинового) -1,0 г
 - Натрия хлорида -4,3 г
 - Калия фосфата однозамещенного -3,6 г
 - Натрия фосфата двузамещенного -7,2 г
 - Воды очищенной -1000 мл
- pH 7,0±0,2

Г) Используют неспецифические инактиваторы. Для инактивации консервантов, входящих в состав ряда лекарственных препаратов, в разбавитель и/или в питательные среды до стерилизации вносят следующие неспецифические инактиваторы: 3% твина-80 или 0,3% лецитина (яичного или соевого) от объема среды. В случае, если в препарате имеется более двух консервантов различной химической структуры, в среду вносят 3% твина-80, 0,3% лецитина, 0,1% L-гистидина и 0,5% натрия тиосульфата одновременно. Если разведение в вышеприведенном растворе не инактивирует антимикробные свойства ЛС, увеличивают концентрацию твина-80 или лецитина.

Некоторые инактиваторы антимикробного действия ЛС указаны в Таблице 4 ОФС «Микробиологическая чистота».

Учитывая, что в состав тиогликолевой среды входит тиогликолят натрия – инактиватор ртутных соединений, перед проведением испытаний

ИЛП, содержащих ртутные консерванты, методом прямого посева, проводят определение нейтрализующих свойств этой среды, подтверждающих инактивацию.

Для нейтрализации действия других консервантов, входящих в состав ИЛП, инактиваторы не используются, а основным способом устранения их действия является разведение питательной средой. Посев испытуемого препарата в питательную среду проводят в соотношении 1:20, с учетом результатов определения антимикробного действия препарата.

Д) Применяют специфические инактиваторы, нейтрализующие антимикробное действие ЛС, но не угнетающие рост микроорганизмов.

Для инактивации пенициллинов и цефалоспоринов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды перед их применением, асептически вносят стерильный раствор β -лактамазы в количестве, указанном в фармакопейной статье или нормативной документации.

Ингибирующее действие β -лактамазы на пенициллины и цефалоспорины необходимо определять, внося в среды с ферментом и антибиотиком от 50 до 100 КОЕ *S.aureus*. Типичный рост тест-штамма в питательной среде служит подтверждением того, что концентрация фермента β -лактамазы достаточна.

Для инактивации сульфаниламидных препаратов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды, если необходимо, до стерилизации вносят парааминобензойную кислоту (ПАБК) из расчета 0,05 - 0,1 г/л среды.

При разработке новых препаратов в фармакопейную статью и нормативную документацию следует включать сведения о наличии/отсутствии антимикробного действия препарата с рекомендациями по его устранению и информацию о методе его испытания на стерильность.

В случае изменения технологического процесса или состава препарата необходимо подтвердить отсутствие антимикробного действия.

2. ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

2.1. Отбор образцов для испытания

При проведении испытания на стерильность число контролируемых первичных упаковок определяется с учетом общего количества единиц в серии. Отбирают образцы препарата, как указано в Таблице 1.

Испытание на стерильность в процессе производства ИЛП проводят в соответствии с регламентом производства.

При необходимости, могут быть регламентированы особые требования в отношении необходимого количества контролируемых емкостей, обеспечивающие надежность контроля стерильности препарата.

Для посева на соответствующую питательную среду используют образец в количестве, приведенном в Таблице 2.

Таблица 1 - Количество единиц препарата для проведения испытания на стерильность в зависимости от объема серии

Количество единиц (ампул, флаконов и др.) в серии*	Минимальное количество единиц (ампул, флаконов и др.) для посева на каждую питательную среду**
Лекарственные средства	
1.Парентеральные лекарственные средства:	
• Не более 100	10 % или 4
• От 100 до 500	10
• Более 500	2 % или 20
• Парентеральные лекарственные средства большого объема (более 100)	2 % или 10
• Антибиотики, твердые формы, ангро, (более 5 г)	6
2.Неинъекционные лекарственные средства (в том числе глазные):	
• Не более 200	5 % или 2
• Более 200	10
• Препараты в однодозовой упаковке	См. графу «Парентеральные лекарственные средства»
3.Твердые формы, ангро:	
• Не более 4 упаковок	Каждую
• Свыше 4, но не более 50	20 % или 4
• Свыше 50	2 % или 10

* если количество единиц в серии неизвестно, то используют максимальное количество, указанное в колонке.

** если содержимого одной емкости ЛС (кроме ИЛП) достаточно для инокулирования двух питательных сред, то в этой колонке приводится количество образцов, необходимых для испытания на стерильность на двух питательных средах.

Таблица 2 - Минимальное количество испытуемого препарата для посева на питательные среды

Количество препарата в первичной упаковке	Минимальное количество препарата для посева на каждую питательную среду
Жидкие	
• Менее 1 мл	весь объем первичных упаковок, объединенных до 1 мл
• 1 – 40 мл	½ содержимого, но не менее 1 мл
• 40 – 100 мл	20 мл
• более 100 мл	10 % содержимого, но не менее 20 мл
• Антибиотики (жидкости)	1 мл
• Другие препараты, растворимые в воде или ИПМ	содержимое упаковки, но не менее 200 мг
Нерастворимые препараты, мази и кремы, поддающиеся эмульгированию или суспендированию	содержимое упаковки, но не менее 200 мг
Твердые	
• Менее 50 мг	все содержимое
• 50 - 300 мг	½ содержимого, но не менее 50 мг
• 300 мг – 5 г	150 мг
• более 5 г	500 мг

2.2. Метод мембранной фильтрации

При определении стерильности ЛС, обладающих выраженным антимикробным действием, и ЛС в емкостях вместимостью более 100 мл, предпочтительным является метод мембранной фильтрации. Исключение составляют препараты с антимикробным действием, нерастворимые в водных разбавителях или ИПМ.

Процедура испытания на стерильность методом мембранной фильтрации состоит из следующих основных стадий: смачивание мембран, подготовка образцов и фильтрация содержимого всех емкостей через мембранные фильтры, отмывка мембранных фильтров соответствующим стерильным раствором, добавление питательной среды и инкубирование посевов.

Испытание выполняют с использованием фильтрационных установок открытого или закрытого типа, позволяющих в асептических условиях переносить и фильтровать испытуемый препарат через мембранные фильтры (внешний диаметр 47 мм; диаметр пор 0,45 мкм), способные улавливать микроорганизмы. Фильтрационная установка открытого типа должна быть смонтирована таким образом, чтобы испытуемый образец можно было внести и профильтровать в условиях асептики. После окончания фильтрации мембрану асептически переносят в питательную среду. При использовании закрытой стерильной системы с мембраной, вмонтированной в канистру, после фильтрации питательную среду вносят непосредственно в канистру на мембрану. Фильтры из нитратцеллюлозы используют для водных, масляных и слабых спиртовых растворов, фильтры из ацетатцеллюлозы – для концентрированных спиртовых растворов и кислот. Гидрофобный край фильтра и низкая сорбционная способность обеспечивают эффективную отмывку мембраны и сводят к минимуму адсорбцию препарата, обладающего антимикробным действием.

Для препаратов, не обладающих антимикробным действием, можно использовать фильтры без гидрофобного края, смачивая их перед фильтрацией используемым разбавителем.

Если испытуемый препарат не обладает антимикробным действием, в ходе испытания возможно исключить процедуру промывания фильтров.

2.2.1. Испытание водных растворов ЛС

Определенный объем препарата, стерильно отобранный из всех образцов, перемешивают и асептически переносят на один или несколько предварительно смоченных фильтров. Фильтры асептически снимают с фильтродержателя и помещают в среды или заливают их в емкости с фильтродержателями. При использовании замкнутой системы канистры заполняют равным объемом сред. При этом следует избегать аэрации тиогликолевой среды.

2.2.2. Испытание жидких препаратов, не смешивающихся с водой

Испытание проводят так же, как и для водных растворов ЛС. При испытании вязких жидкостей к общей пробе перед фильтрацией асептически добавляют достаточное количество подходящего стерильного растворителя для увеличения скорости фильтрации.

Если в состав испытуемого препарата входит лецитин, масло или консервант, а сам препарат обладает антимикробным действием, для промывания фильтров используют жидкость №2.

2.2.3. Пробоподготовка мазей, кремов, растворимых в ИПМ, и растворов в маслах

Мази на жировой основе и эмульсии типа «вода в масле» растворяют в ИПМ, предварительно простерилизованном методом фильтрации (мембрана с диаметром пор 0,22 мкм). Стерильный разбавитель/растворитель и, если необходимо, испытуемый препарат, непосредственно перед фильтрацией нагревают до температуры не более 44° С. Первоначально через мембрану пропускают стерильный ИПМ в количестве 5 мл. Затем фильтруют раствор препарата в ИПМ. Для максимальной эффективности процесса во время фильтрации над фильтром постоянно должен быть слой раствора. После фильтрации мембрану промывают тремя порциями жидкости №2 по 100 мл каждая. Испытание проводят на питательных средах с добавлением 1 г/л твина-80.

Если в состав испытуемого препарата входит вазелин, для промывания фильтров используют жидкость №3. Перед началом фильтрации через фильтр пропускают 5,0 мл стерильного ИПМ. Для максимальной эффективности процесса во время фильтрации над фильтром постоянно должно быть небольшое количество теплого раствора. После фильтрации образца фильтр промывают тремя порциями жидкости №3 по 100 мл каждая. Фильтры помещают в питательные среды, как указано ранее.

Если препарат представляет собой раствор в масле, фильтр и установка перед применением должны быть тщательно высушены.

2.2.4. Испытание препаратов в шприц-тюбиках

Содержимое каждого шприц-тюбика переносят в установки для мембранной фильтрации или собирают общую пробу в стерильную пробирку для последующего переноса на фильтр.

2.2.5. Испытание твердых форм лекарственных средств для инъекций (кроме антибиотиков)

Препарат разводят, как указано в инструкции по применению, и проводят испытание согласно методике, приведенной в разделах 2.2.1. и 2.2.2.

2.2.6. Испытание стерильных аэрозольных препаратов

Требуемое количество препарата в аэрозольной упаковке асептически переносят в стерильную колбу нажатием на шток распылительного клапана. Если возможно, удаляют пропеллент путем испарения. Добавляют в колбу жидкость №2 и осторожно перемешивают. Испытание проводят, как указано в разделах 2.2.1. и 2.2.2.

2.2.7. Жидкости для промывания мембранных фильтров при испытании лекарственных средств, обладающих антимикробным действием

Для промывания фильтров можно использовать любую стерильную жидкость, не подавляющую рост микроорганизмов:

- 0,9% раствор натрия хлорида рН $7,0 \pm 0,2$ (после стерилизации).
- Жидкость №1: растворяют 1 г ферментативного пептона в 1000 мл воды, фильтруют или центрифугируют для осветления, разливают в сосуды и стерилизуют; рН $7,0 \pm 0,2$.

При фильтрации образцов пенициллинов или цефалоспоринов (если необходимо) к жидкости №1 добавляют валидированное количество β -лактамазы, указанное в фармакопейной статье и нормативной документации, достаточное для инактивации остаточного антимикробного действия антибиотика на фильтре.

- Жидкость №2: добавляют 1 мл твина-80 к 1000 мл жидкости №1, разливают в сосуды и стерилизуют; рН $7,0 \pm 0,2$

- Жидкость №3: растворяют 5 г ферментативного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твина-80 в 1000 мл воды, разливают во флаконы и стерилизуют; рН $7,0 \pm 0,2$.

При испытании ИЛП промывку мембранных фильтров можно проводить любым стерильным раствором, не подавляющим рост микроорганизмов, использованным при определении антимикробного действия препарата, например: 0,9 % раствор натрия хлорида (рН $7,0 \pm 0,2$) или жидкость № 1.

2.2.8. Проверка пригодности метода мембранной фильтрации при испытании ЛС, обладающих антимикробным действием

Фильтруют объем испытуемого образца, используя для одного фильтра то же количество единиц (ампул, флаконов и т.д.), что и в испытании на стерильность (Таблица 2). Фильтр промывают, как минимум, тремя порциями соответствующей жидкости по 100 мл каждая. В последнюю порцию жидкости для промывания вносят по 1 мл приготовленных взвесей тест-штаммов микроорганизмов (каждого в отдельности) с концентрацией 100 КОЕ/мл (Таблица 3).

Фильтр помещают в емкость со 100 мл соответствующей питательной среды или добавляют среду в канистру замкнутой системы. Посевы инкубируют при соответствующей температуре в течение не более 3 сут для бактерий и 5 сут для грибов.

В ходе учета результатов определяют визуально в проходящем свете наличие роста тест-штаммов микроорганизмов. В случае обнаружения роста считают, что антимикробное действие полностью инактивировано и проводят испытание на стерильность, используя то же количество препарата, аналогичный объем жидкости для промывания и те же питательные среды.

Если рост тест-штаммов микроорганизмов отсутствует, делают вывод, что антимикробное действие препарата не инактивировано. Испытание повторяют, увеличивая объем жидкости для промывания фильтра (но не более 500 мл) или используют другие способы нейтрализации (п. 1.1).

2.3. Метод прямого посева

Метод прямого посева используют для испытания на стерильность ЛС, не обладающих антимикробным действием, или тех препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

В том случае, если препарат обладает антимикробным действием в условиях испытания, его нейтрализуют путем добавления подходящих инактиваторов или увеличивая объем питательной среды (п. 1.1). Добавляемый инактиватор в заданной концентрации не должен подавлять рост тест-штаммов. При необходимости инактиватор можно добавлять и в питательную среду.

Испытуемые образцы засевают непосредственно в питательные среды в соотношении 1:10 или 1:20. Соотношение количества испытуемого материала и используемой питательной среды должно быть определено при проверке антимикробного действия препарата.

Для ИЛП, вызывающих помутнение питательной среды (препараты, содержащие сорбент, микробные клетки и др.), когда визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов или возникают сомнения при учете результатов, посев производят по указанной выше схеме, а на 5-7 сут производят пересев на свежую питательную среду. Все посева выдерживают при адекватной температуре до окончания инкубации (14 сут со дня первичного посева).

2.3.1. Испытание нефилтрующих жидкостей

Из определенного количества флаконов, ампул и т.д. (Таблица 1) асептически отбирают объем препарата, достаточный для посева на питательные среды в соотношении 1:10. После посева аккуратно перемешивают среду, исключая аэрацию.

2.3.2. Испытание мазей, кремов и растворов в маслах

От каждой испытуемой серии отбирают необходимое количество единиц (Таблица 1).

Растворы в маслах. Готовят эмульсию препарата в разведении 1:10, помещая в стерильную колбу, содержащую соответствующий стерильный разбавитель, стеклянные бусы диаметром 5-6 мм, и, при необходимости, определенное количество твина-80.

Посевы растворов в маслах ежедневно аккуратно перемешивают.

Мази и кремы. Тубы (флаконы) перед испытанием дезинфицируют, вскрывают их асептически и первую порцию препарата удаляют, не исследуя.

Мази и кремы, легко эмульгируемые в воде. Готовят разведение ЛС 1:10, помещая образец в стерильную колбу с соответствующим стерильным разбавителем (например, раствором 0,9% натрия хлорида или жидкостью №1) и стеклянными бусами диаметром 5-6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры 40°C и энергично встряхивают в течение 5-15 минут до получения гомогенной эмульсии, которую высевают в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро.

Мази и кремы, трудно смешиваемые с водой. Готовят разведение препарата 1:10, помещая в стерильную колбу с соответствующим стерильным разбавителем (например, раствором 0,9% натрия хлорида или жидкостью №3), твином-80 в количестве 50% от массы навески и стеклянными бусами диаметром 5-6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры 40°C (в исключительных случаях до температуры 45°C), энергично встряхивают в течение 5-15 мин (максимально 30 мин), до получения гомогенной эмульсии, которую затем высевают в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро.

2.3.3. Испытание твердых форм

ЛС в виде порошка переносят в количестве, указанном в Таблице 2, в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро и осторожно перемешивают. Если в образец добавлен стерильный растворитель, то испытанию на стерильность подвергают полученную суспензию.

2.4. Условия инкубации посевов

Посевы инкубируют не менее 14 сут при температуре $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ в жидкой тиогликолевой среде и при температуре $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ в жидких соево-казеиновой среде или среде Сабуро (независимо от метода посева).

При испытании ИЛП возможно использование только тиогликолевой среды и инкубирование посевов при двух температурных режимах $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ и $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.

2.5. Учет и интерпретация результатов испытания

Во время инкубации периодически просматривают посевы. Наличие роста микроорганизмов определяют визуально в проходящем свете. Если испытуемое ЛС вызывает помутнение питательной среды и визуально нельзя определить наличие или отсутствие микробного роста, через 14 сут после начала испытания переносят не менее 1 мл помутневшей среды в пробирки с аналогичной стерильной средой. Инкубируют исходные и повторные посевы. Общее время инкубации должно составлять не менее чем $14 + 4$ сут от начала испытания.

Для ИЛП, вызывающих помутнение питательной среды, пересев на аналогичную питательную среду производится на 5-7 сут с последующей инкубацией 14 сут со дня первичного посева.

При отсутствии роста микроорганизмов, считают, что испытуемый препарат соответствует требованиям испытания на стерильность.

При обнаружении роста микроорганизмов, определяемого визуально по наличию мутности, осадка, хлопьев и других изменений среды и подтверждаемого микроскопическим исследованием, считают, что испытуемый препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность. В этом случае проводят расследование причин несоответствия.

Результаты испытания на стерильность могут быть признаны недостоверными в случае, если выполняется одно или несколько условий, приведенных ниже:

- 1) получены неудовлетворительные результаты микробиологического контроля окружающей среды (воздушной среды, поверхностей и рук персонала и др.) при проведении испытания на стерильность;
- 2) выявлены ошибки, допущенные в ходе испытания;
- 3) обнаружен рост микроорганизмов в отрицательном контроле (контроль стерильного растворителя/разбавителя или питательной среды);
- 4) питательная среда нестерильна и/или её ростовые свойства неудовлетворительны;
- 5) выявлены ошибки в ходе процесса стерилизации материалов.

Если результаты испытания признаны недостоверными (в случае обнаружения ошибок в ходе анализа), тест повторяют на том же количестве образцов, что и первоначально, исключая препараты ИЛП, повторное испытание которых проводят на удвоенном количестве образцов.

Если в результате повторного испытания не обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат соответствует требованиям испытания на стерильность. Если в результате повторного испытания обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность.

Если в ходе расследования доказана правильность выполнения теста на стерильность, считают, что препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность.

3. Питательные среды

Для испытания на стерильность используют жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро. Тиогликолевую среду применяют для выявления аэробных и анаэробных бактерий. Жидкую соево-казеиновую среду – для выявления грибов и аэробных бактерий. Жидкую среду Сабуро используют для выявления грибов.

При испытании на стерильность ИЛП не рекомендуется использовать жидкую среду Сабуро.

При испытании на стерильность ИЛП, в том числе, содержащих ртутные консерванты, допустимо использование только тиогликолевой среды в качестве универсальной для выявления аэробных и анаэробных бактерий и грибов (при условии предварительного определения её ростовых и нейтрализующих свойств с использованием тест-микроорганизмов в соответствии с Таблицей 3). Инкубацию посевов осуществляют при двух температурных режимах.

3.1. Приготовление питательных сред

Питательные среды готовят в лаборатории, используя сухие питательные среды промышленного производства или отдельные компоненты. Допускается применение сред, готовых к использованию, с сертификатом производителя. Приготовленные в лаборатории питательные среды проверяют на стерильность и определяют их ростовые свойства.

Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 121°C в течение 15 мин, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Тиогликолевая среда

- L-цистина - 0,5 г
- Натрия хлорида - 2,5 г
- Глюкозы моногидрата - 5,5 г
- Агара микробиологического (влажность не более 15 %) - 0,75 г
- Дрожжевого экстракта (водорастворимого) - 5,0 г
- Панкреатического гидролизата казеина - 15,0 г
- Натрия тиогликолята - 0,5 г
- или кислоты тиогликолевой - 0,3 г
- Раствора резазурина натрия (1:1000), свежеприготовленного - 1,0 мл
- Воды очищенной - 1000,0 мл

рН после стерилизации $7,1 \pm 0,2$.

Добавляют в воду очищенную L-цистин, агар микробиологический, натрия хлорид, глюкозу, водорастворимый дрожжевой экстракт и панкреатический гидролизат казеина и нагревают до полного растворения. После этого вносят натрия тиогликолят или тиогликолевую кислоту и, если необходимо, доводят рН среды 1М раствором натрия гидроксида до необходимого значения. Добавляют раствор резазурина, перемешивают, разливают в пробирки соответствующего объема и стерилизуют.

Жидкая соево-казеиновая среда

- Панкреатического гидролизата казеина - 17,0 г
- Папаинового гидролизата соевой муки - 3,0 г
- Натрия хлорида - 5,0 г
- Калия фосфата двузамещенного - 2,5 г
- Глюкозы - 2,5 г
- Воды очищенной - 1000,0 мл

рН после стерилизации $7,3 \pm 0,2$

Компоненты растворяют в воде (если необходимо – при нагревании). Охлаждают при комнатной температуре. Если требуется, добавляют 1М раствор натрия гидроксида, чтобы после стерилизации значение рН среды было $7,3 \pm 0,2$. Фильтруют для получения прозрачной среды, разливают в пробирки и стерилизуют.

Жидкая среда Сабуро

- Пептона ферментативного - 10,0 г
- Глюкозы моногидрата - 40,0 г
- Воды очищенной - 1000,0 мл

рН после стерилизации $5,6 \pm 0,2$

Пептон и глюкозу добавляют в воду очищенную и полностью растворяют при слабом нагревании. Охлаждают до комнатной температуры и доводят рН до требуемого значения. Если необходимо, фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют.

Допускается, чтобы состав сухих и готовых к применению сред промышленного производства различался, при условии их соответствия требованиям по ростовым свойствам.

3.2. Стерильность питательных сред

После стерилизации не менее 5% емкостей от каждой партии питательной среды помещают в термостат и инкубируют в течение как минимум 14 сут для контроля стерильности параллельно с посевом испытуемого образца на стерильность. Рост микроорганизмов должен отсутствовать.

3.3. Определение ростовых свойств питательных сред

Ростовые свойства сред определяют для каждой серии питательной среды, выпущенной промышленностью и имеющей номер, и для каждой партии среды, изготовленной в лаборатории.

Каждый вид микроорганизма в количестве 10-100 КОЕ/мл вносят в отдельную порцию испытуемой среды (в 2 пробирки). Инкубируют в соответствии с условиями, указанными в Таблице 3. Если в течение необходимого времени инкубации в инокулированных средах визуально отмечается рост микроорганизмов, среду считают пригодной для использования.

3.3.1. Подготовка тест-штаммов микроорганизмов

Используют тест-штаммы бактерий и грибов из специализированных коллекций, которые должны быть типичными по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам.

Число пассажей рабочих культур не должно превышать пяти.

Перед испытанием культуры аэробных бактерий высевают на скошенный соево-казеиновый агар, среду №1 или другую адекватную плотную питательную среду; культуры грибов *C.albicans* и *A. brasiliensis* – на скошенный агар Сабуро (или среду №2); культуры анаэробов *Clostridium novyi* и *C. sporogenes** – на среды для анаэробных микроорганизмов

(например, жидкую тиогликолевую) и инкубируют при соответствующей температуре.

* Возможен высев культуры на среды для аэробов при условии инкубации в анаэроостате.

3.3.2. Приготовление инокулята

Выросшие культуры тест-штаммов бактерий (в том числе, *C. sporogenes*, выращенную в анаэробных условиях) и *C. albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным 0,9% раствором натрия хлорида. Готовят взвесь каждого тест-штамма, соответствующую 10 ЕД по оптическому стандартному образцу мутности.

Таблица 3 - Тест-штаммы микроорганизмов, используемые для определения ростовых свойств питательных сред и проверки антимикробного действия препарата*

Питательные среды	Тест-штаммы микроорганизмов	Условия инкубации	
		Температура	Время
Жидкая тиогликолевая среда	Аэробные бактерии:	32,5 ± 2,5°C	3 сут
	<i>Bacillus subtilis</i> ГКПМ 010011, ATCC 6633 или <i>Bacillus cereus</i> ГКПМ 010014, ATCC 10702		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ГКПМ 201108, ATCC 6538		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ГКПМ 190155, ATCC 9027		2 сут
	<i>Alcaligenes faecalis</i> 415** ГКПМ 300205		
	Анаэробные бактерии:		3 сут
	<i>Clostridium sporogenes</i> 272 ГКПМ 300524, ATCC 19404		
	<i>Clostridium novyi</i> 198** ГКПМ 242484		2 сут
	Грибы**:		22,5 ± 2,5°C
<i>Candida albicans</i> NCTC885-653, ATCC 10231			
Жидкая соево-казеиновая среда	Аэробные бактерии:	32,5 ± 2,5°C	3 сут
	<i>Bacillus subtilis</i> ГКПМ 010011, ATCC 6633 или <i>Bacillus cereus</i> ГКПМ 010014, ATCC 10702		
	Грибы:	22,5 ± 2,5°C	5 сут
<i>Candida albicans</i> NCTC 885-653, ATCC 10231			

	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642, ATCC 16404		
Жидкая среда Сабуро	Грибы:	22,5 ± 2,5°C	5 сут
	<i>Candida albicans</i> NCTC 885-653, ATCC 10231		
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642, ATCC 16404		

*могут быть использованы и другие тест-штаммы из различных коллекций, типичные по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Набор тест-штаммов может быть изменен в зависимости от способа применения или состава испытуемого препарата.

** обозначены тест-штаммы для случаев использования тиогликолевой среды в качестве универсальной при испытании ИЛП. Культивирование производят при двух температурных режимах $-32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ и $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$.

Концентрацию клеток *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis* доводят до 1×10^7 КОЕ/мл; *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. sporogenes*, *A. faecalis* – до 1×10^9 КОЕ/мл. Культуру *C. novyi*, выращенную на жидкой среде культивирования для анаэробных микроорганизмов (2 пересева), после центрифугирования 3000 об/мин в течение 20 мин разводят стерильной жидкостью следующего состава:

- натрия хлорид - 8,5 г,
- кислота тиогликолевая - 0,3 мл,
- вода очищенная - 1000 мл,

pH $7,2 \pm 0,2$ после стерилизации

Для смыва конидий *A. brasiliensis* используют стерильный 0,9% раствор натрия хлорида, содержащий 0,05% твина-80. Количество конидий в 1 мл смыва определяют с помощью камеры Горяева или посевом подходящего разведения на агар Сабуро или среду №2.

Стандартизованные взвеси бактерий и грибов доводят стерильным 0,9% раствором натрия хлорида методом последовательных десятикратных разведений до концентрации 10-100 КОЕ/мл для посева в жидкие и полужидкие питательные среды для определения их ростовых свойств.

Для подтверждения полученной концентрации инокуляты бактерий, в том числе, *C. sporogenes* (при условии инкубации последнего в анаэроостате), высевают на соево-казеиновый агар (среду №1 или специализированную среду для клостридий соответственно) по 0,1 мл из взвеси с концентрацией 10^3 КОЕ/мл, *C. novyi* – на специальную среду для клостридий. Инокуляты грибов высевают на агар Сабуро (или среду №2).

3.4. Определение нейтрализующих свойств тиогликолевой среды

При проведении испытаний ИЛП, содержащих мертиолят (тиомерсал), для определения нейтрализующих свойств тиогликолевой среды используют тест-штамм *Alcaligenes faecalis* 415 (подготовка инокулята см п. 3.3.2.) Предварительно перед посевом культуры в каждую пробирку в середину столбика с тиогликолевой средой вносят по 0,5 мл свежеприготовленного 0,01% раствора тиомерсала, разведенного стерильным 0,9% раствором натрия хлорида.

Тиогликолевую среду признают пригодной по нейтрализующим свойствам, если не позднее 5 суток инкубации посевов при температуре $32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ визуально обнаруживается рост тест-штамма *A. faecalis* 415.

3.5. Хранение питательных сред

Приготовленные в лаборатории среды хранят при температуре от 2 до 25°C в защищенном от света месте в течение не более 1 мес или в течение иного срока, подтвержденного в ходе валидационных испытаний.

В случае, если при хранении тиогликолевой среды, содержащей резазурин, верхний слой среды (более 1/3 объема) окрасится в розовый цвет, среду можно регенерировать нагреванием на кипящей водяной бане в течение 10-15 мин до исчезновения розовой окраски с последующим быстрым охлаждением. Если окраска не исчезает после нагревания, среду считают непригодной к применению. Регенерацию среды можно проводить только один раз.

Питательные среды промышленного производства, готовые к использованию, хранят в плотно закупоренных емкостях при условии сохранения их стерильности и ростовых свойств в течение срока годности.

Сухие питательные среды промышленного производства хранят в соответствии с инструкцией по применению и уничтожают по истечении срока годности, указанного производителем.