ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 11737-1— 2022

Стерилизация медицинской продукции

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Часть 1

Определение популяции микроорганизмов на продукции

(ISO 11737-1:2018 + Amd 1:2021, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2022

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Ассоциацией специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 380 «Клинические лабораторные испытания и диагностические тест-системы ин витро»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 ноября 2022 г. № 1265-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 11737-1:2018 «Стерилизация медицинской продукции. Микробиологические методы. Часть 1. Определение популяции микроорганизмов в продукции» (ISO 11737-1:2018 «Sterilization of health care products — Microbiological methods — Part 1: Determination of a population of microorganisms on products», IDT), включая изменение Amd 1:2021.

Изменения к настоящему стандарту, принятые после его официальной публикации, внесены в текст настоящего стандарта и выделены двойной вертикальной линией, расположенной на полях от соответствующего текста, а обозначение и год принятия изменения приведены в скобках после соответствующего текста.

Международный стандарт разработан Техническим комитетом ISO/TC 198 «Стерилизация медицинских изделий».

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные и межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© ISO, 2018
© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2022

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Общие положения 4
5 Выбор продукта 4
6 Методы определения и микробиологическая характеристика биологической нагрузки 5
7 Валидация метода определения биологической нагрузки 6
8 Рутинное определение биологической нагрузки и интерпретация данных 6
9 Использование метода определения биологической нагрузки 7
Приложение А (справочное) Руководство по определению популяции микроорганизмов в продукте 8
Приложение В (справочное) Руководство по методам определения биологической нагрузки 21
Приложение С (справочное) Валидация эффективности восстановления биологической нагрузки . . 29
Приложение D (справочное) Типичное распределение обязанностей 36
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным и межгосударственным стандартам 38
Библиография 39

Введение

Стерильная медицинская продукция — это продукция, которая не содержит жизнеспособных микроорганизмов. В соответствии с требованиями стандартов относительно валидации и рутинного контроля процессов стерилизации необходима поставка стерильного медицинского изделия, а случайное микробиологическое загрязнение медицинского изделия перед стерилизацией должно быть сведено к минимуму. Тем не менее медицинские изделия, изготовленные в стандартных производственных условиях согласно требованиям к системам менеджмента качества (см., например, ИСО 13485), до стерилизации могут содержать микроорганизмы. Такие продукты нестерильны. Целью стерилизации являются инактивация микробиологических контаминантов и тем самым перевод нестерильных изделий в стерильные.

Кинетику инактивации чистой культуры микроорганизмов физическими и/или химическими агентами, используемыми для стерилизации медицинской продукции, можно описать экспоненциальной зависимостью между числом выживших микроорганизмов и степенью обработки стерилизующим агентом. Это означает, что всегда существует вероятность того, что в конечном результате микроорганизм может выжить вне зависимости от степени применяемой обработки. В конкретном случае вероятность выживания определена количеством и устойчивостью микроорганизмов, а также той средой, в которой микроорганизмы существуют во время обработки. Таким образом, стерильность одной из единиц продукции в партии, подвергнутой стерилизационной обработке, не может быть гарантирована, и тем самым стерильность обработанной партии выражена условиями вероятности присутствия жизнеспособного микроорганизма на продукте.

Общие требования к системе менеджмента качества при проектировании и разработке, производстве, монтаже и сервисном обслуживании приведены в ИСО 9001, а конкретные требования к системам менеджмента качества при производстве медицинских изделий — в ИСО 13485. Однако согласно стандартам систем менеджмента качества эффективность некоторых процессов, применяемых в производстве, не может быть полностью проверена путем последующего контроля и испытания продукта. Примером такого процесса является стерилизация. По этой причине осуществляют валидацию процессов стерилизации для использования, их контроль в плановом порядке и надлежащее обслуживание оборудования.

Подготовлены международные стандарты, устанавливающие процедуры валидации и рутинного контроля процессов, используемых для стерилизации медицинской продукции (см., например, ИСО 14937, ИСО 11135, серии стандартов ИСО 11137, серии стандартов ИСО 17665 и ИСО 14160). Однако следует учитывать, что воздействие должным образом валидированного и точно контролируемого процесса стерилизации является не единственным фактором, связанным с обеспечением гарантии того, что продукция стерильна и в этом отношении пригодна для использования по назначению. Кроме того, для эффективной валидации и рутинного контроля процесса стерилизации нужно обратить внимание на микробиологические проблемы, возникающие в этом процессе, с точки зрения количества, характеристик и свойств микроорганизмов.

Термин «биологическая нагрузка» используют для описания популяции жизнеспособных микроорганизмов, присутствующих на/в продукте и/или барьерной системе, предназначенной для стерилизации.

Данные биологической нагрузки могут быть использованы в ряде следующих случаев:

- валидация и ревалидация процессов стерилизации;
- рутинный контроль производственных процессов;
- мониторинг сырья, компонентов или упаковки;
- анализ эффективности процессов очистки;
- общая программа экологического мониторинга.

Биологическая нагрузка — это сумма микробиологических вкладов из ряда источников, включая сырье, производство компонентов, сборочные процессы, производственную среду, сборочные/производственные средства (например, сжатые газы, вода, смазочные материалы), процессы очистки и упаковки готового продукта. Для контроля биологической нагрузки следует обратить внимание на микробиологический статус этих источников.

Точно рассчитать биологическую нагрузку невозможно, и на практике определение биологической нагрузки проводят с помощью определенного метода. Установление единого метода для биологической нагрузки во всех ситуациях нецелесообразно из-за большого разнообразия устройств и материалов конструкции медицинской продукции. Также невозможно спрогнозировать использование единого ме-

тода во всех ситуациях для удаления микроорганизмов при подготовке к определению их количества. Кроме того, выбор условий культивирования для подсчета микроорганизмов будет зависеть от типов микроорганизмов, которые могут присутствовать на/в медицинской продукции.

Настоящий стандарт устанавливает требования, которые должны быть выполнены для определения биологической нагрузки. Кроме того, в приложениях приведены руководства по предоставлению разъяснений и методов, которые считают подходящими в соответствии с этими требованиями. Могут быть применены методы, отличные от приведенных в руководстве, если они эффективны для достижения соответствия требованиям настоящего стандарта.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Стерилизация медицинской продукции

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Часть 1

Определение популяции микроорганизмов на продукции

Sterilization of health care products. Microbiological methods.
Part 1. Determination of a population of microorganisms on products

Дата введения — 2023—10—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает требования и содержит рекомендации по подсчету и микробиологической характеристике популяции жизнеспособных микроорганизмов на/в медицинской продукции, компоненте, сырье или упаковке.

Примечание 1 — Характер и степень микробиологической характеристики зависят от предполагаемого использования данных по биологической нагрузке.

Примечание 2 — См. приложение А, разделы А.1—А.9.

Настоящий стандарт не применяется при оценке или анализе вирусных, прионных или простейших контаминантов. Они включают в себя удаление и выявление возбудителей губчатых энцефалопатий, таких как почесуха, губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота и болезнь Крейтцфельдта—Якоба.

Примечание 3 — Руководство по инактивации вирусов и прионов приведено в ИСО 22442-3, ICH Q5A(R1) и ИСО 13022.

Настоящий стандарт не распространяется на микробиологический мониторинг окружающей среды, в которой производят медицинские изделия.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты [для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения)]:

ISO 10012, Enterprise management — Measurement management systems — Requirements for measurement processes and measuring equipment (Системы управления измерениями. Требования к измерительным процессам и измерительному оборудованию)

ISO 13485, Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes (Медицинские изделия. Системы менеджмента качества. Требования для нормативных целей)

ISO 15189, Medical laboratories — Particular requirements for quality and competence (Медицинские лаборатории. Требования к качеству и компетентности)

ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

Терминологические базы данных ИСО и МЭК доступны по следующим интернет-адресам:

- электронная платформа ИСО с функцией онлайн-просмотра терминов по адресу: gost.e-ecolog.ru org/obp;
- электронная база МЭК Electropedia по адресу: gost.e-ecolog.ru

3.1 **партия** (batch): Определенное количество продукции (см. 3.16), предназначенной или предполагаемо однородной по характеру и качеству и произведенной в течение указанного цикла производства.

[ИСО 11139:—[1)], 3.21]

3.2 **биологическая нагрузка** (bioburden): Количество жизнеспособных микроорганизмов на/в продукции (см. 3.16) и/или барьерной системе для стерилизации (см. 3.22).

[ИСО 11139:—, 3.23]

3.3 **корректирующий коэффициент биологической нагрузки** (bioburden correction factor): Числовое значение, применяемое к жизнеспособному количеству микроорганизмов для компенсации их неполного удаления из продукции (см. 3.16) и/или при невозможности культивирования микроорганизмов.

[ИСО 11139:—, 3.24]

3.4 **оценка биологической нагрузки** (bioburden estimate): Значение, установленное (см. 3.10) путем применения корректирующего коэффициента биологической нагрузки (см. 3.3) по отношению к подсчитанной биологической нагрузке (см. 3.2).

[ИСО 11139:—, 3.25]

3.5 **целесообразность метода биологической нагрузки** (bioburden method suitability): Оценка метода испытания для демонстрации его способности допускать рост микроорганизмов.

[ИСО 11139:—, 3.168, изменен — к термину добавлена фраза «биологическая нагрузка»]

3.6 **пик биологической нагрузки** (bioburden spike): Индивидуальное значение биологической нагрузки (см. 3.2), которое значительно больше, чем другие значения биологической нагрузки в данной совокупности.

[ИСО 11139:—, 3.26]

3.7 **коррекция** (correction): Действие по устранению выявленного несоответствия.

Примечание 1 — Коррекция может быть проведена в сочетании с корректирующим действием (см. 3.8).

[ИСО 9000:2015, 3.12.3, изменено — примечание 1 пересмотрено, а примечание 2 удалено]

3.8 **корректирующие действия** (corrective action): Действия, проводимые в данном случае для устранения причины несоответствия и предотвращения ее повторения.

Примечание 1 — Может быть несколько причин для несоответствия.

Примечание 2 — Корректирующие действия предпринимают для предотвращения рецидива, в то время как *превентивные действия* (см. 3.15) — для предотвращения ее возникновения.

Примечание 3 — Существует различие между *коррекцией* (см. 3.7) и корректирующим действием.

[ISO 9000:2015, 3.12.2, изменено — слово «случай» добавлено к определению и примечание 3 заменено]

3.9 **условия культивирования** (culture condition): Комбинация питательных сред и способа инкубации, используемая для стимулирования прорастания, роста и/или размножения микроорганизмов.

Примечание 1 — Способ инкубации может включать температуру, время и любые другие условия, указанные для инкубации.

[ИСО 11139:—, 3.71]

3.10 **установить** (establish): Определить путем теоретической оценки и подтвердить экспериментально.

[ИСО 11139:—, 3.107]

3.11 **факультативный микроорганизм** (facultative microorganism): Микроорганизм, способный как к аэробному, так и к анаэробному метаболизму.

[ИСО 11139:—, 3.114]

[1)] В настоящее время действует ISO 11139:2018.

3.12 **медицинская продукция** (health care product): Медицинское изделие, в том числе диагностическое медицинское устройство *in vitro*, или лекарственное средство (см. 3.16), включая биофармацевтические препараты.

[ISO 11139:—, 3.132]

3.13 **микробиологическая характеристика** (microbial characterization): Процесс, с помощью которого микроорганизмы делят на категории.

Примечание 1 — Категории могут иметь широкую базу, например основанную на использовании селективных сред, морфологии колоний или клеток, свойствах окрашивания или других характеристиках.

ИСО 11139:—, 3.170]

3.14 **облигатный анаэроб** (obligate anaerobe): Организм, который живет и растет в условиях отсутствия молекулярного кислорода.

[ИСО 11139:—, 3.186]

3.15 **превентивные действия** (preventive action): Действия по устранению причины потенциального несоответствия или другого потенциального нежелательного случая.

Примечание 1 — Потенциальное несоответствие может быть вызвано несколькими причинами.

Примечание 2 — Превентивные действия предпринимают для предотвращения возникновения нежелательных случаев, в то время как корректирующие действия (см. 3.8) предпринимают для предотвращения повторения нежелательных случаев.

[ИСО 9000:2015, 3.12.1]

3.16 **продукт** (product): Конкретный результат процесса.

Пример — Сырье, промежуточный(е) материал(ы), сборочная единица, медицинская продукция (см. 3.12).

[ISO 11139:—, 3.219]

3.17 **эффективность восстановления** (recovery efficiency): Мера способности методики по удалению, выделению и/или культивированию микроорганизмов из продукта (см. 3.16).

[ИСО 11139:—, 3.228]

3.18 **переаттестация** (requalification): Повторение части или в полном объеме валидации (см. 3.23) с целью подтверждения дальнейшей приемлемости специфицированного процесса.

[ИСО 11139:—, 3.235]

3.19 **часть продукции для испытания;** ЧПИ (sample item portion, SIP): Определенная часть единицы медицинской продукции (см. 3.12), используемая при испытаниях.

[ИСО 11139:—, 3.244]

3.20 **определять** (specify): Подробно изложить в утвержденном документе.

[ИСО 11139:—, 3.263]

3.21 **стерильный** (sterile): Не содержащий жизнеспособных микроорганизмов.

[ИСО 11139:—, 3.275]

3.22 **барьерная система для стерилизации** (sterile barrier system): Минимальная упаковка, которая минимизирует риск попадания микроорганизмов и позволяет продемонстрировать асептические свойства стерильного продукта в месте использования.

[ИСО 11139:—, 3.276]

3.23 **валидация** (validation): Процесс подтверждения посредством предоставления объективных свидетельств того, что требования, предназначенные для конкретного использования или применения, выполнены.

Примечание 1 — Объективное свидетельство, необходимое для валидации, является результатом испытания или других форм определения, таких как осуществление альтернативных расчетов или анализ документов.

Примечание 2 — Слово «валидировано» использовано для обозначения соответствующего статуса.

Примечание 3 — Условия, применяемые для валидации, могут быть реальными или смоделированными.

[ИСО 9000:2015, 3.8.13, изменено — в определение добавлено слово «процесс»]

4 Общие положения

4.1 Разработка, валидация и рутинное управление процессом стерилизации являются важнейшими составляющими жизненного цикла медицинской продукции. Для обеспечения последовательного выполнения требований настоящего стандарта необходимо создать, внедрить и поддерживать необходимые процессы. Процессы, имеющие особое значение для разработки, валидации и рутинного управления процессом стерилизации, включают, но не ограничиваются:

- контроль ведения документации, в том числе ведение записей;
- распределение полномочий руководства;
- предоставление достаточных ресурсов, в том числе наличие компетентных сотрудников и подходящей инфраструктуры;
- контроль продукта, предоставляемого сторонними организациями;
- идентификацию и прослеживаемость продукта на протяжении всего процесса и
- контроль несоответствующей продукции.

Примечание — Согласно требованиям ИСО 13485 системы менеджмента качества применяют в целях регулирования на всех этапах жизненного цикла медицинских изделий. Национальные и/или региональные нормативные требования к предоставлению медицинских услуг устанавливают обязательное внедрение в полном объеме системы менеджмента качества и оценку этой системы органом, уполномоченным анализировать ее соответствие нормативным требованиям.

4.2 Должен быть определен процесс калибровки всего оборудования, включая контрольно-измерительные приборы, для реализации целей испытаний, используемых при выполнении требований настоящего стандарта.

(Изменение № 1, 2021)

5 Выбор продукта

5.1 Общие положения

5.1.1 Процедуры отбора и обращения с продуктами для определения биологической нагрузки должны гарантировать, что выбранный продукт является представителем данного производства, включая упаковку, материалы и процессы.

5.1.2 Если продукт(ы) включен(ы) в семейство продуктов для целей определения биологической нагрузки, обоснование этого должно быть зафиксировано с помощью критериев, гарантирующих, что биологическая нагрузка, определенная для продукта, выбранного из семейства продуктов, является репрезентативной для всего семейства продуктов.

5.1.3 Необходимо учитывать сроки определения биологической нагрузки относительно производства, потому что она может меняться с течением времени.

5.2 Часть продукции для испытания

5.2.1 Либо весь продукт (ЧПИ = 1,0), либо его часть (ЧПИ < 1,0) могут быть использованы для определения биологической нагрузки.

5.2.2 Если используют ЧПИ < 1,0, то ЧПИ должна быть достаточного размера, чтобы адекватно представлять биологическую нагрузку для всего продукта. Определение выбранных проб должно быть основано на равномерности/неравномерности распределения биологической нагрузки, как приведено в 5.2.3—5.2.5.

5.2.3 После распределения биологической нагрузки применяют следующие условия:

a) если биологическая нагрузка равномерно распределена на изделии и/или в нем, то ЧПИ может быть выбрана из любой части изделия;

b) если биологическая нагрузка распределена неравномерно, то ЧПИ должна включать в себя:

1) либо части выбранного продукта, пропорционально представляющие каждый из тех материалов, из которых изготовлен продукт,

2) либо часть продукта, содержащую наиболее устойчивую микробную нагрузку (количество и/или типы) для процесса стерилизации.

При выборе части, содержащей наиболее устойчивую микробную нагрузку, следует установить отношение биологической нагрузки тестируемой ЧПИ к биологической нагрузке всего продукта.

5.2.4 Если распределение биологической нагрузки неизвестно, ЧПИ должна состоять из таких проб продукта, которые выбирают таким образом, чтобы они пропорционально представляли каждый из тех материалов, из которых изготовлен продукт.

5.2.5 ЧПИ может быть рассчитана на основе характеристик, таких как длина, масса, объем или площадь поверхности (примеры см. в таблице А.1).

Примечание — Некоторые стандарты, определяющие требования к валидации и рутинному контролю процесса стерилизации, предусматривают критерии соответствия ЧПИ, например серия стандартов ИСО 11137.

6 Методы определения и микробиологическая характеристика биологической нагрузки

6.1 Определение биологической нагрузки

6.1.1 Выбор подходящего метода

Метод должен соответствовать той цели, для которой будут использованы данные. Метод(ы) должен(должны) включать в себя методики для реализации следующих целей:

a) нейтрализация ингибирующих веществ, если это необходимо;
b) удаление микроорганизмов, если это необходимо;
c) культивирование микроорганизмов;
d) подсчет микроорганизмов.

6.1.2 Нейтрализация ингибирующих веществ

Если физическая или химическая природа продукта такая, что позволяет высвобождать вещества, отрицательно влияющие на обнаружение биологической нагрузки продукта, то используют систему нейтрализации, удаления или, если это невозможно, минимизации воздействия любого высвобождаемого вещества. Эффективность такой системы должна быть доказана.

Примечание — В приложении В приведены методы, которые могут быть использованы для оценки высвобождения микробоцидных или микробостатических веществ.

6.1.3 Удаление микроорганизмов

6.1.3.1 Для идентифицированного продукта, где удаление жизнеспособных микроорганизмов является частью метода, должна быть рассмотрена эффективность удаления, а затем зафиксированы результаты (см. 4.1). Следует рассмотреть, по крайней мере, следующие вопросы:

a) способность метода удалять микроорганизмы;
b) возможные типы микроорганизмов и их расположение(я) на продукте;
c) влияние(я) метода удаления на жизнеспособность микроорганизмов;
d) физическая или химическая природа испытуемого продукта.

6.1.3.2 Для идентифицированного изделия, в котором удаление жизнеспособных микроорганизмов не является частью метода (например, прямое культивирование продукта), должна быть рассмотрена эффективность подсчета микроорганизмов, а затем зафиксированы результаты (см. 4.1). Следует рассмотреть, по крайней мере, следующие вопросы:

a) возможные типы микроорганизмов и их расположение(я) на продукте;
b) физическая или химическая природа испытуемого продукта.

6.1.4 Культивирование микроорганизмов

Условия культивирования должны быть выбраны после рассмотрения типов микроорганизмов, которые могут присутствовать на продукте, с учетом физической или химической природы самого продукта, подлежащего испытанию. Результаты и обоснование принятых решений регистрируют (см. 4.1).

6.1.5 Подсчет микроорганизмов

Методика подсчета должна быть выбрана после рассмотрения типов микроорганизмов, которые могут присутствовать. Результаты и обоснование принятых решений регистрируют (см. 4.1).

6.2 Микробиологическая характеристика биологической нагрузки

6.2.1 Должны быть выбраны соответствующие методы для микробиологической характеристики биологической нагрузки.

Примечание — Микробиологическая характеристика необходима для обнаружения изменений в биологической нагрузке самого изделия, которые могут повлиять на некоторые аспекты использования данных биоло-

гической нагрузки (например, установление процесса стерилизации). Кроме того, знание типов микроорганизмов может быть полезно для выявления источников контаминации.

6.2.2 Биологическая нагрузка должна быть охарактеризована с использованием одного или нескольких из следующих методов:

a) морфология колоний;

b) морфология клеток;

c) дифференциальное окрашивание;

d) культивирование с использованием селективных и/или дифференциальных условий;

e) биохимические свойства;

f) нализ генотипа, например методы на основе рисунка или отпечатка пальца или методы на основе последовательности;

g) протеомные методы, например масс-спектрометрия.

7 Валидация метода определения биологической нагрузки

7.1 Общие положения

Метод(ы) определения биологической нагрузки должен(должны) быть валидирован(ы) и задокументирован(ы).

Примечание — См. А.7.1 для получения информации о валидации и использовании классических микробиологических методов.

7.2 Валидация

Валидация должна состоять из следующих этапов:

a) оценка пригодности метода испытаний для демонстрации отсутствия ингибирования роста в данном испытании.

Примечание 1 — Отсутствие ингибирования роста может быть подтверждено данными испытания эффективности восстановления биологической нагрузки, если использован инокулированный продукт;

b) оценка соответствия методики удаления микроорганизмов из продукта, если удаление является частью метода (т. е. эффективность восстановления биологической нагрузки) и если это соответствует той цели, для которой формируют данные.

Примечание 2 — В приложении С приведена информация о валидации эффективности восстановления биологической нагрузки;

c) оценка соответствия методики подсчета микроорганизмов, включающей условия культивирования и методики микробиологического подсчета;

d) оценка соответствия методики (методик) микробиологической характеристики.

8 Рутинное определение биологической нагрузки и интерпретация данных

8.1 Общие положения

Рутинное определение биологической нагрузки должно быть выполнено с использованием документированного(ых) плана(ов) по отбору проб, в котором(ых) указывают размер выборки и частоту отбора проб.

8.2 Пределы обнаружения и подсчет на агаре

Определение биологической нагрузки проводят с использованием метода(ов), указанного(ых) для продукта или семейства продуктов (см. 5.1.2). При этом следует учитывать те факторы, которые будут влиять на результаты, такие как пределы обнаружения и подсчет пластин.

8.3 Микробиологическая характеристика

Микробиологическую характеристику биологической нагрузки проводят методом, зависящим от той цели, для которой должны быть использованы данные, полученные в результате определения биологической нагрузки (см. 6.2).

8.4 Данные биологической нагрузки для определения степени обработки

Если данные о биологической нагрузке должны быть использованы для установления степени обработки процесса стерилизации (т. е. метода на основе биологической нагрузки), то должны быть выполнены любые требования относительно применения данных о биологической нагрузке, указанных в соответствующем стандарте по разработке, валидации и рутинному контролю процесса стерилизации.

8.5 Пик биологической нагрузки

Если данные биологической нагрузки демонстрируют результат испытания, значительно превышающий другие значения (пик биологической нагрузки), эти данные должны оцениваться на предмет воздействия соответствующим образом в зависимости от цели получения данных.

8.6 Уровни биологической нагрузки

Должны быть указаны допустимые уровни биологической нагрузки в/на продукте или группе этих продуктов. Если эти уровни превышены, то должны быть приняты соответствующие меры (см. 4.4.2). Приемлемые уровни следует рассматривать и корректировать по мере необходимости.

8.7 Анализ данных

Для выявления тенденции биологической нагрузки должны быть использованы данные, полученные в результате определения биологической нагрузки за определенный период времени.

8.8 Статистические методы

Если применяют статистические методы для определения размера, частоты и/или приемлемых уровней выборки, то они должны соответствовать ИСО 13485.

9 Использование метода определения биологической нагрузки

9.1 Изменения в продукте и/или производственном процессе

Изменения в продукте и/или производственном процессе должны быть пересмотрены, для того чтобы определить, могут ли они изменить биологическую нагрузку с учетом той цели, для которой будут использованы данные биологической нагрузки. Результаты проверки регистрируют (см. 4.1). Если существует возможность изменения биологической нагрузки, то должны быть проведены специальные определения биологической нагрузки для оценки степени и характера любого изменения.

9.2 Изменения в методике определения биологической нагрузки

Любое изменение в рутинном методе определения биологической нагрузки должно быть оценено. Эта оценка должна включать анализ влияния изменения на результат определения. Результаты оценки должны быть зарегистрированы (см. 4.1.3).

Примечание — Оценка изменения может указывать на то, что предыдущая валидация и эффективность восстановления биологической нагрузки актуальны.

9.3 Переаттестация метода определения биологической нагрузки

Исходные данные валидации (см. 7.2) и любые последующие данные ревалидации должны быть пересмотрены через определенные промежутки времени в соответствии с документированной процедурой. Результаты рассмотрения и любая проведенная переаттестация должны быть зарегистрированы (см. 4.1.3).

Приложение А
(справочное)

Руководство по определению популяции микроорганизмов в продукте

Примечание — Для удобства пользования нумерация в настоящем приложении соответствует нумерации, используемой в основной части настоящего стандарта.

А.1 Рекомендации, связанные с областью применения

В настоящем приложении приведены рекомендации по выполнению требований, указанных в настоящем стандарте. Данное руководство не претендует на то, чтобы быть исчерпывающим, но должно подчеркнуть существенные аспекты, на которые следует обратить внимание.

Могут быть использованы методы, отличные от приведенных в настоящем приложении, но эти альтернативные методы должны быть продемонстрированы как эффективные для достижения соответствия требованиям настоящего стандарта.

Настоящее приложение не предназначено в качестве обязательных требований для оценки соответствия требованиям настоящего стандарта.

А.2 Взаимосвязанные с нормативными ссылками

Сведения отсутствуют.

А.3 Взаимосвязанные с терминами и определениями

Сведения отсутствуют.

А.4 Элементы системы менеджмента качества

Примечание — Настоящий стандарт не требует наличия полной системы менеджмента качества. Однако минимальные элементы системы менеджмента качества, необходимые для контроля определения биологической нагрузки, используемые при валидации и мониторинге медицинской продукции, подлежащей стерилизации, имеют ссылки на соответствующие пункты настоящего стандарта (см., в частности, раздел 4). Следует обратить внимание на стандарты систем менеджмента качества (см. ИСО 13485), которые контролируют все этапы производства или повторной обработки медицинского продукта.

А.4.1 Документация

В ИСО 13485 требования к документации относят к требованиям при разработке и контроле документации (включая спецификации и процедуры) и записей.

Компьютеры используют в лабораториях для прямого и косвенного сбора, обработки и/или хранения данных. Следует контролировать используемые для таких целей аппаратные средства и программное обеспечение.

Используемая компьютерная система должна быть идентифицирована с точки зрения как аппаратного, так и программного обеспечения, и любые изменения в любом из этих аспектов должны быть задокументированы и подлежать соответствующему утверждению.

Если расчеты выполняют с помощью электронных методов обработки данных, программное обеспечение (например, расчеты в электронных таблицах) должно быть проверено перед использованием, и записи об этой проверке должны быть сохранены.

Для программного обеспечения должна быть документация, описывающая следующее:

a) прикладное программное обеспечение, используемое в компьютерной системе;

b) операционное программное обеспечение;

c) используемые пакеты данных.

Все программное обеспечение должно быть проверено перед вводом в эксплуатацию.

Если компьютерное программное обеспечение разработано собственными силами, то должны быть разработаны и соответствующие процедуры для обеспечения следующего:

- сохранения документации по разработке, включая исходный код;
- сохранения записи приемо-сдаточных испытаний;
- документирования изменений в программах;
- документирования изменений в оборудовании и официального тестирования перед вводом в эксплуатацию.

Эти элементы управления также должны быть применены к любой модификации или настройке пакетов коммерческого программного обеспечения.

Должны быть процедуры, позволяющие обнаруживать и/или предотвращать несанкционированные изменения программного обеспечения.

Программы, посредством которых организуют, сводят в таблицы и/или подвергают данные статистическим или другим математическим процедурам либо иным образом манипулируют или анализируют хранящиеся в элек-

тронном виде данные, должны позволять извлекать исходные записи данных. Могут потребоваться специальные процедуры архивирования компьютерных данных, и эти процедуры должны быть задокументированы.

Требования к контролю документов и записей приведены в ИСО 13485, ИСО 15189 или ИСО/МЭК 17025; требования к технической документации — в ИСО/МЭК 17025.

Для руководства по применению систем менеджмента качества для компьютерного программного обеспечения см. также ИСО/МЭК 90003.

А.4.2 Ответственность руководства

В ИСО 13485 требования раздела «Ответственность руководства» касаются приверженности руководства ориентированности на потребителя, политики в области качества, планирования, ответственности, полномочий, коммуникации и проведения анализа со стороны руководства.

Данные, полученные при определении биологической нагрузки, должны быть надежными. Важно, чтобы определения биологической нагрузки проводились в контролируемых условиях. Следовательно, лабораторные помещения, используемые для этих определений, будь то на территории изготовителя медицинской продукции или являющиеся внешними, должны управляться и эксплуатироваться в соответствии с документированной системой качества.

В определении биологической нагрузки могут участвовать разные стороны, каждая из которых несет ответственность за конкретные элементы метода или процедуры (см. приложение D для руководства по типичным обязанностям). В настоящем стандарте установлены требования для стороны, принимающей на себя конкретные обязанности, которые должны быть оформлены документально в рамках системы(систем) менеджмента качества участвующих сторон. Сторона, ответственная за определенные элементы, обязана привлечь для исполнения данных обязательств персонал, компетентность которого подтверждается соответствующими подготовкой и квалификацией.

Если определение биологической нагрузки проводят в лаборатории под непосредственным руководством изготовителя медицинской продукции, то работа лаборатории осуществляется в рамках системы менеджмента качества производителя. Если используют внешнюю лабораторию, то все испытания следует проводить в соответствии с признанными действующими/действительными валидированными, наиболее эффективными лабораторными практиками (например, ИСО 15189, ИСО/МЭК 17025), где это применимо, и данные должны оцениваться компетентными специалистами.

Каждая лаборатория должна предоставлять качественные услуги, и это обязательство должно быть оформлено как политика в области качества. Порядок полномочий и ответственности в лаборатории должны быть официально установлены и задокументированы. Следует назначить сотрудника, ответственного за создание лабораторной системы качества, который должен обладать полномочиями для обеспечения внедрения этой системы.

Деятельность лаборатории должна подвергаться регулярным внутренним проверкам. Результаты аудита должны быть задокументированы и рассмотрены руководством лаборатории (см., например, ИСО 15189 или ИСО/МЭК 17025).

Требования к ответственности, полномочиям и человеческим ресурсам определены в ИСО 13485.

Требования к предоставлению ресурсов указаны в ИСО 13485; требования к оборудованию — в ИСО 15189 и ИСО/МЭК 17025.

А.4.3 Реализация продукции

В ИСО 13485 требования в разделе «Реализация продукции» отнесены ко всем циклам производства продукта, начиная с определения требований заказчика, проектирования и разработки, закупок, контроля производства и калибровки контрольно-измерительных приборов.

Должна существовать система определения требований к техническому обслуживанию каждой единицы лабораторного оборудования. Оборудование, не требующее калибровки, должно быть четко идентифицировано.

Любое оборудование или его части, которые вступают в контакт с продуктом, элюентом, питательными средами и т. д., во время тестирования должны быть стерильными. Все микробиологические среды и элюенты, используемые для удаления микроорганизмов из продукта, должны быть приготовлены таким образом, чтобы обеспечить их стерильность.

Соответствующие испытания качества питательных сред должны включать испытания на стимулирование роста. Как правило, испытания на стимулирование роста проводят с каждой партии при использовании инокулята с низким количеством [не более 100 колониеобразующих единиц (КОЕ)] отобранных микроорганизмов. Тесты на стимулирование роста приведены в некоторых фармакопеях [(например, US Pharmacopoeia (USP), European Pharmacopoeia (EP)], подробно описывающих подходящие микроорганизмы. Приемлемы и другие действующие количественные и полуколичественные методы контроля качества сред.

Требования к закупкам приведены в ИСО 13485. В частности, следует отметить, что требования ИСО 13485 по проверке закупаемых изделий распространяются на все товары и услуги, полученные организацией извне.

Требования к калибровке контрольно-измерительных приборов изложены в ИСО 13485; требования к оборудованию и отслеживанию измерений — в ИСО/МЭК 17025.

А.4.4 Измерение, анализ и улучшение

А.4.4.1 Результаты испытаний биологической нагрузки, как правило, не укладываются в математическую модель распределения. Поэтому неопределенность измерений, точность и смещение могут быть не нужны, за исключением оценки общей компетентности лаборатории. При использовании методов испытаний биологической нагрузки измерение неопределенности, точности и смещения учитывают при определении эффективности восстановления биологической нагрузки.

А.4.4.2 Требования раздела ИСО 13485 «Измерение, анализ и улучшение» касаются мониторинга в процессе производства, контроля несоответствующих изделий, анализа данных и усовершенствований (включая корректирующие и предупреждающие действия).

Все результаты биологической нагрузки, которые превышают указанный уровень и/или указывают на неблагоприятную тенденцию, должны быть исследованы. Первый этап испытания должен включать оценку того, являются ли результаты истинными или ошибочными. Следующие факторы могут способствовать возникновению ошибки и должны быть устранены:

- неподходящие образцы (например, нерепрезентативные, неоднородные, бракованные материалы);
- неподходящие материалы для отбора проб (например, тампоны, контейнеры, упаковки);
- неподходящие условия транспортирования/обработки/хранения;
- несоответствующие испытательные материалы (например, неправильное хранение, использование пипеток, неисправность фильтрационного аппарата);
- неправильное обращение или метод(ы) испытаний;
- неподходящие питательные среды или растворители;
- неподходящая лабораторная среда;
- неподходящая инкубационная среда;
- ошибки вычисления или транскрипции;
- отклонение от метода испытания (например, ошибка разбавления, ошибка фильтрации, ошибка асептического метода).

Если результаты обусловлены отбором проб или лабораторной ошибкой, то результат биологической нагрузки, превышающий указанный уровень, должен быть проверен путем проведения другого определения с использованием новых образцов из той же партии изделия, если это возможно. Если продукт поддерживает рост микроорганизмов и может привести к недостоверным данным или если та же партия больше не доступна, следует использовать новую партию.

Если первоначальный результат подтверждается как истинный вывод, то, по крайней мере, следующее должно быть рассмотрено на втором этапе испытания:

a) значение результата по отношению к цели, для которой будут использованы данные (например, эффективность процесса стерилизации);

b) необходимость увеличения размера выборки и/или частоты;

c) оценка производственного процесса, направленная на решение следующих задач:
   1) сырье/компоненты (например, поставщики, изменения качества),
   2) очистка/смазка/производственная жидкость,
   3) транспортирование/хранение контейнеров,
   4) рабочие поверхности,
   5) одежда персонала/гигиена/практика,
   6) погрузочно-разгрузочные работы/сборка,
   7) условия окружающей среды и результаты мониторинга (включая сезонные факторы, при их наличии),
   8) упаковочные материалы и процедуры,
   9) условия хранения;

d) микробиологическая характеристика выделенных микроорганизмов, включая:
   1) потенциальные источники,
   2) сравнение с предыдущими изолятами.

По результатам испытания могут потребоваться конкретные корректирующие действия. Если необходимы корректирующие действия, их эффективность должна быть продемонстрирована.

Процедуры корректирующих действий определены в ИСО 13485, ИСО 15189 и ИСО/МЭК 17025.

А.5 Отбор продукта

А.5.1 Общие положения

А.5.1.1 Процедуры отбора и обработки образцов продукта должны быть задокументированы и проведены во избежание непреднамеренной контаминации и значительных изменений количества и типов микроорганизмов в образце. Методы отбора проб должны быть последовательными с возможностью проведения сравнения биологической нагрузки за определенный период.

При выборе образцов продукта для определения биологической нагрузки существует несколько возможностей:

a) берут продукт (рандомно или с заданной частотой);

b) изготавливают продукт специально для тестирования биологической нагрузки с использованием стандартных производственных процедур;

c) берут продукт, который не подходит для продажи, может быть утилизирован или иным образом забракован.

Выбор может зависеть от ряда факторов, но первой предпосылкой является то, что выбранный продукт должен обладать биологической нагрузкой, репрезентативной для реального изделия. Если принято решение об утилизации бракованного изделия, то это изделие должно пройти все основные стадии производства, включая возможные процессы очистки и упаковки.

При отборе проб для определения биологической нагрузки продукт должен содержаться в обычной упаковке. Как правило, достаточно выполнить определение биологической нагрузки на/в продукте после его извлечения из упаковочной системы и исключить упаковочную систему из определения. В зависимости от содержания (информации) этикетки о стерильности внутренние компоненты упаковки, такие как лоток или вставка для продукта, могут быть подвергнуты испытаниям на основании таких факторов, как:

- то, что должно быть стерильным;
- когда упаковка является неотъемлемой частью продукта, или
- для конкретной оценки.

А.5.1.2 Использование данных биологической нагрузки (например, контроль сырья, прием входящих компонентов, оценка технологических стадий, квалификация процесса стерилизации) следует принимать во внимание при создании семейств продукта для определения биологической нагрузки. При создании семейств продукта для определения биологической нагрузки необходимо учитывать следующее:

a) природа и источник сырья;

b) природа и источник компонентов;

c) сложность производственного процесса, т. е. степень обработки, количество технологических этапов;

d) типы используемых производственных процессов;

e) производственная среда;

f) конструкция и размер продукта;

g) производственное оборудование;

h) место производства.

Кроме того, количество и типы микроорганизмов могут влиять на выбор метода испытания биологической нагрузки для данного семейства продукта. Для каждого семейства продукта следует выбрать основной продукт или репрезентативный(ые) продукт(ы) для стандартного определения биологической нагрузки. Выбор основного продукта должен быть обоснован документально.

Если продукты внутри семейства считают эквивалентными, то для определения биологической нагрузки может быть выбран репрезентативный продукт. Указанный продукт могут контролировать регулярно или могут быть выбраны другие представители группы на основе чередования. Если выбранный продукт контролируют регулярно, то следует периодически контролировать непрерывную эквивалентность других продуктов в семействе или предоставлять обоснование.

А.5.1.3 Если данные определения биологической нагрузки должны быть использованы для установления или поддержания процесса стерилизации, то период времени, прошедший между отбором образцов продукта и определением биологической нагрузки, должен быть репрезентативным для периода времени между завершением последнего этапа производства и стерилизацией продукта.

А.5.2 Часть продукта для испытания

А.5.2.1 При определении биологической нагрузки следует использовать весь продукт, хотя это может быть неосуществимо, если продукт не может быть помещен в имеющиеся лабораторные испытательные сосуды. В этом случае применяют ЧПИ. Следует учитывать распределение биологической нагрузки по всему изделию. Если предполагается, что распределение будет неравномерным по всему продукту, следует определить площадь наиболее предельно контаминированного продукта. Эта область должна быть включена в выбранную ЧПИ.

А.5.2.2 Для ЧПИ следует использовать как можно большую часть продукта. ЧПИ должна быть репрезентативной, чтобы можно было определить биологическую нагрузку всего продукта. Тщательный выбор ЧПИ для продукта необходим при тестировании крупных продуктов, таких как хирургические халаты или наборы наружного дренажа.

А.5.2.3 Следует учитывать аспекты производства, которые способствуют распространению микроорганизмов на продуктах.

А.5.2.4 Примерами ЧПИ, которые могут быть выбраны из изделий, более устойчивых к процессу стерилизации, являются наборы трубок с соединениями, запорными клапанами и т. д.

А.5.2.5 Примеры продукта, для которых используют различные основы расчета ЧПИ, приведены в таблице А.1.

При подготовке или сборке ЧПИ следует соблюдать осторожность во время манипуляций с продуктами. Если части должны быть отделены от продукта, то это должно быть сделано в чистых условиях в контролируемой среде (например, внутри шкафа с ламинарным потоком), чтобы избежать дополнительной контаминации.

Таблица А.1 — Примеры расчета ЧПИ

Основа для ЧПИ	Продукт
Площадь поверхности	Имплантаты (не рассасывающиеся)
Масса	Порошки Халаты Имплантаты (рассасывающиеся)
Длина	Трубка (постоянный диаметр)
Объем	Жидкость в контейнере

А.6 Методы определения и микробиологическая характеристика биологической нагрузки

А.6.1 Определение биологической нагрузки

А.6.1.1 Выбор подходящего метода

На рисунке А.1 представлена схема принятия тех решений, которые имеют общее применение на начальных этапах выбора метода определения биологической нагрузки. Данный рисунок может относиться ко всем методам.

Для продукта с высокой биологической нагрузкой, для которого использован метод культивирования, необходимо убедиться в том, что выполнено достаточное количество разведений для получения количественных результатов и предотвращения таких проблем, как маскировка колоний или слишком большое количество при подсчете пластин (TNTC).

Примечание 1 — Эта схема принятия решений не исключает использования альтернативных микробиологических экспресс-методов определения биологической нагрузки (например, автофлуоресценции, проточной цитометрии, прямой эпифлуоресценции, фильтрующей техники и твердофазной цитометрии).

Примечание 2 — Эта схема принятия решений не охватывает все типы продукта, которые могут быть исследованы, или все типы исследований, которые можно использовать.

Для продукта с предельно низкой биологической нагрузкой может оказаться невозможным восстановить обнаруживаемую биологическую нагрузку из отдельных единиц продукта, даже если использован подходящий метод испытания биологической нагрузки с проверенной эффективностью восстановления биологической нагрузки. Следует проявлять осторожность в отношении оценки средней биологической нагрузки при обнаружении нулевых колоний, чтобы избежать завышения истинной биологической нагрузки продукта. Предел обнаружения для метода испытаний биологической нагрузки должен отражать предполагаемое использование данных по биологической нагрузке, и, при необходимости, метод испытаний биологической нагрузки должен быть разработан таким образом, чтобы минимизировать предел обнаружения.

Для оптимизации методов определения биологической нагрузки для продукта с низкой биологической нагрузкой может потребоваться рассмотрение использования альтернативного метода. Примеры приведены в перечислениях a)—e).

a) Метод объединенных образцов, при котором несколько единиц продукта объединяют в одно испытание. Для этого метода должна быть определена эффективность восстановления биологической нагрузки. Общее количество извлекаемых КОЕ для объединенных образцов делится на количество объединенных единиц для оценки КОЕ на единицу. Объединение единиц позволит оценить низкое количество КОЕ на единицу, однако при этом отсутствует информация о распределении биологической нагрузки или изменчивости на отдельных единицах, составляющих объединенную выборку. Объединение может быть применимо в случаях последовательного количества КОЕ на единицу.

Следует помнить, что объединение образцов в резервуар может снизить возможность обнаружения непреднамеренных изменений в производственном процессе в зависимости от метода объединения.

b) Метод с наиболее вероятным числом (НВЧ) (см. В.3.3).

c) Комбинирование и элиминация испытаний, подходящие для групп микроорганизмов: для многих видов изделий отсутствует необходимость разбивать экстракт на части для отдельных испытаний, таких как аэробы, анаэробы, споры и грибки. Если оценка показала, что испытание на анаэробы не указано, то это испытание может быть исключено в будущем. Кроме того, если аэробные споры обнаруживают в подсчете аэробных бактерий, а количество грибов невелико, то можно объединить испытания на аэробные бактерии, бактериальные споры и грибковые в одно испытание, например: фильтрация всего объема экстракционной жидкости через один фильтр, помещенный на подходящую культуральную среду общего назначения, которую затем инкубируют при двух различных температурах (например, от 30 °С до 35 °С и от 20 °С до 25 °С). Другие примеры включают использование одной инкубации при температуре (30 ± 2) °С или инкубации в других температурных диапазонах, подходящих для обнаружения конкретной микробной популяции. Устранение факторов разбавления таким образом (при условии, что устранение оправдано) может свести к минимуму вероятность завышения среднего значения биологической нагрузки.

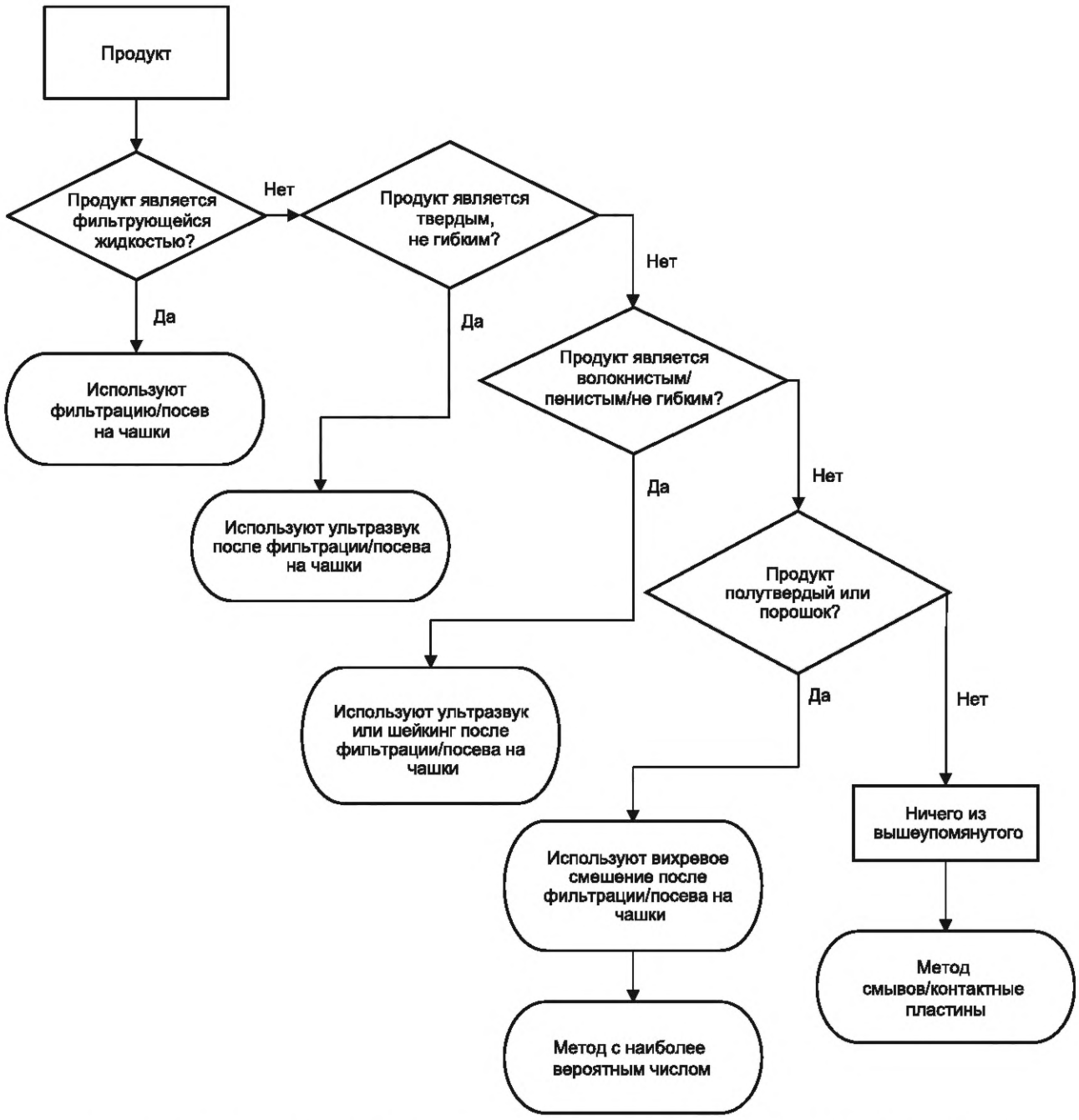

Рисунок А.1 — Схема принятия решений при выборе метода определения биологической нагрузки

d) Метод с половинным пределом обнаружения, способствующий вычислению среднего значения биологической нагрузки, когда в результатах биологической нагрузки присутствуют значения «меньше». Этот метод обеспечивает более низкий результат биологической нагрузки, когда меньший процент результатов составляет 0 КОЕ на пластину (дополнительная информация приведена в [24]).

e) Метод, основанный на распределении Пуассона, с установлением значений «меньше»: это дает возможность определить оценку средней биологической нагрузки.

Биологическая нагрузка обычно не распределяется на продуктах в течение всего производственного процесса таким образом, чтобы ее можно было статистически проанализировать с помощью распределения Пуассона. Применение распределения Пуассона к биологической нагрузке должно быть тщательно рассмотрено в связи с предполагаемым использованием информации. (Для получения дополнительной информации см. [24] и [20].)

При выборе метода определения биологической нагрузки следует учитывать возможное появление биопленки на/в продукте. Биопленка может образовываться на/в продукте при контакте с жидкостями, если не будут при-

няты соответствующие меры контроля биологической нагрузки. Медицинская продукция, содержащая ткани, имеет возможность возникновения биопленки.

А.6.1.2 Нейтрализация ингибирующих веществ

См. приложение В.

А.6.1.3 Извлечение микроорганизмов

См. приложение В.

А.6.1.4 Культивирование микроорганизмов

Свойство сырья, способ изготовления и условия, при которых происходит изготовление продукта, являются факторами, влияющими на биологическую нагрузку продукта, и должны быть учтены при выборе питательных сред и условий инкубации. Если особые микроорганизмы отсутствуют, то подходят универсальные, неселективные питательные среды и условия инкубации. Рекомендации лаборатории при участии производителя по использованию стандартных условий культивирования биологической нагрузки могут быть достаточными в качестве рассмотрения и обоснования.

При выборе питательных сред и условий инкубации следует учитывать, по крайней мере, следующее:

a) ни одна комбинация, состоящая из среды и условий инкубации, не может поддерживать рост всех микроорганизмов; выбор условий должен свести к минимуму возможность завышения средней биологической нагрузки из-за подсчета одного и того же микроорганизма на разных средах;

b) при проведении мероприятий по валидации может потребоваться использование более широкого спектра питательных сред и условий инкубации в отличие от общепринятого;

c) вероятные источники микробной контаминации и типы микроорганизмов, с которыми можно столкнуться, принимая во внимание, что некоторые источники контаминации могут варьироваться в зависимости от сезона.

Медицинская продукция, изготовленная из синтетического материала, в меньшей степени подвержена контаминации облигатными анаэробами по сравнению с изготовленной из тканей или других природных материалов.

Примеры питательных сред и условий инкубации приведены в таблице А.2.

Следует отметить, что все неселективные методы анаэробного культивирования могут поддерживать рост факультативных анаэробных микроорганизмов.

Таблица А.2 — Примеры питательных сред и условий инкубации[a]

Виды микроорганизмов	Твердые среды	Жидкие среды	Условия инкубации[b]
Факультативные неприхотливые аэробные бактерии[d]	Соево-казеиновый питательный агар (триптон-соевый агар). Питательный агар. Основа из кровяного агара. Глюкозно-триптоновый агар (питательный агар для подсчета микроорганизмов)	Соево-казеиновый питательный бульон (триптон-соевый бульон). Питательный бульон	Температура от 30 °С до 35 °С для периода от 3 до 7 дней
Дрожжи и плесень	Декстрозовый агар Сабуро. Агар солодового экстракта. Розовый бенгальский агар. Хлорамфениколовый агар. Соево-казеиновый питательный агар (триптон-соевый агар). Агар картофельный с декстрозой. Глюкозо-триптоновый агар (питательный агар для подсчета микроорганизмов)	Декстрозовый бульон Сабуро. Бульон с экстрактом солода. Соево-казеиновый питательный бульон (триптон-соевый бульон)	Температура от 20 °С до 25 °С для периода от 5 до 7 дней
Анаэробные бактерии	Агар для клостридий усиленный[c]. Агар Шедлера[c]. Кровяной агар[c]. Особый (прихотливый) анаэробный агар[c]. Соево-казеиновый питательный агар (триптон-соевый агар)[c]. Колумбийский агар[c]. Анаэробный агар по Вилкинсу-Чалгрену[c]	Бульон Робертсона. Бульон тиогликолевый жидкий	Температура от 30 °С до 35 °С для периода от 3 до 7 дней

Окончание таблицы А.2

[a] Данный перечень не является исчерпывающим.
[b] Перечисленные условия инкубации указывают на те условия, которые обычно используют для перечисленных типов микроорганизмов.
[c] Культивируется в анаэробных условиях. Результативность может быть повышена, если предварительно уменьшить количество питательной среды.
[d] Некоторые питательные среды, используемые для факультативных, не особых (неприхотливых), аэробных бактерий, способны поддерживать рост дрожжей и плесени.

А.6.1.5 Подсчет микроорганизмов

В лаборатории могут конкретизировать методику подсчета, которая будет достаточной в качестве рассмотрения и обоснования. См. также В.6.

А.6.2 Микробиологическая характеристика биологической нагрузки

А.6.2.1 Степень необходимой характеристики зависит от природы продукта, разнообразия обнаруженной популяции и использования данных (например, квалификация стерилизации).

А.6.2.2 Для характеристики микроорганизмов, входящих в состав биологической нагрузки на/в медицинской продукции, может быть использован широкий спектр методов.

Типичные методы микробиологической характеристики биологической нагрузки включают колонию, морфологию колоний, клеточную морфологию, окрашивающие свойства, селективное культивирование и идентификацию микроорганизмов.

Ниже приведены подробные сведения об этих методах.

a) Морфологию колоний можно четко представить, когда получено количество колоний. Описание морфологии колонии несколько субъективно и включает в себя цвет, форму, размер, текстуру, пределы, высоту и другие физически наблюдаемые характеристики колонии. Сама по себе эта информация не способствует выявлению тенденции (см. А.8). Обычно ее можно использовать для того, чтобы различать бактериальные и плесневые изоляты и первоначально определять, являются ли колонии на агаре одним и тем же микроорганизмом. Дальнейшая характеристика с целью выявления источников контаминации требует более конкретных методов.

b) Для характеристики микроорганизмов часто используют методы клеточной морфологии и окрашивания, такие как влажный мазок и окраска по Граму. Преимущества этих методов заключаются в том, что они требуют применения минимального оборудования и времени и могут дать ценную информацию об общих характеристиках микроорганизмов. Характеристика грибков (например, плесени и дрожжей) с помощью физического описания и влажного нативного мазка может быть достаточной для большинства изолятов.

c) Селективное культивирование и дифференциальные среды могут быть использованы для ингибирования роста определенных микроорганизмов, их отбора или оказания помощи в дифференциации одних микроорганизмов от других (например, цвет колонии на определенных средах), что может быть полезно для характеристики микроорганизма.

d) Идентификация микробов может быть выполнена с использованием фенотипических или генотипических методов или их комбинации. Классические фенотипические испытания, такие как морфология колоний и клеток, реакции окрашивания по Граму и окрашивание спор, способность расти аэробно или анаэробно, а также простые биохимические реакции (например, каталаза, оксидаза, индол) обычно дают определенное представление о группе или роде, к которым принадлежит бактерия. Более сложные биохимические и серологические испытания, генотипические или протеомные методы могут идентифицировать бактерии на уровне рода, вида или штамма. Аналогичный метод можно применить к дрожжам и плесени. Сочетание морфологических и физиологических свойств может быть использовано для обоснования родов, а биохимические ассимиляции — для дифференциации видов.

В таблице А.3 представлена информация об общих методах характеристики биологической нагрузки.

Таблица А.3 — Признаки распространенных методов характеристики биологической нагрузки

Метод	Пример	Специфичность
Морфология колоний	Форма, высота, пределы, размер, цвет	Низкая
Морфология клеток	Форма (палочка, кокки, дрожжи). Размер, агрегация (кластеры группировка, цепочки). Анатомия (грибковые структуры)	От низкой до умеренной
Окрашивающие свойства	Дифференциальное окрашивание (окраска по Граму, окраска спор, устойчивость к кислоте). Окраска грибов	От низкой до умеренной

Окончание таблицы А.3

Метод	Пример	Специфичность
Селективное культивирование и дифференциальные среды	Тепловой шок, параметры инкубации, селективные питательные среды	От умеренной до высокой
Идентификация рода/вида	Генетические и биохимические методы и системы идентификации	Высокая

А.7 Валидация метода определения биологической нагрузки

А.7.1 Общие положения

В целом классические микробиологические методы представляют собой сложную задачу для пользователя при валидации по определению биологической нагрузки. Как правило, необходимость валидировать микробиологические методы или методы, описанные в национальных и международных стандартах и фармакопеях, отсутствует. Эти методы должны быть проверены только на их точность и надежность в определенных условиях использования. Таких действий обычно достаточно, чтобы подтвердить обоснованность определения биологической нагрузки.

При валидации методов испытаний биологической нагрузки необходимо учитывать два аспекта. Первый — это способность нейтрализовать ингибирующие факторы в тест-системе, чтобы позволить микроорганизмам размножаться (пригодность метода биологической нагрузки), а второй — способность удалять и культивировать микроорганизмы из продукта (эффективность восстановления биологической нагрузки).

Когда методы определения биологической нагрузки включают удаление микроорганизмов из продукта, наибольшее опасение вызывает эффективность процесса удаления. Валидация процесса удаления и культивирования называется эффективностью восстановления биологической нагрузки (подробнее см. приложение С).

А.7.2 Валидация

А.7.2.1 Целесообразность метода биологической нагрузки

Проверку пригодности метода биологической нагрузки используют для демонстрации того, что продукт не препятствует росту или обнаружению микроорганизмов. Продукт может содержать вещества, ингибирующие микроорганизмы в условиях испытания биологической нагрузки.

При испытании продукта, содержащего антимикробные вещества, следует использовать разведение или подходящие методы инактивации/нейтрализации.

Ингибирующее действие веществ, элюированных из продукта, должно быть исследовано на стадии предварительных экспериментов, чтобы оценить, содержит ли продукт вещества, которые могут вызывать ингибирование роста микроорганизмов в условиях испытания на биологическую нагрузку. Документальное обоснование может быть приемлемым, если изделие содержит материалы, которые уже известны или были продемонстрированы как инертные.

Следует рассмотреть вопрос о пригодности метода биологической нагрузки:

a) когда появляются новые или модифицированные продукты, а также

b) каждый раз, когда происходит изменение условий проведения испытания (например, условия инкубации, экстракционные среды).

Применение методов к продуктам с заданной пригодностью для микробоцидных или микробостатических веществ (например, мембранная фильтрация с валидированной процедурой промывки мембран) не требует проверки пригодности конкретного продукта методом биологической нагрузки.

А.7.2.2 Эффективность восстановления биологической нагрузки

Существует два основных подхода, доступных для проверки эффективности удаления микроорганизма из медицинских продуктов (см. С.1.4):

- повторяющееся восстановление: повторная обработка образца продукта с последующей количественной оценкой степени восстановления;
- инокуляция продукта: продукт инокулируют заданными уровнями микроорганизмов с последующей количественной оценкой степени восстановления.

Первый из этих подходов имеет преимущество при использовании естественных микроорганизмов, но требует умеренной или высокой начальной биологической нагрузки. Если это так, то первый подход может быть предпочтительным в зависимости от продукта и/или конфигурации. Второй подход создает модельную систему для целей испытания, но при этом возникают вопросы применимости к восстановлению естественных микроорганизмов. Дополнительная информация приведена в таблице С.1.

Менее традиционные продукты (например, комплексные или сложные продукты, содержащие порошки, жидкости, антимикробные агенты, многочисленные компоненты) могут потребовать сочетания подходов оценки эффективности восстановления биологической нагрузки. Дополнительная информация приведена в приложении С.

Для жидких продуктов, которые подвержены фильтрованию, или при использовании метода НВЧ определение эффективности восстановления биологической нагрузки и расчет корректирующего коэффициента биологи-

ческой нагрузки не являются необходимыми. Однако пригодность метода испытаний для подсчета должна быть оценена.

А.7.2.3 Подсчет и условия культивирования

Дополнительные указания по подсчету приведены в разделе В.6.

Условия культивирования (т. е. среды и условия инкубации), выбранные для использования при определении биологической нагрузки, не могут быть рассчитаны на обнаружение всех потенциальных микроорганизмов. Поэтому на практике вполне вероятно, что биологическая нагрузка будет недооценена. Тем не менее решение о соответствующих условиях культивирования должно быть принято.

Один из методов оценки условий культивирования состоит в выборе условий культивирования на основе знаний о производственном процессе, окружающей среде, материалах и микроорганизмах, которые, как ожидается, будут присутствовать. Если согласно конкретным характеристикам продукта необходима дополнительная оценка, то микроорганизмы, подсчитанные в типичных условиях культивирования, сравнивают с микроорганизмами, обнаруженными в альтернативных условиях культивирования. Если этот метод указывает на то, что низкая доля биологической нагрузки обнаруживается в типичных условиях культивирования, то альтернативные условия культивирования должны быть пересмотрены для оптимизации определения, что особенно важно для тех медицинских продуктов, в которых антимикробные препараты могут влиять на рост микробов.

При выборе методов для использования в микробиологической характеристике микроорганизмов необходимо учитывать следующее:

- риск для производимого продукта с учетом метода квалификации стерилизации;
- ранее доступные данные;
- цель генерации данных;
- характер производственного процесса (например, использованная вода, ручное управление, автоматизация) и продукта.

А.8 Рутинное определение биологической нагрузки и интерпретация данных

А.8.1 Общие положения

Для демонстрации того, что эффективный контроль микробиологического качества внедрен и поддерживается, следует разработать программу мониторинга продукта и/или компонентов.

Общепринятой практикой является использование выборки размером от трех до десяти единиц для рутинного мониторинга биологической нагрузки.

В тех случаях, когда данные биологической нагрузки используют для удовлетворения требований другого стандарта (например, стандартов серии ИСО 11137), размер выборки и частота испытаний могут быть предопределены в соответствии с этим стандартом, согласно которому будет заменен рекомендуемый размер выборки.

Рациональный выбор размера выборки в первую очередь зависит от двух факторов.

a) Изменение биологической нагрузки должно быть обнаружено.

Это будет зависеть от последствий, связанных с изменением (увеличением или уменьшением) биологической нагрузки, и от того, как применяется информация о биологической нагрузке. Для раннего выявления небольшого изменения средней биологической нагрузки может потребоваться большой размер выборки.

b) Вариация оценок количества жизнеспособных микроорганизмов, присутствующих на отдельных образцах.

Степень этой изменчивости будет определять размер выборки, необходимый для обнаружения данного изменения. Небольшие вариации между позициями в таких оценках потребуют меньшего размера выборки для обнаружения изменений, чем это нужно для больших вариаций между позициями.

Большие размеры выборки могут способствовать обнаружению значительных изменений.

Следует признать, что способ использования данных биологической нагрузки может влиять на уровень достоверности обнаружения изменения заданной величины. Необходимо сделать рациональный выбор величины обнаруживаемого изменения и вероятности достижения этого обнаружения.

Рациональный выбор частоты мониторинга должен быть сделан с учетом различных факторов, включающих следующие:

- наличие предыдущих данных;
- цель генерации данных;
- характер производственного процесса;
- частота производства продукта;
- критичность своевременного обнаружения изменений биологической нагрузки;
- сезонные и экологические изменения.

Отбор проб может быть осуществлен с периодичностью, основанной на времени (например, ежемесячно, ежеквартально) или на объеме производства (например, альтернативные партии). Однако для того, чтобы установить исходные уровни, общепринятой практикой является определение биологической нагрузки с высокой частотой в начале производства нового продукта и со снижением этой частоты по мере получения информации о биологической нагрузке в процессе производства.

Частота определения биологической нагрузки должна обнаруживать изменения в биологической нагрузке, например: вызванные сезонными колебаниями, производственными изменениями или изменениями в материалах.

А.8.2 Пределы обнаружения и подсчет на агаре

А.8.2.1 Пределы обнаружения

Пределы обнаружения (LOD) для методов испытания биологической нагрузки следует принимать во внимание при определении значения биологической нагрузки. Для микробиологической отчетности, когда часть экстракта исследуют на биологическую нагрузку и извлекают нулевые колонии, результаты обычно регистрируют как менее чем «*X*», где «1/*X*» является репрезентативным для фракции исследуемой части. Например, если изделие экстрагируется в 400 мл и 1/4 экстракта фильтруется, результаты нулевых колоний будут регистрироваться как менее 4 колониеобразующих единиц (т. е. < 4 КОЕ). Таким образом, LOD для этого примера равен 4. В микробиологической отчетности результат < 4 КОЕ означает, что, возможно, весь экстракт содержит либо 0, 1, 2 или 3 КОЕ, но правила микробиологической отчетности требуют, чтобы он был представлен как < 4 КОЕ.

Индивидуальные результаты биологической нагрузки представлены целыми числами, потому что это число является репрезентативным для колониеобразующей единицы. Средние значения или другие математические вычисления с использованием данных биологической нагрузки обычно приводят с точностью до одного десятичного знака.

LOD может быть усовершенствован следующим образом:

a) изменение метода испытания (например, фильтрация большей части экстракта);

b) объединение нескольких образцов;

c) использование другого метода тестирования, такого как НВЧ.

А.8.2.2 Подсчет на агаре

В стандартных микробиологических методах для других промышленных применений рекомендуется выбирать чашки с агаром, содержащие приемлемые диапазоны (например, менее 200 КОЕ, от 25 до 250 КОЕ или от 30 до 300 КОЕ). Это применимо, когда выполняется несколько разбавлений, из которых можно выбрать. Однако при испытании биологической нагрузки это не всегда так, потому что:

- многие продукты имеют низкую биологическую нагрузку, которая будет иметь количество на пластине менее чем, например, 30 КОЕ;

- многократные разбавления не всегда необходимы, когда количество невелико.

Для этих ситуаций целесообразно регистрировать и использовать количество менее 30 КОЕ. Подсчет на агаре можно проводить тремя различными способами:

a) прямой подсчет КОЕ;

b) приблизительное количество;

c) отсчеты, выходящие за пределы счетных или расчетных диапазонов.

Посредством прямого подсчета в таблицу сводят все колонии непосредственно с помощью любого метода, который облегчает точные подсчеты (электронный счетчик, маркировочные таблички и т. д.).

Предполагаемый подсчет может быть выполнен, когда колонии на части агара могут быть подсчитаны и умножены на оставшиеся части агара.

Приблизительный подсчет — это один из способов получения подсчета при наличии распространяющихся колоний. Этот метод обычно применяют, когда распространяющиеся колонии не вытесняют другие колонии (из-за размера или непрозрачности).

Подсчеты, выходящие за пределы счетного или расчетного диапазона, могут быть полуколичественными, если это значение может быть округлено на основе наличия различимых колоний. Однако, если это невозможно сделать, следует установить результат предельно большого количества подсчетов (TNTC). Приемлемой практикой является исключение результатов TNTC из среднего значения для группы выборок. Результаты TNTC должны быть исследованы.

Когда используют дубликаты чашек с агаром, коэффициенты разбавления или аликвоты, количество чашек с агаром должно быть соответствующим образом скорректировано, чтобы получить количество для одного продукта.

А.8.3 Микробиологическая характеристика

Если при микробиологической характеристике выделяют типы микроорганизмов, не входящие в состав нормальной биологической нагрузки, следует рассмотреть вопрос об оценке значимости присутствия этих изолятов.

А.8.4 Данные биологической нагрузки для определения степени обработки

Дополнительные указания отсутствуют.

А.8.5 Пики биологической нагрузки

Данные биологической нагрузки могут демонстрировать значение, которое существенно больше (обычно называемые пики биологической нагрузки), чем другие значения в ряде полученных. Этот пик биологической нагрузки может произойти в одной из двух следующих ситуаций:

a) это значение не является нормальной и последовательной частью распределения биологической нагрузки;

b) то значение может быть нормальной и последовательной частью распределения биологической нагрузки.

Можно определить, что скачок (пик) биологической нагрузки не является нормальной и последовательной частью распределения биологической нагрузки, изучив производственную практику, микробиологические испытания и обработку образцов. В данном разделе установлено, как определить и как действовать в данной ситуации.

Анализируя предыдущие данные, можно определить, что скачок (пик) биологической нагрузки является нормальной и последовательной частью распределения биологической нагрузки. Предыдущие данные могут демонстрировать периодическое появление большей величины, которая находится в пределах ожиданий, что делает ее последовательной частью биологической нагрузки. Если эти данные состоят из микроорганизмов, обычно встречающихся на продукте, это делает его нормальной частью биологической нагрузки. Эти увеличения следует учитывать при определении степени обработки процесса стерилизации. Например, увеличение биологической нагрузки может произойти из-за несоответствия сырья или производственных процессов, связанных с чрезмерной обработкой.

В примере, приведенном в таблице А.4, есть 3 партии (партии 2, 5, 6) в 10 партиях, которые содержат индивидуальные значения, существенно превышающие среднее значение партии (в данном примере в пять и более раз среднее значение партии). Установлено, что эти высокие значения являются нормальной и последовательной частью биологической нагрузки. Следовательно, высокие значения и/или средние значения партии для тех партий, которые содержат высокие значения, могут быть приняты во внимание при определении общей средней биологической нагрузки для определения степени обработки в процессе стерилизации.

Таблица А.4 — Пример данных по биологической нагрузке, включающих пик биологической нагрузки

Номер партии	Номер образца										Среднее значение (КОЕ/ изделие)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	4	20	12	12	4	32	28	4	4	8	12,8
2	12	32	20	458	88	120	40	44	36	60	91,0
3	36	44	52	88	36	48	344	96	180	128	105,2
4	30	4	8	4	12	24	24	20	28	4	15,8
5	36	52	48	36	920	4	36	72	4	36	124,4
6	36	32	12	36	36	36	386	72	88	36	77,0
7	40	20	52	44	36	4	36	44	52	308	63,6
8	24	20	12	16	4	24	36	80	24	8	24,8
9	8	40	20	48	12	8	4	20	28	44	23,2
10	40	104	8	16	28	24	44	8	4	8	28,4
											56,6

А.8.6 Уровни биологической нагрузки

При превышении указанных уровней должен быть принят заранее определенный порядок действий. Если корректирующие действия приводят к изменениям в процессе, влияющим на биологическую нагрузку, следует получить новые данные и установить новые уровни для данного продукта.

Указанные уровни, используемые для биологической нагрузки, обычно основаны на предыдущих данных для продукта и реализации цели, для которой эти данные должны быть использованы. До сбора предыдущих данных, если требуются временные уровни, они могут быть установлены после оценки первых трех или более партий этого продукта. Предыдущие данные по аналогичным продуктам, производственным процессам и/или производственным средам также могут быть использованы при установлении временных уровней для новых производственных линий. Для некоторых продуктов можно ожидать значительных сезонных колебаний биологической нагрузки. Сезонные изменения влажности и/или температуры также могут изменить типы и количество микроорганизмов в биологической нагрузке. Основываясь на последовательных результатах испытаний, данные биологической нагрузки должны быть повторно оценены через определенный период времени, чтобы проверить, сохраняется ли соответствие биологической нагрузки исходным уровням.

Предыдущие данные биологической нагрузки используют для установления уровней биологической нагрузки, которые обычно определяют как уровни оповещения и уровни действий. При установлении этих уровней следует учитывать используемый метод, основанный на предполагаемом применении поступающей информации. Например, уровни могут быть использованы для оценки поставщиков сырья, квалификации или демонстрации постоянной эффективности процесса стерилизации или для оценки эффективности экологического контроля в производственном процессе.

Наряду с установлением уровней следует рассмотреть вопрос о принятии мер в том случае, если этот уровень будет превышен. Эти действия должны быть основаны на том, что биологическая нагрузка состоит из живых микроорганизмов и испытание биологической нагрузки определяет биологическую нагрузку продукта, который рас-

положен в изделии и/или на нем различными способами. Не ожидается, что биологические данные о микроорганизмах будут точными, но, скорее всего, в них присутствует значительный диапазон. Также не требуется, чтобы данные о биологической нагрузке соответствовали какому-либо статистическому распределению.

Одним из распространенных методов определения уровней готовности и воздействия биологической нагрузки является использование стандартных погрешностей. В этом случае расчет стандартной погрешности применяют для распределения данных, при этом соответствие данных биологической нагрузке определенному статистическому распределению не является приоритетным.

Данные, идентифицированные как нестандартно высокие или низкие или как нетипичные тенденции, должны быть исследованы. Нетипичные данные, имеющие определенную причину (например, лабораторная ошибка, случайные высокие значения, обнаруженные в производственном процессе), могут быть исключены из расчетов при установлении уровней для мониторинга биологической нагрузки. Когда данные по биологической нагрузке анализируют для использования в решении, связанном с качеством, в анализ включают индивидуальные результаты тестирования, такие как «отсутствие увеличения» или «чрезмерно большое количество для подсчета» (TNTC).

А.8.7 Анализ данных

Графическое представление данных, собранных в течение определенного времени, может быть целесообразным для разграничения фактических тенденций от изменчивости выборки, а также представление данных может указывать на то, что произошло значительное изменение микробиологической популяции, даже если значения биологической нагрузки находятся в пределах заданных уровней.

Прежде чем проводить статистические вычисления по данным, полученным на основе определений биологической нагрузки, особенно при фиксировании большого количества наблюдений, может возникнуть необходимость в управлении данными таким образом, чтобы выявить существенные особенности. Это можно сделать качественным образом, объединив измерения для формирования частотных таблиц и диаграмм. После завершения работы данные могут быть изучены на предмет предполагаемых тенденций.

Существует целый ряд методов определения тенденции, которые могут быть применены к биологической нагрузке. Эти тенденционные методы могут быть, но не ограничиваются ими, тенденционными средними значениями биологической нагрузки или оценками биологической нагрузки, контрольными картами Шухарта по ИСО 7870-2, контролем на основе диапазона (BOR) или CUSUM-тестами по ИСО 7870-4. Каждый из этих различных методов может быть использован для установления возможного отклонения от стандартного случайного разброса результатов и выделения отклонений.

В некоторых случаях может оказаться целесообразным использование более одного из этих методов для определения того, следует ли предпринимать какие-либо действия на основе имеющегося набора данных или требуются дополнительные данные.

А.8.8 Статистические методы

В ИСО 13485 приведены требования к планированию соответствующих методов измерения и анализа, включая выбор подходящих статистических методов. Изучение данных, полученных в результате определения биологической нагрузки для широкого спектра продукта, иллюстрирует изменчивость таких данных. Значения биологической нагрузки из группы будут варьироваться в пределах группы предметов, и, следовательно, при анализе данных обычно используют соответствующие средства. Очевидно, что эти средние значения могут принимать высокие, промежуточные или низкие значения, а средние значения будут меняться с течением времени. Кроме того, типы микроорганизмов, входящих в состав биологической нагрузки, также могут варьироваться.

Как правило, наблюдаемая характеристика частотных распределений данных, полученных из определений биологической нагрузки, заключается в том, что распределения являются искаженными и могут демонстрировать значение остатка. Для низких или промежуточных данных модальное значение равно нулю. В этих условиях биологическая нагрузка, как правило, низкая, но иногда могут быть и высокие значения, даже несмотря на эффективное применение контрольных мер.

А.9 Содержание метода определения биологической нагрузки

А.9.1 Изменения в продукте и/или производственном процессе

Изменения в продукте и/или производственном процессе также должны быть пересмотрены на предмет возможного влияния на эффективность метода определения этого уровня. Результаты проверки должны быть зафиксированы (см. 4.1.2). В некоторых случаях может возникнуть необходимость в изменении и/или переквалификации метода определения биологической нагрузки.

А.9.2 Изменения в методике определения биологической нагрузки

В настоящем стандарте требования не приведены.

А.9.3 Переаттестация метода определения биологической нагрузки

В настоящем стандарте требования не приведены.

Приложение В
(справочное)

Руководство по методам определения биологической нагрузки

В.1 Общие положения

В.1.1 Определение биологической нагрузки может быть использовано в разных ситуациях. Лицо, ответственное за порядок проведения процесса подобного рода определений, должно принимать во внимание, в какой степени необходимы разработка и валидация метода. Кроме того, следует учитывать конкретные обстоятельства, при которых проводят процессы определения, например: частоту отбора проб, используемый метод, характеристику питательных сред и соответствующие условия инкубации.

В.1.2 Последовательность ключевых этапов процесса определения биологической нагрузки приведена на рисунке В.1. Лицо, ответственное за проведение процесса таких определений, должно использовать знания о сырье, компонентах, производственной среде, производственных процессах и характере продукта для выбора соответствующих методов для различных этапов. Для правильной разработки и последующей валидации метода возможно, что первоначально потребуется использовать комбинацию различных методов, чтобы установить метод(ы), наиболее подходящий(ие) для рутинного использования.

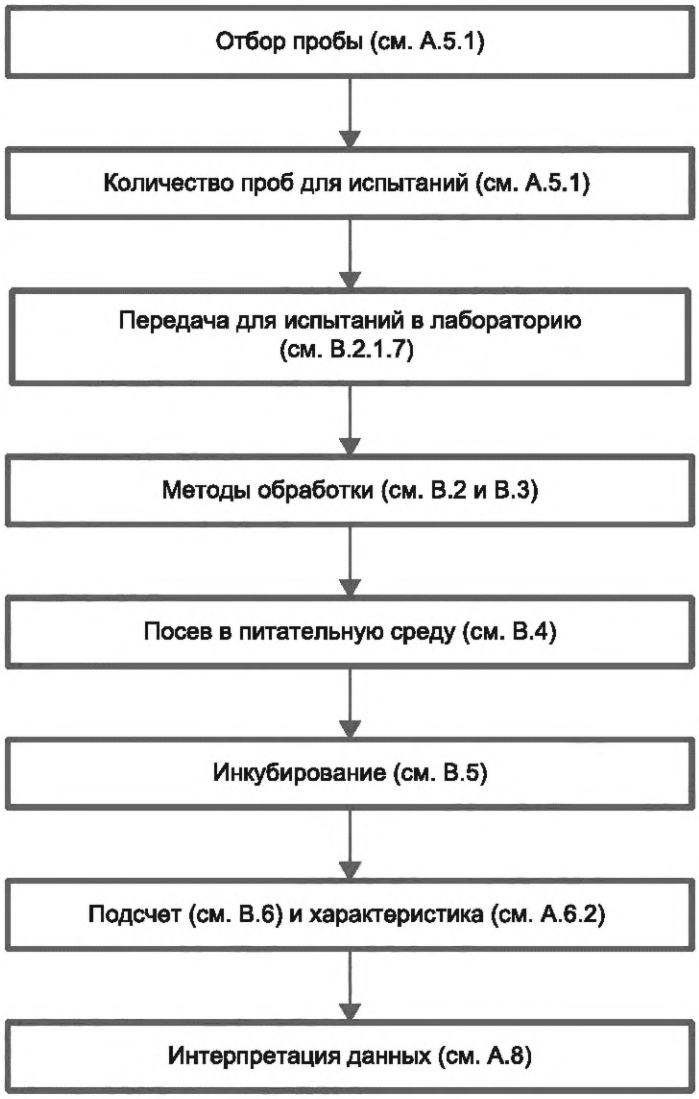

Рисунок В.1 — Последовательность ключевых этапов процесса определения биологической нагрузки

B.2 Методы, в которых использовано извлечение микроорганизмов элюированием

B.2.1 Общие положения

B.2.1.1 Несколько методов, представленных в настоящем приложении, могут быть объединены для увеличения числа обнаруженных микроорганизмов и уменьшения изменчивости.

B.2.1.2 Степень адгезии микроорганизмов к поверхностям зависит от характера поверхности, включенных микроорганизмов и других присутствующих материалов (например, смазочных материалов). Происхождение контаминации также будет влиять на степень адгезии. Чтобы извлечь микроорганизмы, используемые процедуры могут состоять из промывки с применением физической силы или прямого отбора проб данной поверхности. Поверхностно-активное вещество может быть использовано для повышения извлечения, но следует признать, что поверхностно-активные вещества в высоких концентрациях могут оказывать ингибирующее действие.

B.2.1.3 Для материалов, контактирующих с нестерильными жидкостями, микроорганизмы могут возникать в виде биопленки, если не будут приняты соответствующие меры контроля биологической нагрузки. Биопленка — это структура, в которой микроорганизмы инкапсулированы в матрицу, прочно прилегающую к поверхности. Микроорганизмы в биопленках могут проявлять повышенную устойчивость к процессам стерилизации. Биопленки могут появляться и быстро развиваться в большей степени на медицинских продуктах, содержащих ткани, или на используемых изделиях. В таких случаях следует учитывать потенциал образования биопленки и не следует предполагать, что методы обработки, перечисленные в B.2.2, будут пригодны для полного освобождения микроорганизмов от биопленки. Указание на наличие биопленки может быть получено во время валидации метода удаления, если при повторном восстановлении регистрируется повторное высокое количество микробов. Высокий уровень эндотоксина также может быть признаком присутствия биопленки.

B.2.1.4 Любая обработка, используемая при определении биологической нагрузки, должна быть воспроизводимой, и, кроме того, следует избегать тех условий, которые могут повлиять на жизнеспособность микроорганизмов, таких как чрезмерная кавитация, поперечные силы, повышение температуры или осмотический шок.

B.2.1.5 Некоторые методы обработки легче контролировать, чем другие. Переменные процесса обработки и способы их контроля следует учитывать при выборе обработки и разработке подходящих условий обработки. Например, для данной обработки может быть увеличено время или характер механического перемешивания может быть изменен, чтобы увеличить извлечение микроорганизмов.

B.2.1.6 Некоторые методы обработки могут дезагрегировать исследуемый продукт (например, дезинтеграция, обработка в стоматере отмыванием и вихревое перемешивание). Наличие дезагрегированного материала может затруднить подсчет микроорганизмов. Возможна дополнительная обработка, например для отделения дезагрегированного материала от элюента. Следует проследить за тем, чтобы полученные подсчеты были репрезентативными. Некоторые виды микроорганизмов более склонны к агрегации/реагрегации, чем другие, основанные главным образом на их относительной гидрофобности.

B.2.1.7 Необходимо как можно быстрее передать образцы для испытаний в лабораторию. Если задержка в передаче неизбежна, то следует выбрать такие условия хранения, которые соответствуют установленным и которые позволяют свести к минимуму изменения в микробной популяции. Следует указать максимальное время хранения. Высушивание может быть причиной значительного снижения численности микроорганизмов и должно быть учтено при выборе условий и сроков хранения.

B.2.2 Методы извлечения

B.2.2.1 Обработка в стоматере отмыванием

B.2.2.1.1 Испытуемый образец и указанный объем элюента помещают в стерильный пакет.

Возвратно-поступательные лопасти воздействуют на пакет, выталкивая элюент через образец и вокруг него.

B.2.2.1.2 Должно быть определено время обработки.

B.2.2.1.3 Этот метод особенно подходит для мягких, волокнистых и/или абсорбирующих материалов, но непригоден для любых материалов, которые могли бы проколоть пакет (например, устройства, содержащие иглы или жесткие предметы).

B.2.2.1.4 Этот метод может дать суспензию с низкой концентрацией микроорганизмов, если используется относительно большой объем элюента. Если это практически возможно, элюент следует отфильтровать.

B.2.2.2 Ультразвуковое исследование

B.2.2.2.1 Испытуемый предмет погружают в указанный объем элюента в подходящем сосуде. Либо сосуд и его содержимое обрабатывают в ультразвуковой ванне, либо ультразвуковой зонд погружают в содержащийся в нем элюент. Микроорганизмы также могут быть инактивированы ультразвуком, особенно с большей передачей энергии, и инактивация более вероятна при использовании зонда, чем в ультразвуковой ванне. Оценку метода ультразвукового испытания следует проводить в соответствии с B.9.

B.2.2.2.2 Следует определить номинальную частоту ультразвукового воздействия и продолжительность обработки. Кроме того, должно(ы) быть определено(ы) положение(я), в котором(ых) предметы помещают в ультразвуковую ванну. Следует рассмотреть вопрос об ограничении количества предметов, подлежащих одновременной обработке, поскольку имеющаяся мощность ультразвука может быть уменьшена за счет экранирования.

B.2.2.2.3 Этот метод особенно подходит для твердых непроницаемых предметов и предметов сложной формы. Он может быть разрушительным для некоторых медицинских продуктов, особенно тех, которые содержат электронные компоненты, такие как имплантируемые генераторы импульсов.

В.2.2.2.4 Энергия ультразвука и продолжительность воздействия не должны вызывать разрушения и гибели микроорганизмов или перегрев элюента.

В.2.2.3 Встряхивание (механическое или ручное)

В.2.2.3.1 Испытуемый образец погружают в указанный объем элюента в подходящем сосуде и встряхивают на механическом шейкере (например, возвратно-поступательного, орбитального или запрокидываемого действия) в течение определенного времени/числа циклов, чтобы способствовать извлечению микроорганизмов. Можно использовать ручное встряхивание, но его эффективность может варьироваться в зависимости от оператора.

В.2.2.3.2 Должны быть определены время и частота встряхивания.

В.2.2.3.3 Стеклянные шарики определенного размера могут быть добавлены для увеличения поверхностного трения и, таким образом, эффективности восстановления биологической нагрузки. Размер добавленных стеклянных шариков, а также время и частота встряхивания не должны быть такими, чтобы вызывать перегрев и/или возможное повреждение микроорганизмов.

Примечание — Добавление стеклянных шариков увеличит площадь поверхности, к которой могут прилипать микроорганизмы.

В.2.2.4 Вихревое перемешивание

В.2.2.4.1 Испытуемый образец погружают в закрытый контейнер, содержащий указанный объем элюента, на который воздействует вращающаяся лопатка вихревого смесителя таким образом, чтобы создавался вихрь. Создаваемый вихрь будет зависеть от давления, приложенного вручную. Изменения в вихре могут вызывать изменения в процессе извлечения микроорганизмов.

В.2.2.4.2 Должны быть выбраны определенная емкость, которая будет использована, время перемешивания и скорость миксера.

В.2.2.4.3 Применение этого метода непродолжительно по времени и не вызывает затруднений при исполнении, но в основном подходит для небольших предметов в небольших контейнерах. Оценка различий в удалении должна быть проведена у разных людей, работающих с вихревым смесителем.

В.2.2.5 Смывание

В.2.2.5.1 Элюент пропускают через внутренние полости испытуемого образца. Поток жидкости может быть вызван гравитацией или перекачкой либо с помощью насоса. В качестве альтернативы предмет может быть заполнен элюентом, зажат и перемешан.

Следует определить время контакта изделия с элюентом, скорость промывки и объем жидкости.

В.2.2.5.2 Конфигурация изделия и размеры просвета могут ограничивать физические усилия, необходимые для полного удаления микроорганизмов с внутренних поверхностей.

В.2.2.6 Смешивание (дезинтеграция)

В.2.2.6.1 Испытуемый предмет погружают в указанный объем элюента в подходящей емкости. Этот предмет перемешивают или измельчают в течение определенного времени.

В.2.2.6.2 Указанное время зависит от предмета и смесителя, но не должно быть продлено, например, вызвав перегрев элюента и возможное повреждение микроорганизмов.

В.2.2.6.3 Этот метод обеспечивает способ разделения предмета на достаточно мелкие части, чтобы микроорганизмы могли быть подсчитаны методом заливки агаром.

В.2.2.7 Отбор проб с использованием тампонов

В.2.2.7.1 Тампоны состоят из абсорбирующего материала, который обычно крепят на форме в виде палочки или рукоятки. Материал для отбора проб может быть растворимым или нерастворимым.

В.2.2.7.2 Обычный метод использования заключается в том, чтобы смочить тампон элюентом и протереть заранее определенную площадь поверхности предмета. Эффективность восстановления биологической нагрузки в некоторых случаях может быть повышена за счет предварительного увлажнения поверхности, а затем протирания ее сухим тампоном. Тампон переносят в разбавитель и встряхивают для удаления микроорганизмов из тампона. В качестве альтернативы тампон растворяется в разбавителе — в случае растворимых тампонов.

В.2.2.7.3 Тампоны — это полезный метод отбора проб неправильной формы или наличия труднодоступных участков. Они также необходимы при отборе проб на большой площади.

В.2.2.7.4 Этот метод особенно подвержен ошибкам из-за различий в способе манипулирования тампоном. Кроме того, маловероятно, что все микроорганизмы на поверхности будут собраны тампоном. Некоторые из собранных микроорганизмов могут попасть в матрицу самого тампона, вследствие чего восстановление с помощью данного метода, как правило, является низким.

В.2.2.7.5 В тампоне не должно быть микробоцидных или микробостатических агентов.

В.2.3 Элюенты, разбавители и транспортные среды

В.2.3.1 Во время определения биологической нагрузки элюенты могут быть использованы для извлечения микроорганизмов из продукта. Транспортные среды могут быть применены для переноса извлеченных микроорганизмов для подсчета, а разбавители — для получения суспензий, содержащих микроорганизмы в счетном количестве.

В.2.3.2 Свойства элюентов и разбавителей могут оказывать заметное влияние на общую эффективность используемого метода. При выборе разбавителя или элюента следует учитывать их состав (например, составляю-

щие компоненты и их концентрации, осмотическое давление и pH). При наиболее благоприятном варианте состав должен быть таким, чтобы не происходило пролиферации или инактивации микроорганизмов, однако это может оказаться невозможным установить для всех потенциальных контаминантов.

В.2.3.3 При использовании жидкости для извлечения микроорганизмов с твердых поверхностей можно добавить мягкое поверхностно-активное вещество (см. таблицу В.1).

В.2.3.4 Обычно используемые элюенты и разбавители включают элюенты, приведенные в таблице В.1.

Таблица В.1 — Примеры элюентов и разбавителей

Раствор	Концентрация в воде	Применение
Буферизованный раствор хлорида натрия-пептона	0,067 М фосфат, 0,43 % хлорид натрия, 0,1 % пептон	Общие положения
Калгон Рингера	1/4 прочности	Растворение альгинатных тампонов кальция
Пептонная вода	От 0,1 % до 1,0 %	Общие положения
Фосфатно-солевой буфер	0,02 М фосфата, 0,9 % хлорид натрия	Общие положения
Раствор Рингера	1/4 прочности	Общие положения
Хлорид натрия	От 0,25 % до 0,9 %	Общие положения
Тиосульфат Рингера	1/4 прочности	Нейтрализация остаточного хлора
Вода	N/A	Разбавление водных проб. Приготовление изотонических растворов растворимых веществ перед подсчетом
Примечание — Данный перечень не является исчерпывающим. Поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 80, может быть добавлено к элюентам и разбавителям. Обычно используют концентрацию от 0,1 % до 1,0 %, в зависимости от конкретного применения. Выбор подходящей концентрации в конкретной ситуации должен быть тщательным, поскольку может произойти вспенивание.		

В.3 Методы, при которых извлечение микроорганизмов элюированием не используют

В.3.1 Контактное покрытие

В.3.1.1 Контактные пластины или предметные стекла — это средства, с помощью которых затвердевшая питательная среда может прижиматься к поверхности для того, чтобы жизнеспособные микроорганизмы прилипли к поверхности среды. Затем пластину или предметное стекло можно инкубировать для подсчета полученных колоний.

В.3.1.2 Преимущество таких систем в том, что они просты в использовании. Результаты непосредственно связаны с областью контакта с затвердевшей питательной средой.

В.3.1.3 Потенциальными недостатками являются естественное скопление клеток на поверхности, распространение колоний на границе агара, высыхание агара и возможность анаэробного расположения.

В.3.1.4 Этот метод следует использовать только тогда, когда другие методы неприменимы, поскольку эффективность, как правило, низкая. Контактные пластины и предметные стекла обычно используют только на плоских или по крайней мере стандартных поверхностях.

В.3.2 Покрытие агаром

В.3.2.1 Покрытие агаром включает покрытие поверхности продукта расплавленной агаровой средой и позволяет ему затвердеть с последующей инкубацией для получения видимых колоний. Этот метод обычно не используется, но может быть применим, когда биологическая нагрузка низкая и когда подходит конфигурация продукта.

В.3.2.2 Потенциальными недостатками являются естественное скопление клеток на поверхности, распространение колоний на границе агара, высыхание агара и возможность наличия анаэробов. Кроме того, некоторые микроорганизмы не обязательно сохранятся в жизнеспособном состоянии после покрытия агаром при неблагоприятной температуре, что может привести к ложноотрицательным результатам или помешать правильной оценке.

В.3.3 Метод с наиболее вероятным числом (НВЧ)

В.3.3.1 Метод НВЧ — это положительно зарекомендовавший себя и полностью документированный метод оценки количества жизнеспособных микроорганизмов в том продукте, в котором микроорганизмы распределены случайным образом. Этот метод особенно подходит для продукта, имеющего биологическую нагрузку с низким средним числом.

В.3.3.2 Метод заключается в отборе реплицированных проб продукта (по объему или весу), содержащих в среднем одинаковое количество жизнеспособных микроорганизмов в каждой пробе/подпробе (требование рандомности распределения), и в индивидуальной оценке каждой выборки на предмет наличия жизнеспособных микроорганизмов путем пересева на жидкие питательные среды и инкубации. Как правило, подходят такие же питательные среды и условия, как и в ИСО 11737-2, в течение семи дней. Ряд разведений может быть инокулирован в питательную среду таким образом, чтобы часть инокулированной среды не производила видимого роста при последующей инкубации. По частоте проявления положительных тестов в наборе повторений оценивают количество жизнеспособных микроорганизмов, присутствующих в образце или массовом продукте, из которого взят образец; 95 %-ные доверительные пределы оценки относительно широки. Оценка и ее доверительные пределы получены из опубликованных таблиц НВЧ [26], которые разработаны в предположении того, что число жизнеспособных микроорганизмов, присутствующих в реплицированных образцах, распределено вокруг среднего числа в соответствии с распределением Пуассона. FDA BAM, приложение 2 [27], включает электронную таблицу для расчета НВЧ с доверительной вероятностью 95 %.

В.3.3.3 Ключевым требованием для применения метода НВЧ является рандомное распределение микробной популяции по всему исследуемому продукту. Соответственно, метод НВЧ может быть необходим при определении биологической нагрузки для жидких медицинских продуктов, вязких жидкостей, порошков или в тех ситуациях, когда биологическая нагрузка оценивается в жидкости, используемой в качестве элюента для одного продукта.

В.3.3.4 Методы НВЧ доступны в исполнении, но статистическое обоснование метода делает его более подходящим для общей оценки популяции, а не для точного определения. Метод НВЧ для 10 образцов однократного разведения показан в FDA BAM, таблица 5 [27]. Данный метод однократного разведения не предусматривает выполнения дополнительных разведений, которые могут предоставить дополнительную информацию о количестве микроорганизмов на положительном образце. Для отдельных проб или ЧПИ в качестве альтернативы для определения НВЧ может быть использована формула (В.1), которая является упрощенной версией оригинальной формулы Кохрена [42]:

$$MPN(sd\ or\ SIP) = \ln\left(\frac{n}{s}\right)\frac{1}{SIP}, \quad (B.1)$$

где *sd* — однократное разведение;

ln — натуральный логарифм;

n — общее число образцов в испытании;

s — чисто образцов для отрицательного контроля роста.

В.3.3.5 Результаты НВЧ на продукте могут быть приравнены к результатам КОЕ на продукт для подсчета и расчетов биологической нагрузки.

В.3.3.6 Если присутствуют микробоцидные или микробостатические вещества, то будут применены решения, изложенные в В.8.

В.4 Перенос на питательную среду

В.4.1 Общие положения

В.4.1.1 Обработка, как правило, приводит к образованию суспензии микроорганизмов. Подсчет жизнеспособных микроорганизмов в суспензии можно провести с помощью одного из методов, описанных ниже.

В.4.1.2 Перед переносом на питательную среду может потребоваться дополнительная обработка, чтобы разрушить агрегацию микроорганизмов и тем самым уменьшить недооценку. В некоторых случаях метод извлечения микроорганизмов из исследуемого образца также может разрушить такие агрегаты.

В.4.1.3 Наличие микробоцидных или микробостатических веществ будет влиять на выбор метода культивирования. Если в элюенте присутствуют микробоцидные или микробостатические вещества, их количество можно уменьшить до неэффективной концентрации путем разбавления, удаления фильтрацией или химической инактивацией.

В.4.2 Мембранная фильтрация

В.4.2.1 Фильтрация элюента с последующей инкубацией фильтра на соответствующей питательной среде для получения видимых колоний является эффективным средством подсчета жизнеспособных микроорганизмов. Фильтр с соответствующим номинальным размером пор не более 0,45 мкм обычно достаточен для улавливания микроорганизмов, однако следует рассмотреть возможность использования меньшего размера пор, если микроорганизмы, присутствующие на/в продукте, гарантированно меньшего размера.

В.4.2.2 Как правило, требуется источник вакуума или в некоторых случаях источник давления. Следует соблюдать осторожность во избежание чрезмерного противодавления, которое может привести к искажению или повреждению мембранного фильтра.

В.4.2.3 Мембранная фильтрация элюентов, содержащих твердые частицы, такие как остатки волокнистых продуктов, может быть затруднена, так как твердые частицы могут блокировать фильтр.

В.4.2.4 Для инкубации мембранный фильтр может быть помещен либо на поверхность агара, либо на абсорбирующую прокладку, насыщенную жидкой питательной средой. Колонии, образующиеся на поверхности мембранного фильтра, подсчитывают и выделяют для микробиологической характеристики.

В.4.2.5 Мембранная фильтрация особенно востребована для суспензий с низкими концентрациями микроорганизмов.

В.4.2.6 Фильтрация также востребована, когда жидкий субстрат проверяют на предмет содержания микробоцидных или микробостатических веществ, так как микроорганизмы удаляются из элюента и могут быть промыты на мембранном фильтре перед инкубацией. Некоторые типы мембран могут поглощать или выделять те вещества, которые могут ингибировать рост микроорганизмов, поэтому необходимо использовать только мембранные фильтры, пригодные для подсчета микроорганизмов. Мембранный фильтр и элюент должны быть совместимы.

В.4.3 Посев на чашки методом заливки (глубинным способом)

В.4.3.1 При использовании метода посева на чашки методом заливки отдельные аликвоты (определенное количество данного разведения) суспензии смешивают с расплавленной агаровой средой при температуре приблизительно 45 °С; затем смеси дают затвердеть в чашке Петри. Чашки инкубируют и подсчитывают колонии.

В.4.3.2 Посев на чашки методом заливки не отделяет микроорганизмы от элюента. Если микробоцидные или микробостатические вещества присутствуют, будут применены решения, изложенные в В.8.

В.4.3.3 Количество элюента, которое может быть внесено в чашки, ограничено. Поэтому этот метод может не иметь предпочтительной чувствительности для суспензий с низкими концентрациями микроорганизмов.

В.4.3.4 Необходимо поддерживать температуру агара как можно ниже, чтобы избежать повреждения микроорганизмов, поскольку даже температура 45 °С может инактивировать некоторые микроорганизмы окружающей среды. Таким образом, заливочное покрытие имеет ограничения по типам микроорганизмов, которые могут быть обнаружены, хотя модификации с использованием карбоксиметилцеллюлозы в качестве регулятора могут быть возможны в особых случаях.

В.4.4 Посев на поверхность чашек

В.4.4.1 При использовании метода посева на поверхность чашек аликвоту суспензии распределяют по поверхности питательной среды с помощью распределяющего устройства.

В.4.4.2 Аликвота (определенное количество данного разведения) суспензии, которая распределена по поверхности среды, должна быть поглощена таким образом, чтобы могли развиться отдельные колонии; потребность в поглощении определяет объем аликвоты, который может быть обработан при использовании одной чашки.

В.4.4.3 Если присутствуют микробоцидные или микробостатические вещества, то будут применены решения, изложенные в В.8.

В.4.4.4 Количество элюента, которое может быть нанесено на чашку с агаром, ограничено. Поэтому этот метод может не иметь предпочтительной чувствительности для суспензий с низкими концентрациями микроорганизмов.

В.4.5 Спиральный метод посева

В.4.5.1 В технике спирального посева на чашку используют автоматизированное оборудование, которое распределяет аликвоту (суспензии) на поверхность твердой среды. Суспензия распределяется с уменьшающейся скоростью по спиральной дорожке от центра культуральной чашки к периферии. После соответствующей инкубации подсчет жизнеспособных микроорганизмов в исходной суспензии осуществляют с использованием определенной счетной сетки и метода подсчета, при котором основой для расчетов является общее количество чашек или секторов.

В.4.5.2 Установлено, что спиральный метод посева дает воспроизводимые результаты, наиболее приемлемым образом коррелирующие с теми, которые применяют при использовании обычных методов последовательного разбавления и поверхностного растекания. Благодаря конструкции аппарата и использованию капиллярных трубок и небольших объемов спиральное покрытие в первую очередь поддается инокуляции суспензиями, которые распределены надлежащим образом, свободны от агрегатов материала и содержат высокую концентрацию микроорганизмов.

В.4.5.3 Если присутствуют микробоцидные или микробостатические вещества, то будут применены решения, изложенные в В.8.

В.5 Инкубация (питательные среды и условия инкубации)

В.5.1 Примеры некоторых питательных сред и условий инкубации приведены в таблице А.2. Этот перечень не является исчерпывающим, и определение типа(ов) биологической нагрузки микроорганизмов, присутствующих на продукте, в том числе молекулярным путем, может спровоцировать включение или исключение этих или многих других сред для микробной культуры.

В.5.2 Следует отметить, что все методы неселективного культивирования анаэробов могут позволить также выявить рост факультативных аэробных микроорганизмов. Однако спектр таких микроорганизмов может значительно варьироваться при различных питательных средах и условиях инкубации.

В.6 Перечисление (подсчет колоний)

В.6.1 В методике перечисления подсчета колоний, использующей подсчет колоний, должны быть установлены процедуры для решения различных задач, таких как:

a) обнаружение небольших колоний (например, с помощью стереомикроскопа);

b) подсчет и отчетность о необычных колониях (например, ползущий рост);

c) подсчет и отчетность о переполненных чашках [например, затемненные колонии или слишком многочисленное количество для проведения подсчета (TNTC) чашки] и

d) подсчет результатов серийных разведений.

В.6.2 В методике подсчета, использующей подсчет колоний, следует учитывать количество колоний, выросших на чашках. Это число должно быть таким, чтобы каждый жизнеспособный микроорганизм мог выражать себя как видимая колония, не подвергаясь негативному воздействию со стороны других микроорганизмов, граничащих с ними.

В.6.3 Стандартная практика подсчета чашек обычно устанавливает нижний предел для количества колоний на чашке. Этот предел основан на наличии нескольких разведений, из которых можно произвести выборку. Необязательно применять многократные разведения для определения биологической нагрузки для медицинского продукта, в котором биологическая нагрузка низкая.

В.6.4 При подсчете чашек следует оценивать различия в результатах в зависимости от технического персонала. Для примера ссылки на допустимые различия между техническими специалистами — см. «Стандартные методы. 9215 Подсчет гетеротрофных пластин».

В.6.5 Наличие волокон может препятствовать образованию дискретных колоний и тем самым затруднять их подсчет.

В.6.6 Использование слоя агара, вылитого и распределенного на поверхности исследуемой чашки, может показать тот результат испытания, который легче пересчитать после инкубации, если присутствуют ползущие микроорганизмы.

В.6.7 Для автоматизированных методов подсчета валидацию системы следует выполнять в соответствии с ИСО/МЭК 17025.

В.6.8 Если использовано несколько условий испытания (например, подсчет аэробных бактерий с одной чашки и подсчет грибов с другой чашки) и колонии не восстанавливаются, то значения LOD являются кумулятивными. Например, если количество аэробов <2 КОЕ и грибов <2 КОЕ, то общее количество составляет <4 КОЕ.

В.7 Другие методы обнаружения микроорганизмов

Методы, отличные от подсчета колоний, могут быть использованы для определения биологической нагрузки. К ним относят измерения метаболической активности (например, импедиометрия или эпифлуоресценция). Такие методы называются косвенными, потому что для того, чтобы получить значение относительно количества жизнеспособных микроорганизмов, как это было определено ранее, они должны быть откалиброваны по количеству колоний. Альтернативные методы должны обладать достаточной чувствительностью для обнаружения низких уровней микроорганизмов. Как правило, нижний предел обнаруженных чисел превышает 100 КОЕ.

Примечание — Некоторые быстрые микробиологические методы (например, биолюминесценция, ферментативная цитометрия) могут предоставить подробную информацию о диапазоне и относительном количестве микроорганизмов, присутствующих биологической нагрузке, и позволяют оценить возможную изменчивость. Они также могут предоставлять информацию об биологической нагрузке быстрее, чем прямое культивирование.

В.8 Скрининг на высвобождение веществ, влияющих на определение биологической нагрузки

В.8.1 Скрининг направлен на изучение влияния на жизнеспособность потенциально уязвимых микроорганизмов веществ, которые могут выделяться из изделия в суспендирующую жидкость. Этот пример может быть использован для оценки метода в соответствии с 6.1.2.

В.8.2 После отбора изделий каждый из них должен быть подвергнут методике извлечения микроорганизмов, которая в дальнейшем будет использована на регулярной основе. Если при методе извлечения применен элюент, то могут руководствоваться требованиями В.8.3; если изделие вводят непосредственно в среду, то требования В.8.4 могут быть более предпочтительными.

В.8.3 Элюент не должен подавлять рост микроорганизмов, извлеченных из изделия.

В.8.4 Если изделие должно быть введено непосредственно в питательную среду (например, как при оценке НВЧ; см. В.3.3), то можно использовать исследование на пригодность метода, описанного в фармакопеях. В этом исследовании изделие вводят в среду вместе с небольшим количеством микроорганизмов и инкубируют в тех же условиях, что и для обычного определения бионагрузки. Количество используемых микроорганизмов должно быть примерно от 50 до 100 (см. В.8.5 для оценки результатов). Через определенный период среду исследуют на видимый рост.

Если медицинская продукция содержит антимикробное вещество, которое может медленно высвобождаться в среду, то в конце инкубационного периода целесообразно подвергнуть испытанию сочетания промежуточного изделия с низким количеством микроорганизмов.

В.8.5 Если количество инокулированных и восстановленных микроорганизмов существенно различается или рост микроорганизмов в исследовании на пригодность не наблюдается, то методику определения уровня биологической нагрузки следует пересмотреть. Может потребоваться введение стадии разбавления, нейтрализации или фильтрации для уменьшения, инактивации или удаления ингибирующего(их) вещества (веществ).

Если необходимо оценить воздействие элюента, то указанное количество микроорганизмов может быть инокулировано как в элюент, так и в контрольный раствор в течение времени, приблизительно равного используемому для обычной бионагрузки. Выделенные из элюента микроорганизмы подсчитывают в конце этой обработки и сравнивают с подсчетами из контрольного раствора.

В.9 Скрининг на неблагоприятные последствия физической нагрузки

Для удаления микроорганизмов из изделия можно использовать физические процессы (см. В.2.2). Следует принимать во внимание влияние этих процессов на определение биологической нагрузки. Если необходимо оценить воздействие физических процессов, то установленные низкие числа (не более 100 КОЕ) должны подвергаться воздействию тех физических процессов, которые будут использованы при отсутствии устройства. Подсчет микроорганизмов дает меру воздействия физических процессов.

Приложение С
(справочное)

Валидация эффективности восстановления биологической нагрузки

С.1 Общие положения

С.1.1 Процедуры перед валидацией

Перед началом валидации метод восстановления должен быть обоснован и определен для каждого изделия, его частей или группы изделий. Должно быть документальное обоснование для изделия, размера выборки, выбора метода восстановления и т. д.

С.1.2 Классификация с целью повышения эффективности восстановления биологической нагрузки

Изделия или их аналогичные части могут быть классифицированы вместе как группа изделий и как репрезентативный продукт, выбранный для валидации эффективности восстановления биологической нагрузки. Дополнительные критерии для оценки могут включать аналогичные типы сырья, конструкцию и размер, производственные процессы, производственную среду, производственный персонал и местоположение производства. Результаты валидации эффективности восстановления биологической нагрузки затем могут быть применены ко всем продуктам группы для дальнейшего испытания.

С.1.3 Размер выборки

С.1.3.1 Следует выбрать количество продуктов или их частей, для которых должна быть определена эффективность восстановления биологической нагрузки.

С.1.3.2 Общие подходы заключаются в использовании от трех до десяти продуктов для валидационного испытания данного восстановления. Размер выборки должен быть определен в первую очередь той целью, для которой проводят исследование (например, в поддержку обоснования дозы радиационной стерилизации, или чрезмерного цикла стерилизации, или цикла стерилизации, основанного на полной гибели). При рассмотрении результатов оценки эффективности восстановления биологической нагрузки анализ согласованности результатов или их отсутствия может указывать на необходимость применения другого метода экстракции. Кроме того, больший размер выборки может обеспечить более точное определение эффективности восстановления уровня биологической нагрузки.

С.1.4 Руководство по выбору метода повышения эффективности восстановления биологической нагрузки

С.1.4.1 Эффективность восстановления биологической нагрузки достигается с помощью установления корректирующего коэффициента биологической нагрузки, который может быть применен к данной биологической нагрузке для учета микроорганизмов, оставшихся на продукте после метода извлечения и/или необнаруженных используемыми условиями культивирования. Данные биологической нагрузки, которые скорректированы путем включения корректирующего коэффициента, признают более точно представляющими биологическую нагрузку, что является оценкой биологической нагрузки. Исследование эффективности восстановления биологической нагрузки также может быть использовано для сравнения методов тестирования уровня биологической нагрузки.

С.1.4.2 Основным определяющим фактором при выборе метода эффективности восстановления биологической нагрузки (т. е. повторяющейся обработки по сравнению с использованием инокулированного продукта) является естественная биологическая нагрузка продукта. Как правило, метод повторяющейся обработки больше всего подходит для продукта с более высокой биологической нагрузкой, а метод инокулированным продуктом — для продукта с более низкой биологической нагрузкой. Результаты эффективности восстановления биологической нагрузки и соответствующий корректирующий коэффициент биологической нагрузки могут отличаться в зависимости от параметров экстракции биологической нагрузки (например, количество и тип экстракций для повторного восстановления или использование инокулированного продукта по сравнению с повторным восстановлением). Поэтому следует рассмотреть причину сбора данных по биологической нагрузке с целью определения эффективности восстановления биологической нагрузки.

С.1.4.3 В таблице С.1 обобщены типичные характеристики продукта и метода, которые следует учитывать при выборе соответствующего метода эффективности восстановления биологической нагрузки.

Таблица С.1 — Общие представления по выбору метода по повышению эффективности восстановления биологической нагрузки

	Методы восстановления	
	Повторяющееся восстановление	Инокулированный продукт
Принцип	Повторное применение указанной методики на отдельном образце	Инокуляция изделия с заданным уровнем спор *Bacillus* в суспензии. Другие бактерии также могут быть подходящими в зависимости от множества факторов

Окончание таблицы С.1

	Методы восстановления	
	Повторяющееся восстановление	Инокулированный продукт
Характеристики продукта	Продукт с умеренным или высоким содержанием (например, от 100 до 1000 КОЕ) либо высоким содержанием (например, > 1000 КОЕ) биологической нагрузки. Обычно включает в себя следующие типы продукта: - продукты с несколькими материалами или поверхностями; - продукты со склеенными или ткаными матрицами (например, ткани, рулонный материал, пенопласт); - сборные многокомпонентные продукты, совмещенные для использования; - продукты с клеящим веществом/клеем; - устройства животного происхождения, особенно когда их получают из материалов скотобойни	Продукты с низкой (например, < 100 КОЕ) или предельно низкой (например, < 10 КОЕ) биологической нагрузкой. Обычно включает в себя следующие типы продукта: - продукты, которые быстро растворяются или распадаются (например, растворимые материалы); - простые пластиковые изделия (например, литье под давлением с минимальным обращением); - продукты с предельно маленьким количеством компонентов; - продукты с антимикробными свойствами; - продукты, подвергаемые очистке
Отношение к фактической биологической нагрузке	Образцы, представляющие свойства и типы естественной биологической нагрузки	Менее репрезентативные свойства и типы естественной биологической нагрузки. Споры часто легче удалить, чем многие другие бактерии, особенно когда они осаждаются вручную, а не образуют споры в блоке
Соответствие результатов	Менее последовательные результаты ожидаются между реплицируемыми образцами из-за переменной естественной биологической нагрузки	Ожидаются более последовательные результаты между повторяющимися образцами
Приблизительное время испытания	От 3 до 7 дней (в зависимости от естественной биологической нагрузки)	От 2 до 5 дней (в зависимости от используемого микроорганизма)
Сложность испытания	Может быть более трудоемким	Может быть менее трудоемким
Сложности с методом	Стабильность природной биологической нагрузки, противоречивая/переменная биологическая нагрузка	Образование комков при сушке, внедрение, адгезия или неадгезия суспензии

С.1.4.4 Сложные продукты с различными типами компонентов (например, наборы, порошки) могут потребовать более одного типа определения эффективности восстановления биологической нагрузки, если продукты исследуют в отдельных контейнерах и/или различные части изучают с использованием различных методов. Это может потребовать применения более одного корректирующего коэффициента биологической нагрузки для изделий, испытания которых проводят различными методами.

С.1.4.5 Если биологическая нагрузка низкая и требуется больший размер выборки исследуемых продуктов, то испытания нескольких продуктов могут проводить совместно как объединенную выборку. В этой ситуации распределение биологической нагрузки по отдельным продуктам не наблюдается. Если продукты предназначены для регулярного объединения при испытании, то определение эффективности восстановления биологической нагрузки должно быть выполнено аналогичным образом. Например, если пять продуктов будут объединены во время стандартного испытания, то определение эффективности восстановления биологической нагрузки должно быть выполнено с пятью объединенными продуктами.

Результаты испытания эффективности восстановления биологической нагрузки объединенных продуктов могут быть уникальными для количества объединенных продуктов. Если количество объединенных продуктов изменится, то следует рассмотреть новую оценку эффективности восстановления биологической нагрузки.

С.2 Валидация с использованием повторяющегося восстановления

Примечание — Данный метод используют для процесса валидации биологической нагрузки при естественной микробной контаминации продукта. Иногда его называют «избыточное восстановление».

С.2.1 Общие положения

С.2.1.1 Основной принцип этого подхода заключается в том, что метод определения биологической нагрузки следует повторять до тех пор, пока не будет наблюдаться значительное снижение количества выделенных микроорганизмов. После каждого повторения элюент полностью извлекают из продукта или его части и подсчитывают. Затем сравнивают результаты, полученные в ходе последовательных восстановлений. Однако следует отметить, что этот метод не обязательно точен. Точное соотношение между количеством выделенных микроорганизмов и фактическим количеством на продукте не всегда может быть продемонстрировано.

Точное количество повторений будет зависеть от ряда факторов, включая природу продукта, микроорганизмов, входящих в биологическую нагрузку, и исходный уровень контаминации. Для определения количества повторений можно использовать предварительные эксперименты или практический результат испытания аналогичных продуктов.

С.2.1.2 Количество колоний, подсчитанных после первоначального применения метода извлечения, выражается как доля от общего числа колоний от всех повторов (т. е. эффективность восстановления биологической нагрузки).

С.2.1.3 Использование подсчета количества аэробов для повторного восстановления является и остается производственным стандартом. Количество аэробов, как правило, составляет большинство микроорганизмов на медицинском продукте, поэтому оно служит достоверным представлением восстановительных свойств для других типов подсчетов. При проведении повторяющегося испытания по восстановлению анализируют эффективность метода испытания для удаления микроорганизмов на основе того, как они прилипают к продукту, поэтому эта динамика обычно применима ко всем типам микроорганизмов.

С.2.2 Примеры, иллюстрирующие расчет корректирующего коэффициента биологической нагрузки

С.2.2.1 В этом примере набор данных для валидации с помощью повторной обработки показан в таблице С.2, причем данные относятся к десяти повторяющимся медицинским продуктам и включают пять повторностей при повторяющейся обработке испытаний по восстановлению.

С.2.2.2 На основании данных, приведенных в таблице С.2, можно рассчитать количество удаленных, как показано в таблице С.3.

Таблица С.2 — Пример повторяющихся данных по восстановлению

Образец продукта	Обработка/экстракция, КОЕ					Всего 5 процедур, КОЕ	1-е извлечение обработки, %
	1	2	3	4	5		
1	450	200	20	10	< 5	685	65,7
2	200	120	200	130	20	670	29,9
3	90	130	80	20	10	330	27,3
4	1200	550	40	90	60	1940	61,9
5	450	330	20	20	10	830	54,2
6	200	285	190	<5	20	700	28,6
7	930	650	650	40	70	2340	39,7
8	1350	220	280	60	30	1940	69,6
9	120	40	50	< 5	5	220	54,5
10	480	150	240	60	20	950	50,5
Среднее восстановление при первой обработке			48,2 %		CF = 2,07 = 2,1		
Наихудшее значение восстановления			27,3 %		CF = 3,66 = 3,7		

Примечание — Подсчеты, приведенные в колонках обработки 1—5, скорректированы с использованием коэффициента разбавления. Также допустимо использовать нескорректированные подсчеты для расчета эффективности восстановления, и в этом случае нулевое значение будет приемлемым.

Таблица С.3 — Пример повторяющихся данных по восстановлению

Образец продукта	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Количество восстановленных при первой обработке	450	200	90	1200	450	200	930	1350	120	480
Общее количество восстановленных	685	670	330	1940	830	700	2340	1940	220	950
Восстановление при первой обработке	65,7 %	29,9 %	27,3 %	61,9 %	54,2 %	28,6 %	39,7 %	69,6 %	54,5 %	50,5 %
Среднее восстановление при первой обработке	48,2 %				Корректирующий коэффициент (CF) = 2,07 = 2,1					
Наихудшее значение восстановления	27,3 %				Корректирующий коэффициент (CF) = 3,66 = 3,7					

С.2.2.3 Используя среднее восстановление при первой обработке и соответствующее округление, корректирующий коэффициент биологической нагрузки для эффективности восстановления биологической нагрузки вычисляют по формуле

$$\frac{100}{48,2} = 2,07 = 2,1. \quad (С.1)$$

Для некоторых приложений может быть целесообразным использовать наименьшее значение процента восстановления, чтобы показать наихудший вариант. Это решение может зависеть от той цели, для которой будут применены оценки биологической нагрузки. Для данных, представленных в таблице С.2, наихудший корректирующий коэффициент биологической нагрузки, включая соответствующее округление, вычисляют по формуле

$$\frac{100}{27,3} = 3,66 = 3,7. \quad (С.2)$$

С.3 Метод инокуляции продукта

С.3.1 Валидация с использованием инокулированных продуктов

С.3.1.1 Искусственная биологическая нагрузка может быть создана путем инокуляции указанного количества выбранного микроорганизма на продукт, чтобы установить эффективность восстановления биологической нагрузки. Микроорганизмы могут быть вегетативными клетками, но наиболее распространенный метод использует аэробные бактериальные споры. Использование вегетативных микроорганизмов на практике затруднено, так как при сушке может произойти потеря их жизнеспособности.

Микробная инокуляция имеет ограничения, такие как внедрение, адгезия или отсутствие адгезии суспензии, а также слипание и изменение уровня инокулята. Эти ограничения следует учитывать при инокуляции продукта.

С.3.1.2 Следует приготовить суспензию микроорганизмов, которой должен быть инокулирован продукт и в которой определено количество жизнеспособных микроорганизмов.

С.3.1.3 Для установления соответствующего разведения могут потребоваться предварительные эксперименты. Как правило, целесообразно наносить на продукт указанный уровень жизнеспособных микроорганизмов, что приведет к счетному диапазону на этапе подсчета чашек с агаром.

С.3.1.4 Следует выбрать ряд продуктов или их частей, для которых должна быть определена эффективность извлечения биологической нагрузки. Вопрос о необходимости стерильного продукта следует рассматривать в каждом конкретном случае. Каждый продукт инокулируют определенным объемом суспензии микроорганизмов и, если это допустимо для конкретного продукта, подвергают сушке в условиях ламинарного потока воздуха. Жизнеспособное количество микроорганизмов в суспензии определяют во время инокулирования.

Суспензия должна распределяться по продукту таким образом, чтобы в нее входила та часть, с которой труднее всего удалить естественную контаминацию. Различные типы материалов продукта также должны быть рассмотрены для инокуляции.

Инокуляция продукта из абсорбирующих материалов может быть осуществлена путем погружения в суспензию выбранного микроорганизма. Этот метод позволяет получить равномерное распределение микроорганизмов на продукте.

С.3.1.5 Определенный метод для определения биологической нагрузки используют для подсчета количества инокулированных микроорганизмов, которые извлекают из изделия.

С.3.1.6 Количество извлекаемых микроорганизмов выражено в долях от количества инокулированных на продукт. Эта часть может быть рассчитана для каждого продукта и использована для установления эффективности восстановления биологической нагрузки.

С.3.2 Пример для иллюстрации расчета корректирующего коэффициента биологической нагрузки с использованием инокуляции изделия

С.3.2.1 В этом примере набор данных для валидации методом инокулированного восстановления показан в таблице С.4, данные относятся к трем реплицируемым частям продукта.

С.3.2.2 Для валидации выбран метод инокуляции продукта, так как предварительные эксперименты показали, что биологическая нагрузка была предельно низкой.

С.3.2.3 Подготовлена водная суспензия *Bacillus atrophaeus* (ранее — *Bacillus subtilis* var *niger*) и определена жизнеспособность суспензии.

С.3.2.4 Разведение суспензии подготовлено таким образом, чтобы в 0,1 мл аликвоты содержалось в среднем 100 спор. Каждое изделие инокулировали 0,1 мл этой разбавленной суспензии и высушили ламинарным потоком воздуха.

С.3.2.5 Инокулированные изделия подвергнуты выбранной методике удаления, и среднее число удаленных спор составило 76, с диапазоном от 68 до 83.

Таблица С.4 — Образцы данных для валидации методом восстановления с использованием инокулированного продукта

Среднее количество колоний, КОЕ	Образец	Восстановленное количество инокулята, КОЕ	Эффективность восстановления, %
100	1	76	76,0
	2	83	83,0
	3	68	68,0
		Среднее восстановление	75,7

С.3.2.6 Корректирующий коэффициент биологической нагрузки для эффективности восстановления биологической нагрузки, включая соответствующее округление, вычисляют по формуле

$$\frac{100}{75,7} = 1,32 = 1,3. \quad (С.3)$$

В некоторых случаях может быть принято решение использовать наименьшее значение диапазона процентных удалений, чтобы отразить наихудший вариант. Это решение будет зависеть от того, как будут использованы данные. Для приведенных выше данных наихудший корректирующий коэффициент биологической нагрузки, включая соответствующее округление, вычисляют по формуле

$$\frac{100}{68} = 1,47 = 1,5. \quad (С.4)$$

С.3.3 Пример для иллюстрации сравнения двух методов эффективности восстановления уровня биологической нагрузки

С.3.3.1 В этом примере два набора данных для проверки восстановления приведены в таблице С.5. Предприятие установило внутренние критерии приемлемости эффективности восстановления биологической нагрузки, основанные на риске. Эти данные относятся к пяти изделиям, которые испытаны по одной методике (начальное испытание), где среднее восстановление было ниже установленных критериев. Следовательно, к существующей методике добавлен дополнительный шаг для определения того, была ли усовершенствована эффективность восстановления биологической нагрузки (второе исследование).

Таблица С.5 — Сравнение процентной эффективности восстановления уровня биологической нагрузки для двух методов восстановления

Техника	Эффективность восстановления биологической нагрузки, %					Среднее восстановление
	1	2	3	4	5	
Начальное испытание Механическое встряхивание с USP жидкостью D в течение 5 мин	37,3	25,2	50,2	33,7	29,5	35,2
Второе испытание Механическое встряхивание с USP жидкостью D в течение 5 мин + ультразвуковое исследование образца не менее 2 мин	60,2	64,7	72,1	68,2	54,5	63,9

С.3.3.2 После модификации оригинальной методики эффективность восстановления биологической нагрузки действительно повысилась и соответствовала установленным критериям. Назначение данных биологической нагрузки и необходимая точность будут влиять на то, требуются ли более последовательные данные или эффективность восстановления биологической нагрузки должна быть выше, чтобы точнее оценить восстановленную биологическую нагрузку.

С.4 Эффективность восстановления биологической нагрузки для комплексного испытания продукта

С.4.1 В примере, приведенном в таблице С.6, для оценки биологической нагрузки комплексного продукта требуется несколько методов восстановления. Данный пример показывает, как два различных корректирующих коэффициента биологической нагрузки могут быть применены к соответствующим группам данных биологической нагрузки. Чтобы установить биологическую нагрузку этого комплексного изделия, все три оценки биологической нагрузки должны быть суммированы.

С.4.2 При тестировании тканей и биологических изделий дополнительные рекомендации может предоставить AAMI TIR37. Продукты, которые намеренно разрушаются с течением времени (например, лекарственные элюирующие или биопоглощающие продукты), должны учитывать эти изменения при разработке метода тестирования эффективности восстановления биологической нагрузки.

Таблица С.6 — Оценка биологической нагрузки комплексного продукта, определенная с использованием двух корректирующих коэффициентов биологической нагрузки и результата НВЧ

Производительность	Эффективность восстановления биологической нагрузки, %. Часть изделия № 1. Испытана с помощью метода промывки	Эффективность восстановления биологической нагрузки, %. Часть изделия № 2. Испытана с помощью механического встряхивания в течение 5 мин	Эффективность восстановления биологической нагрузки, %. Часть изделия № 3. Испытана с использованием НВЧ порошкового материала
1	49,5	79,3	N/A
2	53,9	89,4	N/A
3	38,4	67,4	N/A
4	64,3	76,0	N/A
5	29,7	69,3	N/A
Средняя эффективность восстановления	47,2	76,3	N/A
Соответствующий корректирующий коэффициент	2,1	1,3	N/A[a]
Практическое применение эффективности восстановления биологической нагрузки и результатов НВЧ комплексного продукта			
Восстановление биологической нагрузки, КОЕ	5	100	80, включая факторы разбавления
Оценка биологической нагрузки, КОЕ	2,1 · 5 = 10,5	1,3 · 100 = 130, 0	80
Общая оценка биологической нагрузки для продукта, КОЕ	10,5 + 130,0 + 80 = 220,5		

[a] Может потребоваться применение коэффициента разбавления.

С.5 Анализ данных и применение корректирующего коэффициента биологической нагрузки

С.5.1 Ввиду изменчивости конструкции, материалов, конфигураций продукта, производственных процессов и т. д. в настоящем стандарте не определена обязательность получения конкретного результата эффективности восстановления биологической нагрузки. Однако, если результаты эффективности восстановления биологической нагрузки падают ниже целевого или обозначенного результата, следует попробовать другой метод (например, добавление другого метода экстракции или удлинение текущего метода экстракции) для определения того, можно ли получить наиболее оптимальные результаты.

Элементы, которые могут быть рассмотрены при определении предполагаемого значения эффективности восстановления биологической нагрузки для медицинского продукта, включают в себя следующее:

a) подход к валидации стерилизации (например, значительное отличие биологической нагрузки на основе);

b) использование данных биологической нагрузки (например, поддержка подхода к валидации стерилизации, отбор сырья, тенденция);

c) тип испытуемого продукта или материала (например, пластмассы и металлы в сравнении с абсорбирующими материалами);

d) надежность используемого метода восстановления (например, ультразвук, встряхивание или сочетание того и другого).

Исходя из этих концепций низкая эффективность восстановления биологической нагрузки (например, 20 % для абсорбента или комплексного продукта) может считаться приемлемой. Рассмотрение вопроса об использовании наименьшего значения процента восстановления для отражения наиболее консервативной оценки наихудшего варианта может быть целесообразным, как описано в С.2.2.3 и С.3.2.6. Кроме того, следует отметить, что иногда определение эффективности восстановления биологической нагрузки не является необходимым (например, при отборе компонентов или сырья или если продукт представляет собой жидкость, в которой фильтруется все содержимое).

В микробиологических методах испытаний ожидается большая изменчивость, чем обычно наблюдается в более предсказуемых физических методах испытаний (например, в химии или физике). Эта большая изменчивость во многом обусловлена тем, что микроорганизмы жизнеспособны и количество микроорганизмов может изменяться с течением времени в зависимости от условий. Другие факторы, которые также влияют на эффективность восстановления биологической нагрузки, могут включать скопление микроорганизмов, консистенцию микроорганизмов, оседающих на поверхности изделия, характеристики поверхности изделия продукта (например, покрытия с определенным силиконовым материалом, высокие пористые поверхности), условия инкубации и/или свойственные ограничения в способности обнаруживать или измерять микроорганизмы.

Тем не менее неожиданно низкая или широко распространенная эффективность восстановления биологической нагрузки может быть неуместной в зависимости от критичности и назначения данных биологической нагрузки, и, если это так, следует исследовать дальнейшее совершенствование метода удаления (например, усиление путем разборки, более интенсивное механическое встряхивание, активное промывание полостей, увеличение времени промывки, модификация элюента). Примером того, когда для определения критичности и назначения данных биологической нагрузки могут потребоваться значительные усилия и ресурсы для получения оптимальных результатов восстановления, является использование данных биологической нагрузки для установления основанного на биологической нагрузке процесса стерилизации (например, радиационной стерилизации и, в частности, методов обоснования дозы, требующих низкой биологической нагрузки). Примером отсутствия необходимости в дополнительных усилиях и ресурсах для получения оптимальных результатов восстановления может служить применение отбора компонентов биологической нагрузки.

С.5.2 При расчете эффективности восстановления биологической нагрузки отсутствует необходимость использовать предел обнаружения (например, значение «меньше») до нулевых значений КОЕ.

С.5.3 При рассмотрении результатов эффективности восстановления биологической нагрузки целесообразно округлить все значения до одной десятичной числа.

С.5.4 Корректирующий коэффициент биологической нагрузки применяют к данным биологической нагрузки путем умножения среднего значения биологической нагрузки на корректирующий коэффициент. Когда применен корректирующий коэффициент биологической нагрузки, полученное значение называется оценкой биологической нагрузки. В некоторых случаях может быть принято решение о применении наименьшего значения эффективности восстановления биологической нагрузки исходя из полученного диапазона для определения корректирующего коэффициента биологической нагрузки, отражающего наихудший случай. Это решение будет зависеть от того, как будут использованы данные.

Приложение D
(справочное)

Типичное распределение обязанностей

Изготовитель и лаборатория должны иметь соглашение, в соответствии с которым распределены обязанности (см. 4.2.2) по выполнению требований, определенных в настоящем стандарте. В конечном счете изготовитель несет ответственность за то, чтобы эти требования были выполнены. В настоящем приложении приведена информация о типичных заданиях. Требования, приведенные в таблице D.1, являются сокращенными. Подробно сведения о каждом требовании изложены в конкретном пункте.

Таблица D.1 — Типичное распределение обязанностей

Пункт	Требования настоящего стандарта	Стандартная ответственность	
		Изготовитель	Лаборатория
Элементы системы менеджмента качества			
4.1.1	Спецификация процедур	R	R
4.1.2	Рассмотрение и утверждение стандартов и записей	R	R
4.1.2	Контроль документов и записей	R	R
4.1.3	Содержание записей	N/A	R
4.1.3	Личность персонала	N/A	R
4.1.4	Проверка расчетов и передачи данных	N/A	R
4.2.1	Внедрение и выполнение процедур	N/A	R
4.2.2	Распределение обязанностей	R	R
4.2.3	Наличие оборудования	N/A	R
4.3.1	Процедуры закупки	N/A	R
4.3.2	Калибровка оборудования	N/A	R
4.3.3	Подготовка и стерилизация материалов	N/A	R
4.4.1	Измерения изменчивости	N/A	N/A
4.4.2	Исследование результатов, корректирующие и предупреждающие действия	R	I
Выбор продукта			
5.1.1	Отбор и выборка проб изделий	R	I
5.1.2	Обоснование семейства изделий	R	I
5.1.3	Сроки выполнения отбора проб	R	I
5.2	Часть продукта для испытания (ЧПИ)	R	I
Методы определения и микробиологической характеристики биологической нагрузки			
6.1.1	Выбор метода	R	R
6.1.2	Минимизация ингибирующих эффектов	I	R
6.1.3	Эффективность извлечения биологической нагрузки	I	R
6.1.4	Выбор условий культивирования	I	R

Ключевые значения:
R — ответственность;
I — может включать исполнение или предоставление информации;
N/A — обычно не применяется.

Окончание таблицы D.1

Пункт	Требования настоящего стандарта	Стандартная ответственность	
		Изготовитель	Лаборатория
Примечание — Общие возможности метода испытаний показаны и документированы как часть фундаментальной валидации метода в лаборатории. Специфичные для изделия аспекты валидации документируются как часть специфичной для изделия отчетности.			
6.1.5	Выбор методов подсчета	N/A	R
6.2.1	Выбор методов микробиологической характеристики	R	R
Валидация метода определения биологической нагрузки			
7.2a)	Пригодность метода испытаний	R	R
7.2b)	Техника удаления	R	R
7.2c)	Соответствие для подсчета	N/A	R
7.2d)	Микробиологическая характеристика	N/A	R
Стандартное определение биологической нагрузки и интерпретация данных			
8.1	План отбора проб	R	I
8.2	Выбор методов испытаний	R	R
8.3	Степень микробиологической характеристики	R	I
8.4	Рассмотрение применимых стандартов и требований	R	I
8.5	Обработка скачков (пиков) роста	R	I
8.6	Спецификация допустимых уровней	R	N/A
8.7	Тенденция	R	N/A
8.8	Применение статистических методов	R	N/A
Содержание метода определения биологической нагрузки			
9.1	Рассмотрение изменений в производстве/технологическом процессе	R	I
9.2	Изменение методов испытаний	I	R
9.3	Обзор данных валидации метода	R	R
Ключевые значения: R — ответственность; I — может включать предоставление помощи или информации; N/A — обычно не применяется. Примечание — Общие возможности метода испытаний показаны и документированы как часть фундаментальной валидации метода в лаборатории. Специфичные для изделия аспекты валидации документируются как часть специфичной для изделия отчетности.			

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным и межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального и межгосударственного стандарта
ISO 10012	IDT	ГОСТ Р ИСО 10012—2008 «Менеджмент организации. Системы менеджмента измерений. Требования к процессам измерений и измерительному оборудованию»
ISO 13485	IDT	ГОСТ ISO 13485—2017 «Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования»
ISO 15189	IDT	ГОСТ Р ИСО 15189—2015 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности»
ISO/IEC 17025	IDT	ГОСТ ISO/IEC 17025—2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты.

Библиография

[1] ISO 7870-2 Control charts — Part 2: Shewhart control charts

[2] ISO 7870-4 Control charts — Part 4: Cumulative sum charts

[3] ISO 9000:2015 Quality management systems — Fundamentals and vocabulary

[4] ISO 9001 Quality management systems — Requirements

[5] ISO 11135 Sterilization of health care products — Ethylene oxide — Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices

[6] ISO 11137 Sterilization of health care products — Radiation

[7] ISO 11138-2 Sterilization of health care products — Biological indicators — Part 2: Biological indicators for ethylene oxide sterilization processes

[8] ISO 11139:2018 Sterilization of health care products — Vocabulary

[9] ISO 11737-2 Sterilization of medical devices — Microbiological methods — Part 2: Tests of sterility performed in the definition, validation and maintenance of a sterilization process

[10] ISO 13022 Medical products containing viable human cells — Application of risk management and requirements for processing practices

[11] ISO 14160 Sterilization of health care products — Liquid chemical sterilizing agents for single-use medical devices utilizing animal tissues and their derivatives. Requirements for characterization, development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices

[12] ISO 14937 Sterilization of health care product — General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices

[13] ISO 17665 (все части) Sterilization of health care products — Moist heat

[14] ISO 20857 Sterilization of health care products — Dry heat — Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices

[15] ISO 22442-3 Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives — Part 3: Validation of the elimination and/or inactivation of viruses and transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents

[16] ISO/IEC 90003 Software engineering — Guidelines for the application of ISO 9001:2008 to computer software

[17] AAMI TIR37 Sterilization of health care products — Radiation — Guidance on sterilization of biologics and tissue-based products

[18] ASTM D4855-97 Standard practice for comparing test methods

[19] ICH Q5A(R1), *Viral Safety Evaluation Of Biotechnology Products Derived From Cell Lines Of Human Or Animal Origin*

[20] Bailey, M. Notes on bioburden distribution metrics: The log-normal distribution. Panel on Gamma and Electron Beam. March 2010

[21] Polansky, J.R. A Model system for testing raw materials for microbial content. Pharm. Technol. 1980, 4(2), 49—51

[22] Bryans, T., Hansen, J. The Bioburden Estimate: Not Just Math, But Microbiology. AAMI Industrial Sterilization Research from the Field. 2013

[23] Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent and Procedure, Budapest 28th April, 1977, amended 26th September, 1980

[24] Bushar, H.F., Kowalski, J.B., Mosley, G. Estimation of average bioburden values for low-bioburden products, MD+DI. July 2011, 33(7)

[25] Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M. Collins and Lyne's Microbiological Methods. 7th Edition. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford. 1995

[26] DeMan, J.C. M.P.N. Tables Corrected. European J. Appl. Microbiol. 1983, 17, 301—305

[27] Bacteriological Analytical Manual, Annex 2, October 2010

[28] Halls, NA. et al. The Occurrence of Atypically High Presterilization Microbial Counts («Spikes») on Hypodermic Products. Radiat. Phys. Chem. 1983, 22(3—5), 663—666

[29] Hitchens, A.D., Mishra-Szymanski, A. AOAC International Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation. Journal of AOAC International. 1999, 82(2), 402—415

[30] International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology (CPMP/ICH/381/95)

[31] International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Methods: Methodology (CPMP/ICH/281/95)

[32] Lundholm, M. Comparison of Methods of Quantitative Determinations of Airborne bacteria and evaluation of total viable counts. Appl. Environ. Microbiol. 1982, 44(1), 179—183

[33] PDA Bioburden Recovery Validation Task Force. Technical Report: Bioburden Recovery Validation. Journal of Parenteral Science & Technology. 1990, 44(6), 324—331

[34] PDA Technical Report No 33. Evaluation, Validation and Implementation of Alternate and Rapid Microbiological Testing Methods. 2013

[35] European Pharmacopoeia, Chapter 5.1.6 Alternative Methods for Control of Microbiological Quality. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 2015, 27.1:8

[36] Puleo, J.R., Favero, M.S., Peterson, J.J. Use of ultrasonic energy in assessing microbial contamination on surfaces. Appl. Microbiol. 1967, 15(6), 1345—51

[37] Rice, E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D., Clesceri, L.S. (Eds). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012

[38] Shirtz, J.T. Sterility Testing. Pharmaceutical Engineering. November/December 1987, 35—37

[39] Sokolski, W.T., Chidester, C.G. Improved Viable Counting Method for Petroleum-Based Ointments. J. Pharm. Sci. 1964, 53, 103—107

[40] US Pharmacopoeia, USP 40/NF 35 2017, <1223> Validation of Alternative Microbiological methods, United States Pharmacopeial Convention Inc.: Rockville, MD. 2017

[41] US Pharmacopoeia, USP 40/NF 35 2017, <1225> Validation of Compendial Procedures and <1226> Verification of Compendial Procedures. United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD. 2017

[42] US Pharmacopoeia, USP 40/NF 35 2017, <1225> Validation of Compendial Procedures and <1226> Verification of Compendial Procedures. United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD. 2017

[43] Cochran W. Estimation of Bacterial Densities by Means of the Most Probable Number, *Biometrics*. 6:105-116, 1950 (Изменение № 1, 2021)

УДК 637.133.4:006.354

ОКС 11. 080.01
07.100.10

Ключевые слова: стерилизация медицинской продукции, микробиологические методы, определение популяции микроорганизмов на продукте, валидация, процесс стерилизации, микробиологические испытания

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 11.11.2022. Подписано в печать 17.11.2022. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 5,12. Уч.-изд. л. 4,10.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «РСТ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru