МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 28085— 2013

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Метод бактериологического контроля стерильности

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 – 92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 марта 2013 г. № 55-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 июня 2013 г. № 319-ст введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2014 года.

5 ВЗАМЕН ГОСТ 28085–89

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «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

© Стандартинформ, 2014

В Российской Федерации 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

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Метод бактериологического контроля стерильности

Medicine remedies biological for veterinary use.
Method of bacteriological control of sterility

Дата введения – 2014 – 07 – 01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на биологические лекарственные средства для ветеринарного применения (далее – лекарственные средства), содержащие инактивированные микроорганизмы, и устанавливает метод бактериологического контроля стерильности.

Для лекарственных средств, содержащих живые микроорганизмы, настоящий стандарт применяют для определения контаминации посторонними бактериями, грибами и микоплазмами.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартной безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартной безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 83–79 Натрий углекислый. Технические условия

ГОСТ 177–88 Водорода перекись техническая. Технические условия

ГОСТ 2263–79 Натр едкий технический. Технические условия

ГОСТ 2493–75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3164–78 Масло вазелиновое медицинское. Технические условия

ГОСТ 3760–79 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

ГОСТ 4159–79 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4209–77 Реактивы. Магний хлористый 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4232–74 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233–77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4234–77 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4523–77 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 6038–79 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ ISO 7218–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ 9871–75 Термометры стеклянные ртутные электроконтактные и терморегуляторы. Технические условия

ГОСТ ISO 11133-1–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культуральных сред в лаборатории

ГОСТ ISO 11133-2–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям культуральных сред.

Издание официальное

ГОСТ 11773–76 Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный. Технические условия

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13805–76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 17206–96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 18300–87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 20730–75 Питательные среды. Бульон мясопептонный (для ветеринарных целей). Технические условия

ГОСТ 24104– 2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

ГОСТ 25336–82 Е Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29112–91 Среды питательные плотные (для ветеринарных целей). Общие технические условия

ГОСТ 29230–91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1V. Пипетки выдувные

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Условия выполнения испытаний и требования безопасности

3.1 Условия выполнения испытаний

3.1.1 Общие требования проведения микробиологического анализа и работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности – по ГОСТ ISO 7218.

3.1.2 Испытание на стерильность проводят в асептических условиях, чтобы избежать микробной контаминации во время посева, используя ламинар-бокс, бокс или чистое помещение класса «В».

3.1.3 Требования к персоналу – по ГОСТ ISO 7218 и [1].

К проведению испытаний допускаются квалифицированные сотрудники, имеющие опыт работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности, изучившие методики микробиологических работ.

3.2 Требования безопасности

3.2.1 Требования безопасности при работе с химическими реактивами – по ГОСТ 12.1.007, с электрооборудованием – по ГОСТ 12.1.019. Требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.004.

3.2.2 При нарушении целостности ампул (флаконов) и загрязнении препаратом поверхности стола, на котором проводят испытание, необходимо провести обработку загрязненной поверхности 70 %-ным раствором этилового спирта по ГОСТ 18300, раствором хлорамина Б содержанием активного хлора АХ не менее 26 %, 6 %-ным раствором перекиси водорода по ГОСТ 177 или другими дезинфицирующими средствами, обеспечивающими уничтожение микроорганизмов III – IV групп патогенности.

4 Сущность метода

Сущность метода бактериологического контроля стерильности и определения контаминации заключается в микробиологической оценке наличия бактерий, грибов и микоплазм в высевах лекарственных средств на питательные среды.

5 Средства измерений, аппаратура, материалы, реактивы и культуральные среды

5.1 Для проведения испытания применяют:

- весы со значением среднего квадратического отклонения (СКО), не превышающим 0,03 мг и с погрешностью от нелинейности не более ± 0,06 мг по документации изготовителя или весы лабораторные по ГОСТ 24104;

- шкаф сушильный лабораторный с диапазоном автоматически поддерживаемой температуры нагрева от 50 °С до 200 °С; погрешность стабилизации температуры в рабочей камере при установившемся режиме ± 3 °С;
- термометры ртутные стеклянные электроконтактные с диапазоном измерения температуры от 50 °С до 200 °С и ценой деления 1 °С по ГОСТ 9871;
- термометры максимальные типа СП-83 М с диапазоном измерения температуры от 50 °С до 250 °С и ценой деления 1 °С;
- шкаф ламинарный II класса биологической опасности;
- термостат электрический с автоматическим терморегулятором, обеспечивающий поддержание температуры нагрева от 20 °С до 55 °С по ГОСТ ISO 7218;
- pH-метр с точностью калибровки ± 0,1 ед. pH при температуре от 20 °С до 25 °С по ГОСТ ISO 7218;
- дистиллятор;
- штативы для пробирок металлические или из полимерных материалов;
- холодильник бытовой по ГОСТ ISO 7218;
- пипетки мерные вместимостью 1 и 2 $см^3$ по ГОСТ 29230;
- флаконы стеклянные вместимостью 100 и 200 $см^3$;
- пробирки стеклянные по ГОСТ 25336;
- воронки стеклянные по ГОСТ 25336;
- груши резиновые;
- фильтры для мембранной фильтрации;
- аппарат Кротова;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- воду водопроводную;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- натрий углекислый по ГОСТ 83;
- натрия гидроокись по ГОСТ 2263;
- натрия тиогликолят;
- натрия резазурин;
- натрия гидрофосфат по ГОСТ 11773;
- калий хлористый по ГОСТ 4234;
- калия дигидрофосфат по ГОСТ 2493;
- магний сернокислый по ГОСТ 4523;
- магний хлористый по ГОСТ 4209;
- кальция хлорид безводный;
- калий йодистый по ГОСТ 4232;
- аммиак водный по ГОСТ 3760, раствор массовой долей 10 %;
- кислоту соляную по ГОСТ 3118, раствор массовой долей 1 % – 2 %;
- кислоту тиогликолевую;
- водорода перекись по ГОСТ 177, раствор массовой долей 3 % и 6 %;
- йод кристаллический по ГОСТ 4159;
- D-глюкозу по ГОСТ 6038;
- глюкозы моногидрат;
- масло вазелиновое по ГОСТ 3164;
- хлорамин, раствор массовой долей 26 %;
- фенол, раствор массовой долей 3 %;
- известь хлорную массовой долей активного хлора не менее 32 %;
- соду кальцинированную;
- порошок стиральный;
- фуксин основной;
- среду тиогликолевую;
- агар мясо-пептонный массовой долей глюкозы 0,5 % (МПА) по ГОСТ 29112;
- бульон мясо-пептонный массовой долей глюкозы 0,5 % (МПБ) по ГОСТ 20730;
- бульон мясо-пептонный печеночный под вазелиновым маслом массовой долей глюкозы 0,5 %, агара 0,2 % (среда Китт-Тароцци);
- среду Сабуро;
- среды для обнаружения микоплазм:
  среду Хейфлика;
  среду Фрея;

среду Фриса;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206;
- пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805;
- казеина гидролизат панкреатический или пептон Мартена;
- экстракт дрожжевой;
- раствор цистеина гидрохлорида концентрацией 10 г/дм^3;
- кислоту дезоксирибонуклеиновую, стерильный раствор концентрацией 2 г/дм^3;
- пенициллин концентрацией 20000 МЕ/см^3;
- раствор β-Никотинамидадениндинуклеотда концентрацией 10 г/см^3;
-0,9 %-ный раствор натрия хлорида изотонический;
- *DEAE* – декстран;
- сердце говяжье;
- экстракт мозга теленка;
- сыворотку лошадиную стерильную;
- сыворотку свиную;
- муки соевой гидролизат;
- биотин;
- кальция пантотенат;
- холина хлорид;
- кислоту фолиевую;
- i-Инозит;
- никотинамид;
- пиридоксина гидрохлорид;
- рибофлавин;
- тиамина гидрохлорид.

5.2 Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не ниже указанных.

5.3 Допускается использование готовых и сухих питательных сред, предназначенных для указанных целей, а также сред, приготовленных по прописи производителя.

5.4 Вместо оборудования и материалов многократного использования (чашек Петри, пипеток, пробирок, флаконов, бутылок) может использоваться одноразовое оборудование и материалы, если они аналогичны по техническим характеристикам, подходят для использования в микробиологии и не содержат веществ, подавляющих рост микроорганизмов.

6 Отбор и подготовка проб для испытания

6.1 Для испытания отбирают пробы лекарственного средства в количестве, указанном в таблице 1, если нет других указаний в нормативном документе на конкретное лекарственное средство.

Таблица 1 – Количество образцов (ампул, флаконов) для проведения анализа от серии исследуемого лекарственного средства

Количество единиц в серии	Количество единиц для проведения анализа, не менее
Не более 100	10 % или 4 шт. (берут наибольшее)
От 100 до 500	10 шт.
Более 500	2 % или 20 шт. (берут наименьшее)

При вскрытии пробы не допускают его контаминацию микроорганизмами, которые могут находиться на его внешней поверхности. Ампулы и пробки флаконов протирают 70 %-ным ректификованным этиловым спиртом и фламбируют.

6.2 Пробы сухих лекарственных средств предварительно разводят стерильным растворителем (0,9 %-ным изотоническим раствором хлорида натрия или дистиллированной водой, если не указано другого в нормативном документе на конкретное лекарственное средство) до первоначального объема, указанного на этикетке.

6.3 Высев жидких лекарственных средств проводят непосредственно из каждого флакона или ампулы.

6.4 Для посева на каждую питательную среду используют количество исследуемой пробы, приведенное в таблице 2, если нет других указаний в нормативном документе на конкретное лекарственное средство.

Таблица 2 – Минимальное количество пробы для посева на питательные среды

Количество лекарственного средства в упаковке, $см^3$	Количество пробы для посева, $см^3$
Менее 1	Весь объем
1 – 4	½ содержимого, но не менее 1
5 – 19	2
20 – 100	2 – 4
Более 100	10

Примечание – Объем питательной среды для посева должен в 10 раз превышать объем пробы.

7 Подготовка к испытанию

7.1 Подготовка лабораторной посуды

7.1.1 Новую стеклянную лабораторную посуду кипятят в течение 15 мин в дистиллированной воде, подкисленной раствором соляной кислоты, затем промывают водопроводной водой и моют ершом в мыльно-содовом растворе по 7.3.2. После этого посуду тщательно промывают сначала водопроводной водой, а затем три раза дистиллированной водой, высушивают и стерилизуют.

7.1.2 Стерилизуют посуду в автоклаве при 0,15 МПа в течение 60 мин или сушильном шкафу при температуре (170 ± 5) °С в течение 120 мин.

7.2 Подготовка бокса

7.2.1 Ежедневно бокс и предбоксник подвергают тщательной уборке и дезинфекции 3 %-ным раствором перекиси водорода или другими средствами аналогичного действия с соблюдением требований техники безопасности.

Норма расхода дезинфицирующего раствора 7 – 100 $см^3/м^2$ при влажной уборке. Раствор готовят непосредственно перед применением.

7.2.2 Допускается дезинфицировать бокс горячим мыльно-содовым раствором температурой 50 °С — 60 °С по 7.6.2 или антисептолом по 7.3.1. В каждом боксе должны быть установлены бактерицидные лампы из расчета 2,0 – 2,5 Вт на 1 $м^3$. Лампы размещают на потолке и на стенах. Бокс облучают до начала проведения испытания в течение 1,5 – 2,0 ч. Во время проведения испытания лампы должны быть выключены.

7.2.3 Чистоту воздуха в боксе проверяют один раз в неделю, используя аппараты, предназначенные для этих целей (аппарат Кротова и др.) или методом экспозиции чашек Петри с твердыми питательными средами (МПА, МПБ, среда Сабуро) с последующим культивированием в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч и определением количества выросших колоний и видовой принадлежности микроорганизмов (седиментационный метод).

7.2.4 Допускается применять другие методы проверки обсемененности воздуха микроорганизмами, например аспирационный метод, представляющий собой исследование проб воздуха объемом до 100 $м^3$ посредством просасывания воздуха через фильтры с последующим выделением и высевом микроорганизмов по 7.2.3.

7.2.5 Допускается наличие не более трех колоний на чашке Петри при исследовании седиментационным методом и не более 500 КОЕ/$м^3$ при исследовании аспирационным методом. При превышении указанных значений обсемененности воздуха в боксе работу прекращают и проводят комплекс санитарно-гигиенических мероприятий с последующим контролем микробной обсемененности воздуха.

7.3 Приготовление антисептических растворов

7.3.1 Приготовление раствора антисептола

Для приготовления раствора антисептола берут раствор хлорной извести массовой долей 50 % и раствор кальцинированной соды массовой долей 5 %, сливают в равных объемах и перед применением разбавляют водопроводной водой в соотношении 1:50.

7.3.2 Приготовление мыльно-содового раствора

Для приготовления мыльно-содового раствора берут 10 г соды, 10 г стирального порошка и 5 $см^3$ нашатырного спирта, растворяют в 1 $дм^3$ водопроводной воды.

7.4 Общие требования, предъявляемые к приготовлению и хранению питательных сред

7.4.1 Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления, а также испытанию микробиологических критериев качества, ростовых и селективных свойств питательных сред – по ГОСТ ISO 11133-1 и ГОСТ ISO 11133-2.

7.4.2 Готовить питательные среды следует строго придерживаясь приведенной рецептуры, а сухие питательные среды – согласно инструкции по применению организации-производителя. Необходимый pH питательных сред устанавливают при температуре (25 ± 2) °С. Среды стерилизуют в автоклаве в течение 15 мин при температуре 121 °С, если нет других указаний в нормативном документе на конкретное лекарственное средство.

7.4.3 После стерилизации не менее 5 % пробирок или чашек от каждой партии питательной среды помещают в термостат и инкубируют в течение 14 сут, параллельно с посевом на стерильность.

7.5 Приготовление питательных сред

7.5.1 Приготовление смеси витаминов

Для приготовления смеси витаминов берут 100 мг биотина, 100 мг пантотената кальция, 100 мг хлорида холина, 100 мг фолиевой кислоты, 200 мг i-Инозита, 100 мг никотинамида, 100 мг гидрохлорида пиридоксина, 10 мг рибофлавина, 100 мг гидрохлорида тиамина, смешивают в стерильных условиях и доводят объем раствора стерильной дистиллированной водой до 1000 см^3. Готовую смесь стерилизуют автоклавированием в течение 10 – 15 мин при 110 °С. Используется как компонент при приготовлении среды Фрея.

Срок хранения смеси витаминов в защищенном от света месте при комнатной температуре – не более 1 мес.

7.5.2 Приготовление бульона экстракта говяжьего сердца

Для приготовления бульона экстракта говяжьего сердца смешивают 500 г говяжьего сердца, 10 г ферментативного пептона, 5 г хлорида натрия, доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 см^3, стерилизуют автоклавированием в течение 15 мин при температуре 121 °С и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Используется как компонент для приготовления среды Хейфлика.

7.5.3 Приготовление сбалансированного солевого раствора Хэнкса (модифицированного)

Для приготовления сбалансированного модифицированного солевого раствора Хэнкса берут 6,4 г хлорида натрия, 0,32 г хлорида калия, 0,08 г сульфата магния, 0,08 г хлорида магния, 0,112 г безводного хлорида кальция, 0,0596 г гидрофосфат дигидрата натрия, 0,0048 г безводного дигидрофосфата калия и доводят объем раствора дистиллированной водой до 800 см^3.

Стерилизуют методом мембранной фильтрации, изложенным в разделе 9.

Используется как компонент для приготовления среды Фриса.

7.5.4 Приготовление бульона из экстракта сердца и мозгов

Для приготовления бульона из экстракта сердца и мозгов берут 200 г экстракта мозга теленка, 250 г экстракта говяжьего сердца, 10 г ферментативного пептона, 2 г моногидрата глюкозы, 5 г хлорида натрия, 2,5 г безводного гидрофосфата натрия и доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 см^3. Стерилизуют автоклавированием в течение 15 мин при температуре 121 °С и фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

Используется для приготовления среды Фриса.

7.5.5 Приготовление бульона *PPLO*

Для приготовления бульона *PPLO* берут 50 г экстракта говяжьего сердца, 10 г ферментативного пептона, 5 г хлорида натрия и доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 см^3. Стерилизуют автоклавированием в течение 15 мин при температуре 121 °С и фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

Используется для приготовления среды Фриса.

7.5.6 Приготовление жидкой тиогликолевой среды

Для приготовления жидкой тиогликолевой среды берут 0,50 – 0,75 г *L*-цистеина, 0,75 г гранулированного агара массовой долей влаги не более 15 %, 2,5 г хлорида натрия, 5,0 г моногидрата глюкозы, 5,0 г водорастворимого дрожжевого экстракта, 15,0 г панкреатического гидролизата казеина, тиогликолевой кислоты, 0,3 см^3 или тиогликолята натрия, 0,5 – 0,75 см^3, доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 см^3 и нагревают до полного растворения. Затем добавляют 1,0 см^3 свежеприготовленного раствора резазурина натрия (1 : 1000), перемешивают и разливают в пробирки соответствующего объема. Среду автоклавируют при температуре 121 °С в течение 15 мин, pH среды после стерилизации (7,0 ± 0,2).

7.5.7 Приготовление жидкой соево-казеиновой среды

Для приготовления жидкой соево-казеиновой среды берут 17,0 г панкреатического гидролизата казеина, 3,0 г гидролизата соевой муки, 5,0 г хлорида натрия, 2,5 г хлорида калия, 2,5 г калия фосфата двузамещенного, 2,5 г глюкозы, доводят объем раствора дистиллированной водой до

1000 $см^3$ и нагревают до полного растворения. Охлаждают до комнатной температуры. Если требуется, добавляют 1 моль/$дм^3$ раствор едкого натра, чтобы pH после стерилизации был 7,3 ± 0,2. Фильтруют для получения прозрачной среды, разливают по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Для получения агаризованной питательной среды к приготовленной жидкой соево-казеиновой среде добавляют 10 – 20 г агара.

7.5.8 Приготовление жидкой среды Сабуро

Для приготовления жидкой среды Сабуро в 1000 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 10 г сухого ферментативного пептона, кипятят в течение 10 мин, фильтруют, прибавляют 40 г глюкозы, устанавливают соляной кислотой массовой долей 1 % – 2 % pH (5,6 ± 0,2), разливают в стерильные пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Для получения агаризованной питательной среды к приготовленной жидкой среде Сабуро добавляют 10 – 20 г агара.

7.5.9 Приготовление среды Хейфлика

7.5.9.1 Для приготовления жидкой среды Хейфлика готовят основу среды: берут 90,0 $см^3$ бульона из экстракта говяжьего сердца, 10,0 $см^3$ дрожжевого экстракта концентрацией 250 г/$дм^3$, 5,0 $см^3$ раствора фенолового красного концентрацией 0,6 г/$дм^3$, доводят до кипения и кипятят в течение 10 мин. Среду стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

7.5.9.2 Затем основу среды охлаждают до температуры 40 ° С – 45 °С и добавляют 20,0 $см^3$ стерильной лошадиной сыворотки, не подвергнутой нагреву и проверенной на контаминацию микоплазмами, 1,20 $см^3$ стерильного раствора дезоксирибонуклеиновой кислоты концентрацией 2 г/$дм^3$ и 0,25 $см^3$ пенициллина с содержанием пенициллина 20000 МЕ/$см^3$. Значение pH доводят до 7,8 раствором едкого натра массовой концентрацией 10 %. Среду не стерилизуют.

7.5.9.3 Для приготовления твердой среды к основе жидкой среды Хейфлика по 7.5.9.1 добавляют агар в концентрации 15 г/$дм^3$, стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин, охлаждают до температуры 40 ° С – 45 °С, а затем добавляют компоненты по 7.5.9.2.

7.5.10 Приготовление среды Фрея

Среда рекомендуется для обнаружения Mycoplasma Synovviae.

Для приготовления жидкой среды Фрея смешивают 90,0 $см^3$ бульона из экстракта говяжьего сердца, 2,0 $см^3$ раствора моногидрата глюкозы концентрацией 500 г/$дм^3$, 12,0 $см^3$ свиной сыворотки, инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, 5,0 $см^3$ раствора фенолового красного концентрацией 0,6 г/$дм^3$, Стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин, охлаждают до температуры 40 ° С – 45 °С, а затем добавляют 0,25 $см^3$ пенициллина (20000 МЕ/$см^3$), 0,025 $см^3$ смеси витаминов по 7.5.1, 1,0 $см^3$ раствора β-Никотинамидадениндинуклеотда концентрацией 10 г/$см^3$ и 1,0 $см^3$ раствора цистеина гидрохлорида концентрацией 10 г/$дм^3$. Значение pH среды доводят до 7,8 добавлением раствора едкого натра массовой концентрацией 10 %.

Для приготовления твердой среды Фрея смешивают 90,0 $см^3$ бульона из экстракта говяжьего сердца, 2,0 $см^3$ раствора моногидрата глюкозы концентрацией 500 г/$дм^3$, 12,0 $см^3$ свиной сыворотки, инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, 5,0 $см^3$ раствора фенолового красного концентрацией 0,6 г/$дм^3$, 1,4 г очищенного агара, значение pH доводят до 7,8, стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин, затем охлаждают до температуры 40 ° С – 45 °С и добавляют 0,25 $см^3$ пенициллина (20000 МЕ/$см^3$), 0,025 $см^3$ смеси витаминов, 1,0 $см^3$ раствора β-Никотинамидадениндинуклеотда концентрацией 10 г/$см^3$ и 1,0 $см^3$ раствора цистеина гидрохлорида концентрацией 10 г/$дм^3$.

7.5.11 Приготовление среды Фриса

Среда рекомендуется для обнаружения микоплазм, кроме птичьих.

Для приготовления жидкой среды Фриса берут 800 $см^3$ сбалансированного модифицированного солевого раствора Хенкса, 67 $см^3$ дистиллированной воды, 135 $см^3$ экстракта из сердца и мозгов, 248 $см^3$ бульона *PPLO*, 60 $см^3$ дрожжевого экстракта концентрацией 170 г/$дм^3$, 250 мг бацитрацина, 250 мг метициллина, 4,5 $см^3$ фенолового красного концентрацией 5 г/$дм^3$. Среду стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин, затем охлаждают до температуры 40 ° С – 45 °С, значение pH доводят до 7,40 – 7,45 и добавляют стерильно 165 $см^3$ лошадиной сыворотки, 165 $см^3$ свиной сыворотки, проверенных на контаминацию микоплазмами.

Для приготовления твердой среды Фриса смешивают 800 $см^3$ сбалансированного модифицированного солевого раствора Хенкса, 200 мг *DEAE* – декстрана и 15,65 мг очищенного агара. Полученную смесь стерилизуют автоклавированием в течение 15 мин при температуре 121 °С и добавляют к 1740 $см^3$ жидкой среды Фриса.

7.6 Условия хранения питательных сред

7.6.1 Сроки и условия хранения культуральных сред – по ГОСТ ISO 11133-1.

7.6.2 Жидкие питательные среды промышленного производства, готовые к употреблению, хранят в плотно укупоренных сосудах при условии сохранения их стерильности и ростовых свойств в течение срока годности, указанного производителем.

7.6.3 Сухие питательные среды промышленного производства хранят в сухом, защищенном от света месте в соответствии с инструкцией производителя. После вскрытия упаковки необходимо написать дату вскрытия и далее хранить при комнатной температуре до окончания срока годности. По истечении срока годности, указанного производителем, среды уничтожают.

7.6.4 Приготовленные из сухих смесей и разлитые во флаконы питательные среды хранят в течение 1 мес при комнатной температуре или 3 мес при температуре от 2 °С до 8 °С. Срок годности питательных сред, разлитых в чашки Петри, составляет 7 сут при температуре 2 °С до 8 °С.

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

7.7 Определение ростовых свойств питательных сред

7.7.1 Определение ростовых свойств проводят для каждой партии коммерческой среды (сухой и готовой к использованию), а также для каждой партии среды, изготовленной в лаборатории.

7.7.2 При испытании ростовых свойств питательных сред, используемых для определения бактерий и грибов, в две пробирки со средой вносят культуру тест-штамма, каждого отдельно, согласно таблице 3 в количестве 10 – 100 КОЕ.

Таблица 3 – Тест-микроорганизмы для проверки ростовых свойств питательных сред, используемых для определения бактерий, грибов и микоплазм

Питательные среды	Тест-культуры микроорганизмов		Условия инкубации	
	Вид	Штамм	Температура, °С	Срок инкубации, сут
Жидкая тиогликолевая среда	Аэробные бактерии: Bacillus subtilis ATCC Staphylcoccus aureus ATCC Pseudomonas aeruginosa ATCC	 6633 6538-P 9027	32,5 ± 2,5	3
	Анаэробные бактерии: Clostridium sporogenes ГИСК	 272	32,5 ± 2,5	3
Жидкая соево-казеиновая среда Среда Сабуро	Грибы: Candida albicans NCTC Aspergillus niger ATCC	 885-653 9642	22,5 ± 2,5	5
Питательные среды для выявления микоплазм	Микоплазмы: Acholeplasma laidlawii NCTC 10116, ATCC Mycoplasma gallisepticum NCTC 10115, ATCC Mycoplasma hyorhinis NCTC Mycoplasma orale NCTC 10112, ATCC Mycoplasma synoviae NCTC 10124, ATCC	 23206 19610 10130 23714 25204	37 ± 1	21

Примечания

1 ATCC – Американская коллекция типовых культур, США.

2 ГИСК – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Россия.

3 NCTC – Национальная коллекция типовых культур.

Инкубируют в соответствии с условиями, описанными в таблице 3. Если в течение времени инкубации в средах визуально отмечают рост тест-штамма микроорганизма, среду считают пригодной для использования.

7.7.3 При проведении испытаний на ростовые свойства питательных сред для определения микоплазм в биологических препаратах используют по крайней мере один из видов микоплазм, указанных в таблице 3. При этом учитывают целевое назначение тест-культур:

- Acholeplasma laidlawii NCTC 10116, ATCC 23206 (вакцины для ветеринарного применения, в производстве которых используют антибиотики);
- Mycoplasma gallisepticum NCTC 10115, ATCC 19610 (в случаях, когда при производстве вакцин используются материалы, имеющие птичье происхождение или для вакцин, применяемых в птицеводстве);
- Mycoplasma hyorhinis NCTC 10130, ATCC 17981 (вакцины для ветеринарного применения, кроме птичьих);
- Mycoplasma orale NCTC 10112, ATCC 23714 (вакцины для ветеринарного применения);
- Mycoplasma synoviae NCTC 10124, ATCC 25204 (в случаях, когда для производства вакцин используются материалы, имеющие птичье происхождение или для вакцин, применяемых в птицеводстве).

7.7.4 Выбранные питательные среды для микоплазм засевают соответствующими тест-микроорганизмами. На чашку Петри с твердой питательной средой или флакон вместимостью 100 $см^3$, содержащий жидкую питательную среду, вносят не более 100 КОЕ тест-микроорганизма. Для каждого вида микроорганизма используют отдельные чашки и флаконы. Жидкие среды инкубируют при температуре от 36 °С до 38 °С; твердые среды инкубируют в микроаэрофильных условиях (в атмосфере азота, содержащего 5 % – 10 % диоксида углерода) при температуре от 36 °С до 38 °С. После инкубации проводят пересевы по 0,2 $см^3$ жидкой среды на твердую среду на седьмой, четырнадцатый и двадцатый день. Твердая среда выдерживает испытание, если наблюдается адекватный рост каждого тест-микроорганизма. Жидкая среда выдерживает испытание, если наблюдается адекватный рост пересеянного с нее тест-микроорганизма на чашках Петри с твердой питательной средой.

7.7.5 Питательные среды должны обеспечивать рост микроорганизмов-контаминантов биологических препаратов.

7.7.6 Готовые питательные среды, проверенные на ростовые свойства, разливают по 6 – 8 $см^3$ (для определения анаэробных микроорганизмов по 10 – 12 $см^3$ в пробирки и по 50 – 60 $см^3$ во флаконы вместимостью 100 $см^3$.

8 Проведение испытания

8.1 Проведение испытания на стерильность инактивированных лекарственных средств с использованием тиогликолевой среды

8.1.1 Из каждого флакона (ампулы) лекарственного средства проводят посев в количестве, приведенном в таблице 2, в три пробирки с тиогликолевой средой, три пробирки с жидкой средой Сабуро и три пробирки с соево-казеиновой средой.

Посевы на жидкой тиогликолевой среде инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С, а на жидкой среде Сабуро и жидкой соево-казеиновой среде (независимо от метода посева) при температуре (22,5 ± 2,5) °С. Срок инкубирования – 14 сут. Посевы периодически просматривают.

8.1.2 Наличие роста микроорганизмов определяют визуально. Если в процессе инкубирования посевов исследуемая проба вызывает помутнение питательной среды, через 5 – 7 сут после начала испытания не менее 1 $см^3$ помутневшей среды переносят в две пробирки с той же стерильной средой. Инкубируют исходные посевы и пересевы в течении (14 ± 4) сут.

8.1.3 При испытании проб препаратов на стерильность проводят контроль стерильности сред: три пробирки с каждой средой выдерживают в термостате в течение 14 сут при температуре (32,5 ± 2,5) °С, со средой Сабуро – при температуре (22,5 ± 2,5) °С.

8.2 Проведение испытания на стерильность лекарственных средств, содержащих инактивированные микроорганизмы, или микробную и грибную контаминацию лекарственных средств, содержащих живые микроорганизмы без тиогликолевой среды

8.2.1 Из каждой пробы лекарственного средства проводят посев на жидкие питательные среды: Сабуро, МПБ и МППБ (среда Китт-Тароцци) и твердые питательные среды: Сабуро и МПА. На посев используют по три пробирки и две чашки с питательной средой. На среду Китт-Тароцци делают высевы в две пробирки и два флакона.

8.2.2 Для выявления аэробных микроорганизмов и факультативно-анаэробных микроорганизмов высевают 0,5 $см^3$ посевного материала в одну пробирку и 1 – 2 $см^3$ в один флакон, а для выявления анаэробных микроорганизмов – соответственно по 1 и 5 $см^3$.

8.2.3 Пробирки и флаконы с посевами на всех средах, кроме среды Сабуро, выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С, на среде Сабуро – при температуре (22,5 ± 2,5) °С, в течение 7 сут (для анаэробных препаратов – 14 сут).

8.2.4 По истечении указанного срока делают пересев, за исключением посевов на МПА. Пересевают пробы на те же питательные среды и в тех же объемах, что и при посеве. Вторичные посевы выдерживают 7 сут (для анаэробных препаратов – 14 сут).

8.3 Проведение испытания на контаминацию микоплазмами

8.3.1 Для определения контаминации микоплазмами лекарственных средств проводят их посев на выбранные питательные среды (7.5.9 – 7.5.11) в количестве 10 $см^3$ лекарственного средства на 100 $см^3$ каждой жидкой среды, а также по 0,2 $см^3$ на четыре чашки Петри с аналогичной твердой питательной средой.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в аэробных и микроаэрофильных условиях (в атмосфере азота, содержащего 5 % – 10 % диоксида углерода). Жидкие питательные среды инкубируют в течение 20 – 21 дня. Твердые питательные среды инкубируют в течение не менее 14 дней, за исключением посевов, соответствующих 20 – 21-дневному пересеву, которые инкубируют в течение семи дней. Одновременно в тех же условиях инкубируют по одному флакону, содержащему 100 $см^3$, и по две чашки Петри со средами для контроля их стерильности.

На 2-й – 4-й день после посева проводят пересев материала от каждой жидкой среды в количестве не менее 0,2 $см^3$ на две чашки Петри каждой твердой среды. Пересевы повторяют на 7-й, 14-й и 20-й дни испытания. Пересевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в аэробных и микроаэрофильных условиях (в атмосфере азота, содержащего 5 % – 10 % диоксида углерода) в течение 21 дня.

8.3.2 Состояние жидких сред контролируют каждые два или три дня и, в случае изменения окраски среды, выполняют пересев. Если в жидких средах обнаруживают рост бактерий и грибов, испытание считают недействительным и повторяют.

8.3.3 Допускается для целей экспресс-метода – выявления микоплазм и/или подтверждения принадлежности выделенных культур к микоплазмам – использование метода полимеразной цепной реакции с применением соответствующих тест-систем. Работу проводят по инструкции производителя.

9 Проведение испытания на стерильность методом мембранной фильтрации

9.1 При определении стерильности лекарственных средств, обладающих выраженным антимикробным действием, а также в расфасовке более чем 100 $см^3$, можно использовать метод мембранной фильтрации.

9.2 Испытание проводят с использованием фильтрационной установки, которую монтируют таким образом, чтобы исследуемую пробу жидкого препарата можно было ввести и профильтровать в условиях асептики. Используют мембранные фильтры с размером пор (0,45 ± 0,02) мкм и внешним диаметром 47 мм с установленной способностью к удерживанию микроорганизмов. Материал фильтров – нитрат целлюлозы или ацетат целлюлозы.

9.3 Отбирают необходимое для испытания количество исследуемой пробы согласно таблице 2 и асептически переносят на один или несколько фильтров.

При использовании замкнутой системы, емкости заполняют равным объемом сред. При этом следует избегать аэрации тиогликолевой среды.

Испытания проводят под вакуумом при давлении 93,3 кПа и скорости прохождения жидкости 55 – 75 $см^3$ в мин.

9.4 После окончания фильтрации мембрану промывают тремя – пятью порциями стерильного 0,9 %-ного раствора хлорида натрия или дистиллированной воды, после чего мембрану асептически извлекают, разрезают стерильными ножницами пополам. Одну половину помещают в колбу, содержащую 100 $см^3$ тиогликолевой среды, а вторую – в колбу со 100 $см^3$ среды Сабуро. Тиогликолевую среду с помещенными в них фильтрами выдерживают при температуре (32,5 ± 2,5) °С, а среду Сабуро при температуре (22,5 ± 2,5) °С в течение 7 сут при ежедневном просмотре.

10 Учет и оценка результатов

10.1 Учет результатов проводят после окончания периода инкубации.

10.1.1 Лекарственные средства, содержащие инактивированные микроорганизмы и грибы, считают стерильными, если в посевах на питательные среды отсутствует рост бактерий, грибов и микоплазм.

10.1.2 Лекарственные средства, содержащие живые микроорганизмы и грибы, считают свободными от контаминации посторонними бактериями, грибами и микоплазмами, если в посевах на питательные среды не обнаруживают рост посторонней микрофлоры.

10.1.3 Если при определении микоплазм обнаружен рост сомнительных колоний, то проводят их идентификацию. Клеточные культуры окрашивают флуоресцентным красителем, обладающим способностью связываться с ДНК. Микоплазмы обнаруживают по характерной точечной или волокнистой флуоресценции на клеточной поверхности. Лекарственные средства считают выдержавшими испытание, если типичная для микоплазм флуоресценция не обнаружена.

Библиография

[1] Руководство ЕС по надлежащей производственной практике для лекарственных средств медицинского и ветеринарного назначения (EC Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use)

УДК 615.37: 619.001.006.354 МКС 11.220

Ключевые слова: средства лекарственные, стерильность, контаминация, микробиологическая оценка, питательные среды, микрофлора, микоплазмы, мембранная фильтрация

Подписано в печать 01.04.2014. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 1,86. Тираж 31 экз. Зак. 755.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru