2.1.6.9. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, РАСТИТЕЛЬНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРИЕМА ВНУТРЬ

1. МЕТОДЫ ПОДСЧЕТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Общее количество аэробных микроорганизмов. Испытания проводят в соответствии с общей фармакопейной статьей *2.1.6.6 Микробиологические испытания нестерильных продуктов: общее количество микроорганизмов*.

Общее количество дрожжевых и плесневых грибов. Испытания проводят в соответствии с общей фармакопейной статьей *2.1.6.6*. С учетом высокой исходной микробной нагрузки в лекарственном растительном сырье, растительных фармацевтических субстанциях и лекарственных растительных препаратах (далее «продукты») (*2.3.1.4*) подходящим будет использование агара Сабуро с декстрозой, содержащего антибиотики.

2. ИСПЫТАНИЯ НА НАЛИЧИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1. ВВЕДЕНИЕ

Испытания, приведенные ниже, позволяют определить отсутствие или наличие ограниченного количества определенных видов микроорганизмов, которые могут быть обнаружены в приведенных ниже условиях.

Испытания предназначены, прежде всего, для определения соответствия продукта критериям приемлемости микробиологического качества. При проведении испытаний следуют указаниям, изложенным ниже, включая указания к количеству отбираемых образцов и интерпретации полученных результатов.

Альтернативные микробиологические методики, включая автоматизированные методы, могут использоваться в том случае, если доказана их эквивалентность фармакопейным методикам.

2.2. ОБЩИЕ МЕТОДИКИ

Подготовку образцов проводят в соответствии с общей фармакопейной статьей *2.1.6.6*.

Если испытуемый продукт обладает антимикробным действием, оно должно быть устранено или нейтрализовано настолько, насколько это возможно, в соответствии с общей фармакопейной статьей *2.1.6.6*.

Если для подготовки испытуемого продукта используют поверхностно-активные вещества (ПАВ), должно быть подтверждено отсутствие их токсичности в отношении микроорганизмов и их совместимость с используемыми инактиваторами в соответствии с общей фармакопейной статьей *2.1.6.6*.

2.3. ПРОВЕРКА РОСТОВЫХ (СПОСОБНОСТЬ ОБЕСПЕЧИВАТЬ РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ) И ИНГИБИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ПРИГОДНОСТИ МЕТОДА И ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ КОНТРОЛИ

Должна быть подтверждена возможность обнаружения микроорганизмов в присутствии испытуемого продукта. При внесении в методику или в продукт каких-либо изменений, которые могут повлиять на результат испытания, должна быть подтверждена пригодность методики.

2.3.1. Подготовка тест-штаммов

Используют стандартизованные стабильные суспензии тест-штаммов микроорганизмов или их готовят, как указано ниже. Посевные культуры при проведении испытания используют таким образом, чтобы жизнеспособные микроорганизмы для инокуляции были из пассажа, не превышающего пятого пассажа от главной посевной культуры.

2.3.1.1. Аэробные микроорганизмы

Каждый тест-штамм выращивают по отдельности на соево-казеиновом бульоне или на соево-казеиновом агаре при температуре от 30 °C до 35 °C в течение от 18 ч до 24 ч.

– *Staphylococcus aureus*, например, ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, NBRC 13276 или ГКПМ 201206;

– *Pseudomonas aeruginosa*, например, ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275 или ГКПМ 190155;

– *Escherichia coli*, например, ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 или NBRC 3972;

– *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серовар Typhimurium, например, ATCC 14028, или как альтернатива *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серовар Abony, например, NBRC 100797, NCTC 6017 или CIP 80.39;

– *Bacillus subtilis*, например, ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, NBRC 3134 или ГКПМ 010011.

Для приготовления суспензий тест-штаммов используют натрия хлорида и пептона забуференный раствор с pH 7,0 или фосфатный буферный раствор с pH 7,2. Суспензию используют в течение 2 ч или в течение 24 ч (в случае хранения при температуре от 2 °C до 8 °C). В качестве альтернативы приготовлению и последующему разведению свежеприготовленной суспензии вегетативных клеток *B. subtilis* готовят стабильную суспензию спор, затем для инокуляции используют подходящий объем суспензии спор. Стабильную суспензию спор можно хранить при температуре от 2 °C до 8 °C в течение валидированного периода времени.

2.3.2. Отрицательный контроль

Для проверки условий испытания проводят отрицательный контроль с использованием выбранного растворителя (разбавителя) вместо испытуемого продукта. Рост микроорганизмов наблюдаться не должен. Отрицательный контроль проводят также при испытании продукта как описано в разделе *2.4. Испытание продукта*. При неудовлетворительном результате испытания отрицательного контроля проводят расследование.

2.3.3. Проверка ростовых и ингибирующих свойств питательных сред

Испытанию подлежит каждая серия готовой питательной среды, а также каждая серия среды, приготовленной или из сухой среды, или из отдельных компонентов.

Проверку подходящих свойств питательных сред проводят, как описано в таблице 2.1.6.9.-1.

Таблица 2.1.6.9.-1 – *Ростовые, ингибирующие и индикаторные свойства питательных сред*

	Среда	**Свойство**	**Тест-штаммы**
Испытание на грамотрицательные бактерии устойчивые к желчи	Соево-казеиновый бульон	Ростовое	*S. aureus* *P. aeruginosa* *B. subtilis*
	Бульон Мосселя для обогащения энтеробактерий	Ростовое	*E. coli* *P. aeruginosa*
		Ингибирующее	*S. aureus*

	Фиолетово-красный желчный агар с глюкозой	Ростовое + индикаторное	*E. coli* *P. aeruginosa*
Испытание на *Escherichia coli*	Соево-казеиновый бульон	Ростовое	*S. aureus* *P. aeruginosa* *B. subtilis*
	Бульон МакКонки	Ростовое	*E. coli*
		Ингибирующее	*S. aureus*
	Агар МакКонки	Ростовое + индикаторное	*E. coli*
Испытание на *Salmonella*	Забуференная пептонная среда	Ростовое	*S. enterica* subsp. *enterica* серовар Typhimurium или *S. enterica* subsp. *enterica* серовар Abony
	Соевый бульон Раппопорта-Вассилиадиса для обогащения *Salmonella*	Ростовое	*S. enterica* subsp. *enterica* серовар Typhimurium или *S. enterica* subsp. *enterica* серовар Abony
		Ингибирующее	*S. aureus*
	Ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар	Ростовое + индикаторное	*S. enterica* subsp. *enterica* серовар Typhimurium или *S. enterica* subsp. *enterica* серовар Abony

Испытание на ростовые свойства, жидкие питательные среды: инокулируют часть соответствующей среды небольшим количеством (не более 100 КОЕ) соответствующего микроорганизма. Инкубируют при указанной температуре не дольше минимального периода времени, указанного в условиях испытания. Соево-казеиновый бульон инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение не более трех суток. Должен наблюдаться рост микроорганизмов, сопоставимый с ранее полученными результатами на ранее проверенной и пригодной серии питательной среды.

Испытание на ростовые свойства, плотные питательные среды: посев выполняют поверхностным способом, инокулируя каждую чашку небольшим количеством (не более 100 КОЕ) соответствующего микроорганизма. Инкубируют при указанной температуре не дольше минимального периода времени, указанного в условиях испытания. Должен наблюдаться рост микроорганизмов, сопоставимый с ранее полученными результатами на ранее проверенной и пригодной серии среды.

Испытание на ингибирующее действие, жидкие или плотные питательные среды: каждую среду инокулируют небольшим количеством (не менее 100 КОЕ) соответствующего микроорганизма. Инкубируют при указанной температуре в течение не менее максимального периода времени, указанного в условиях испытания. Не должен наблюдаться рост микроорганизмов.

Испытание на индикаторные свойства: посев выполняют поверхностным способом, инокулируя каждую чашку небольшим количеством (не более 100 КОЕ) соответствующего микроорганизма. Инкубируют при указанной температуре в течение периода времени, указанного в условиях испытания. Колонии должны быть сопоставимы по внешнему виду и характерным индикаторным признакам с ранее полученными результатами на ранее проверенной и пригодной серии среды.

2.3.4. Пригодность методики

Для каждого испытуемого продукта выполняют подготовку образца как указано в разделе *2.4. Испытание продукта*. Каждый тест-штамм прибавляют при перемешивании в предписанную питательную среду (соево-казеиновый бульон или забуференная пептонная среда). Для подсчета грамотрицательных бактерий, устойчивых к желчи, инокулируют отдельно *E. coli* и *P. aeruginosa*. Для испытания на *E. coli* и *Salmonella* посев осуществляют отдельно для каждого микроорганизма.

При наличии у продукта антимикробного действия необходимо внесение изменений в методику испытаний *(см. раздел 4.5.3 общей фармакопейной статьи 2.1.6.6)*.

Если антимикробная активность продукта в отношении микроорганизма, на обнаружение которого направлено испытание, не может быть нейтрализована, принято считать, что ингибированный микроорганизм не будет присутствовать в продукте.

2.3.4.1. Испытание на отсутствие микроорганизмов. Используют количество микроорганизмов, эквивалентное не более 100 КОЕ в инокулированном испытуемом продукте. Испытание проводят, как описано в разделе *2.4. Испытание продукта*, используя наименьший период инкубации, указанной в условиях испытания. Микроорганизмы обнаруживают по характерным признакам по индикаторным реакциям, как указано в разделе *2.4. Испытание продукта*.

2.3.4.2. Количественное испытание. Полуколичественный метод (метод наиболее вероятных чисел (НВЧ)).

Используют количество микроорганизмов, эквивалентное не более 100 КОЕ в 1 г или в 1 мл продукта. Испытание проводят, как описано в соответствующем разделе *2.4. Испытание продукта*, используя наименьший период инкубации, указанный в условиях испытания. Разведение, соответствующее 0,1 г или 0,1 мл продукта, должно давать положительный результат.

2.4. ИСПЫТАНИЕ ПРОДУКТОВ

2.4.1. Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи

2.4.1.1. Количественное испытание. Полуколичественный метод (метод наиболее вероятных чисел).

2.4.1.1.1. Подготовка образца и предварительная инкубация. Испытуемый образец в количестве не менее 1 г разводят 1:10 в соответствии с указаниями, приведенными в общей фармакопейной статье *2.1.6.6*, но с использованием соево-казеинового бульона в качестве выбранного растворителя (разбавителя), перемешивают и инкубируют при температуре от 20 °С до 25 °С в течение промежутка времени, достаточного для восстановления бактерий и недостаточного для инициирования их размножения (от 2 ч до 3 ч).

2.4.1.1.2. Выделение и пересев. Соответствующие количества бульона Мосселя для обогащения энтеробактерий инокулируют испытуемым образцом, как описано выше, и (или) в зависимости от предела, применимого к конкретному продукту, с тремя или четырьмя разведениями подготовленного образца, содержащими, соответственно, 0,1 г, 0,01 г, 0,001 г и 0,0001 г (или 0,1 мл, 0,01 мл, 0,001 мл и 0,0001 мл) испытуемого продукта. Инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение от 24 ч до 48 ч. Пересевают на чашки с фиолетово-красным желчным агаром с глюкозой. Инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение от 18 ч до 24 ч.

2.4.1.1.3. Интерпретация результатов. Положительным результатом считают рост колоний. Отмечают наименьшее количество продукта, дающее положительный результат, и наибольшее количество, дающее отрицательный результат. Вероятное количество микроорганизмов определяют по таблице 2.1.6.9.-2.

Таблица 2.1.6.9.-2 – *Интерпретация результатов*

Результаты для соответствующего количества продукта				**Вероятное количество бактерий в грамме или миллилитре продукта**
0,1 г или 0,1 мл	**0,01 г или 0,01 мл**	**0,001 г или 0,001 мл**	**0,0001 г или 0,0001 мл**	
+	+	+	+	$> 10^4$
+	+	+	–	$< 10^4$ и $> 10^3$
+	+	–	–	$< 10^3$ и $> 10^2$
+	–	–	–	$< 10^2$ и > 10
–	–	–	–	< 10

2.4.2. Escherichia coli

2.4.2.1. Испытание на отсутствие микроорганизмов

2.4.2.1.1. Подготовка образца и предварительная инкубация. Не менее 1 г испытуемого продукта разводят 1:10 в соответствии с указаниями, приведенными в общей фармакопейной статье *2.1.6.6*, и используют 10 мл или количество, соответствующее 1 г или 1 мл, для инокуляции в подходящее количество, определенное как описано в разделе *2.3.4. Пригодность методики*, соево-казеинового бульона, перемешивают и инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение от 18 ч до 24 ч.

2.4.2.1.2. Выделение и пересев. Емкость встряхивают, переносят 1 мл инокулированного соево-казеинового бульона в 100 мл бульона МакКонки и инкубируют при температуре от 42 °С до 44 °С в течение от 24 ч до 48 ч. Пересевают на чашки с агаром МакКонки и инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение от 18 ч до 72 ч.

2.4.2.1.3. Интерпретация результатов. Рост колоний указывает на возможное присутствие *E. coli*. Подтверждают идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если колонии *E. coli* отсутствуют или получены отрицательные результаты идентификационных испытаний.

2.4.2.2. Количественное испытание. Полуколичественный метод (метод наиболее вероятных чисел).

2.4.2.2.1. Подготовка образца и предварительная инкубация. Не менее 1 г испытуемого продукта разводят 1:10 в соответствии с указаниями, приведенными в общей фармакопейной статье 2.1.6.6, и используют количество, соответствующее 0,1 г, 0,01 г и 0,001 г (или 0,1 мл, 0,01 мл и 0,001 мл) испытуемого образца для инокуляции в подходящем количестве соево-казеинового бульона (определенного, как описано в разделе *2.3.4. Пригодность методики*), перемешивают и инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение от 18 ч до 24 ч.

2.4.2.2.2. Выделение и пересев. Емкость встряхивают, переносят 1 мл инокулированного соево-казеинового бульона в 100 мл бульона МакКонки и инкубируют при температуре от 42 °С до 44 °С в течение от 24 ч до 48 ч. Пересевают на чашки с агаром МакКонки при температуре от 30 °С до 35 °С в течение от 18 ч до 72 ч.

2.4.2.2.3. Интерпретация результатов. Рост колоний указывает на возможное присутствие *E. coli*. Подтверждают идентификационными испытаниями. Отмечают наименьшее количество продукта с положительным результатом и наибольшее количество продукта с отрицательным результатом.

Вероятное количество микроорганизмов определяют по таблице 2.1.6.9.-3.

Таблица 2.1.6.9.-3 – *Интерпретация результатов*

Результаты для соответствующего количества образца			**Вероятное количество бактерий в грамме или миллилитре продукта**
0,1 г или 0,1 мл	**0,01 г или 0,01 мл**	**0,001 г или 0,001 мл**	
+	+	+	> 10^3
+	+	–	< 10^3 и > 10^2
+	–	–	< 10^2 и > 10
–	–	–	< 10

2.4.3. Salmonella

2.4.3.1. Испытание на отсутствие микроорганизмов

2.4.3.1.1. Подготовка образца и предварительная инкубация. Готовят испытуемый образец, используя 25 г или 25 мл испытуемого продукта, инокулируют в 225 мл забуференной пептонной среды и перемешивают (например, лекарственный растительный препарат гомогенизируют в подходящем фильтр-пакете с помощью соответствующего оборудования). Инкубируют при температуре от 30 °C до 35 °C в течение от 18 ч до 24 ч.

2.4.3.1.2. Выделение и пересев. Вносят 0,1 мл забуференной пептонной среды в 10 мл соевого бульона Раппопорта-Вассилиадиса для обогащения *Salmonella* и инкубируют при температуре от 30 °C до 35 °C в течение от 18 ч до 24 ч. Пересевают на чашки с ксилоза-лизин-дезоксихолатным агаром и инкубируют при температуре от 30 °C до 35 °C в течение от 18 ч до 48 ч.

2.4.3.1.3. Интерпретация результатов. На вероятное присутствие *Salmonella* указывает рост хорошо развитых колоний красного цвета с черным центром или без него. Подтверждают идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если колонии *Salmonella* отсутствуют или получены отрицательные результаты идентификационных испытаний.

Данный раздел приводится для информации.

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ РАСТВОРЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Для целей данной общей фармакопейной статьи признаны подходящими растворы и питательные среды, представленные в данной общей фармакопейной статье и в общей фармакопейной статье 2.1.6.7, а также описанная ниже забуференная пептонная среда. Могут быть использованы и другие питательные среды, при условии, что их пригодность может быть доказана.

Забуференная пептонная среда

Калия дигидрофосфат	1,5 г
Динатрия гидрофосфата додекагидрат	9,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Пептон	10,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации значение pH составляло от 6,8 до 7,2 при температуре 25 °C. Стерилизуют в автоклаве, используя валидированный цикл.