2.1.6.1 СТЕРИЛЬНОСТЬ

Общая фармакопейная статья соответствует аналогичному тексту, гармонизированному в рамках Фармакопейной дискуссионной группы (PDG). Негармонизированный текст обозначен символами «♦ ♦».

В общей фармакопейной статье приведены методы испытания на стерильность субстанций для фармацевтического применения, лекарственных препаратов и материалов, к которым предъявляется требование стерильности *(далее – продукты)*.

Удовлетворительный результат свидетельствует только о том, что в испытуемом образце в условиях испытания не обнаружено контаминирующих микроорганизмов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРОТИВ КОНТАМИНАЦИИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Испытание на стерильность выполняют в асептических условиях. Для обеспечения таких условий, окружающая среда должна быть адаптирована к способу проведения испытания на стерильность. Меры предосторожности, принимаемые для предупреждения контаминации, не должны влиять ни на один из микроорганизмов, обнаруживаемых в ходе испытания. Условия, в которых выполняется испытание, регулярно контролируют путём отбора проб рабочей зоны, а также проведением соответствующих контролей.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И ТЕМПЕРАТУРА ИНКУБАЦИИ

Питательные среды для испытаний могут быть приготовлены, как описано ниже, можно использовать коммерчески доступные эквивалентные питательные среды, если они выдерживают испытание на ростовые свойства.

Установлено, что указанные ниже питательные среды подходят для проведения испытания на стерильность. Жидкая тиогликолевая среда в первую очередь предназначена для культивирования анаэробных бактерий, однако, она также может обнаруживать и аэробные бактерии. Соево-казеиновая среда подходит для культивирования как грибов, так и аэробных бактерий.

Жидкая тиогликолевая среда

L-цистин	0,5 г
Агар микробиологический (влажность не более 15 %)	0,75 г
Натрия хлорид	2,5 г
Глюкоза моногидрат/глюкоза	5,5 г/5,0 г
Дрожжевой экстракт (водорастворимый)	5,0 г
Панкреатический гидролизат *(перевар)* казеина	15,0 г
Натрия тиогликолят или	0,5 г
кислота тиогликолевая	0,3 мл
Раствор резазурина натрия (1 г/л), свежеприготовленный	1,0 мл
Вода Р	1000 мл
pH после стерилизации	От 6,9 до 7,3

Смешивают L-цистин, агар микробиологический, натрия хлорид, глюкозу, водорастворимый дрожжевой экстракт и панкреатический гидролизат казеина с водой Р и нагревают до полного растворения. В полученной смеси растворяют натрия тиогликолят или тиогликолевую кислоту и, если необходимо, прибавляют *1 М раствор натрия гидроксида* в таком количестве, чтобы после стерилизации pH среды составлял от 6,9 до

7,3. Если необходима фильтрация, раствор снова нагревают, не доводя до кипения, и фильтруют горячим через увлажнённую фильтровальную бумагу. Прибавляют раствор резазурина натрия, перемешивают, помещают среду в подходящие ёмкости, которые обеспечивают такое соотношение поверхности среды и глубины, при котором не более верхней половины среды претерпевает изменение цвета, указывающее на поглощение кислорода в конце инкубационного периода. Стерилизуют, используя валидированный процесс. Среду хранят при температуре от 2 °C до 25 °C в стерильных герметичных ёмкостях. Если более одной трети верхней части среды приобретает розовую окраску, среда может быть однократно восстановлена нагреванием ёмкости в водяной бане или текучим паром до исчезновения розовой окраски с последующим быстрым охлаждением при соблюдении мер, предупреждающих попадание в ёмкости нестерильного воздуха. Среду не используют по истечении сроков хранения, установленных на основании валидации.

Жидкую тиогликолевую среду инкубируют при температуре от 30 °C до 35 °C.

Для лекарственных средств, содержащих ртутные консерванты, которые не могут проходить испытание на стерильность методом мембранной фильтрации, вместо соево-казеиновой среды может быть использована жидкая тиогликолевая среда, которую инкубируют при температуре от 20 °C до 25 °C, если подтверждена пригодность к использованию после прохождения испытания на определение ростовых свойств.

Если указано или обосновано и разрешено используют альтернативную тиогликолевую среду, которая имеет тот же состав, что и жидкая тиогликолевая среда, за исключением агара и резазурина натрия. Полученную смесь стерилизуют, как описано выше. После стерилизации величина pH должна быть от 6,9 до 7,3. Перед применением смесь нагревают на водяной бане и инкубируют при температуре от 30 °C до 35 °C в анаэробных условиях.

Соево-казеиновая среда

Панкреатический гидролизат *(перевар)* казеина	17,0 г
Папаиновый гидролизат *(перевар)* соевых бобов	3,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия фосфат двузамещенный	2,5 г
Глюкоза моногидрат/глюкоза	2,5 г/2,3 г
Вода Р	1000,0 мл
pH после стерилизации	От 7,1 до 7,5

Твёрдые компоненты растворяют в *воде Р*, слегка нагревая, до получения раствора. Раствор охлаждают до комнатной температуры. При необходимости, прибавляют *1 М раствор натрия гидроксида*, так, чтобы после стерилизации pH раствора составлял от 7,1 до 7,5. При необходимости, фильтруют для получения прозрачного раствора, помещают в подходящие ёмкости и стерилизуют, используя валидированный процесс. Среду хранят при температуре от 2 °C до 25 °C в стерильных герметичных ёмкостях, если она не предназначена для немедленного использования. Среду не используют по истечении сроков хранения, установленных на основании валидации.

Соево-казеиновую среду инкубируют при температуре от 20 °C до 25 °C.

Питательная среда должна выдерживать следующие испытания, проводимые до или параллельно с испытанием продукта на стерильность.

СТЕРИЛЬНОСТЬ.

Порции питательной среды инкубируют в течение 14 дней. Не должно появиться признаков роста микроорганизмов.

*ИСПЫТАНИЯ НА СТИМУЛИРОВАНИЕ РОСТА АЭРОБОВ, АНАЭРОБОВ И ГРИБОВ *(РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА СРЕД)*.*

Испытанию подвергают каждую партию готовой среды и каждую партию среды, приготовленной из сухих сред или из ингредиентов. Подходящие штаммы микроорганизмов указаны в таблице 2.1.6.1-1.

Порции жидкой тиогликолевой среды инокулируют небольшим количеством (не более 100 КОЕ) следующих микроорганизмов, используя отдельную порцию среды для каждого микроорганизма: *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Порции соево-казеиновой среды инокулируют небольшим количеством (не более 100 КОЕ) следующих микроорганизмов, используя отдельную порцию среды для каждого микроорганизма: *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*. Инкубируют в течение не более трёх суток для выращивания бактерий и не более пяти суток для выращивания грибов.

Посевные культуры при проведении испытания используют таким образом, чтобы жизнеспособные микроорганизмы для инокуляции были из пассажа, не превышающего пятого пассажа от главной посевной культуры.

Питатльные среды являются пригодными при условии наличия чёткого визуально наблюдаемого роста микроорганизмов.

Таблица 2.1.6.1.-1. – *Тест-штаммы микроорганизмов, пригодные для проверки ростовых свойств и пригодности методики испытания*

Аэробные бактерии	
Staphylococcus aureus	ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276, *ГКПМ 201206*
Bacillus subtilis (B. spizizenii)	ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, NBRC 3134, *ГКПМ 010011*
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275, *ГКПМ 190155*
Анаэробные бактерии	
Clostridium sporogenes	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 или ATCC 11437, NBRC 14293
Грибы	
Candida albicans	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594, *ГКПМ 303903*
Aspergillus brasiliensis	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455

ПРОВЕРКА ПРИГОДНОСТИ МЕТОДИКИ ИСПЫТАНИЯ

Проверку пригодности проводят тем же методом, которым проводят испытание на стерильность продукта, со следующими изменениями.

МЕМБРАННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ

После переноса содержимого упаковки или упаковок на мембрану в заключительную порцию стерильного растворителя, используемого для промывки фильтра, вносят небольшое количество жизнеспособных микроорганизмов (не более 100 КОЕ).

ПРЯМОЙ ПОСЕВ

После внесения в питательную среду содержимого упаковки или упаковок (для кетгута и других хирургических шовных материалов для ветеринарного применения: нити) в среду вносят небольшое количество жизнеспособных микроорганизмов (не более 100 КОЕ). В обоих случаях используют те же штаммы микроорганизмов, что описаны выше в разделе *Испытания на стимулирование роста аэробов, анаэробов и грибов *(ростовые свойства сред)**. В качестве положительного контроля проводят испытание на стимулирование роста. Все ёмкости, содержащие питательную среду, инкубируют не

более пяти суток. Если после инкубации наблюдают рост микроорганизмов, визуально сопоставимый с ростом микроорганизмов в контроле, не содержащем испытуемого образца, делают вывод, что либо испытуемый образец в этих условиях испытания не обладает антимикробным действием, либо это действие было в достаточной мере устранено. В таком случае испытание на стерильность может быть проведено без дальнейших изменений.

Если после инкубации не наблюдают роста микроорганизмов, визуально сопоставимого с ростом микроорганизмов в контроле, не содержащем испытуемого образца, делают вывод, что испытуемый продукт обладает антимикробным действием, которое не было в достаточной мере устранено в выбранных условиях испытания. Изменяют условия испытания, чтобы устранить антимикробную активность, и повторяют проверку пригодности методики.

Проверку пригодности методики испытания проводят в следующих случаях:

а) когда проводится испытание на стерильность нового продукта;

б) при внесении любых изменений в экспериментальные условия испытания.

Проверку пригодности можно выполнять одновременно с испытанием на стерильность испытуемого продукта.

ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Испытание может быть проведено с использованием метода мембранной фильтрации или путём прямого посева испытуемого образца в питательную среду. При испытании проводят соответствующие отрицательные контроли. Метод мембранной фильтрации используют во всех случаях, когда это допускается свойствами испытуемого продукта, то есть для фильтруемых водных ЛС, спиртовых или масляных ЛС, а также для ЛС, смешиваемых или растворимых в водных или масляных растворителях, не обладающих антимикробным действием в условиях испытания.

МЕМБРАННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ

Используют мембранные фильтры с номинальным размером пор, не превышающим 0,45 мкм, с установленной эффективностью удержания микроорганизмов. Например, фильтры на основе нитрата целлюлозы используют для водных, масляных и разбавленных спиртовых растворов, а фильтры на основе ацетата целлюлозы – для растворов с высоким содержанием спирта. Для некоторых видов ЛС, например, для антибиотиков, могут потребоваться специально адаптированные фильтры.

Приведенная ниже методика предполагает использование мембран диаметром около 50 мм. При использовании фильтров других диаметров объёмы разведений и промывок должны быть изменены соответствующим образом. Фильтровальную установку и мембрану стерилизуют подходящим способом. Конструкция установки должна обеспечивать введение и фильтрацию испытуемого раствора в асептических условиях, асептическое извлечение мембраны для её переноса в питательную среду или проведение инкубации после помещения питательной среды в установку.

Водные растворы. При необходимости небольшое количество подходящего стерильного растворителя, например, нейтрального раствора мясного или казеинового пептона с концентрацией 1 г/л (pH от 6,9 до 7,3), помещают на мембрану установки и фильтруют. Растворитель может содержать подходящие нейтрализующие и (или) инактивирующие вещества, например, в случае антибиотиков.

Содержимое упаковки или упаковок переносят на мембрану или мембраны после разбавления (при необходимости) выбранным стерильным растворителем до объёма, используемого при проверке пригодности методики испытания; в любом случае, используют количество испытуемого образца, не менее указанного в таблице номер-2. Немедленно фильтруют. Если испытуемый продукт обладает антимикробным действием, мембрану промывают не менее трёх раз путём пропускания через неё объёма выбранного

стерильного растворителя, используемого при проверке пригодности методики испытания. Промывочный цикл не должен превышать пяти раз по 100 мл на фильтр, даже если при проверке пригодности методики было показано, что такой цикл не полностью устраняет антимикробное действие. Мембрану целиком переносят в питательную среду или делят её в асептических условиях на две равные части, каждую из которых помещают в две подходящие питательные среды. Используют такие же объёмы питательных сред, как и при проверке пригодности методики. Альтернативно, питательная среда может быть перенесена на мембрану установки. Питательные среды инкубируют в течение не менее 14 дней.

Твердые растворимые вещества. Для каждой питательной среды используют не менее указанного в таблице 2.1.6.1.-2 количества продукта, растворённого в подходящем растворителе, например, растворителе из комплекта с лекарственным препаратом, воде для инъекций, физиологическом растворе или нейтральном растворе мясного или казеинового пептона с концентрацией 1 г/л, и проводят испытание по методике, описанной выше для водных растворов, с использованием мембраны, соответствующей выбранному растворителю.

Таблица 2.1.6.1.-2. – *Минимальное количество испытуемого продукта, используемое для каждой питательной среды*

Количество в упаковке	Минимальное количество, которое следует использовать для посева на каждую пиательную среду, при отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа
Жидкий – менее 1 мл – 1 – 40 мл – более 40 мл, но не более 100 мл – более 100 мл – для жидкостей, содержащих антибиотики	 Все содержимое каждой упаковки Половина содержимого каждой упаковки, но не менее 1 мл 20 мл 10 % содержимого упаковки, но не менее 20 мл 1 мл
Для нерастворимых препаратов, кремов и мазей, суспендируемых или эмульгируемых	Все содержимое каждой упаковки, составляющее не менее 200 мг
Твердый – менее 50 мг – 50 мг и более, но менее 300 мг – от 300 мг до 5 г – более 5 г	 Все содержимое каждой упаковки Половина содержимого каждой упаковки, но не менее 50 мг 150 мг 500 мг
Кетгут и другие хирургические шовные материалы для ветеринарного применения	3 отрезка нити (каждый длиной 30 см)

Масла и масляные растворы. Для каждой питательной среды используют количество испытуемого образца не менее указанного в таблице 2.1.6.1.-2. Масла и масляные растворы, обладающие достаточно низкой вязкостью, могут быть подвергнуты фильтрованию без разбавления через сухую мембрану. Вязкие масла могут быть, при необходимости, разбавлены подходящим стерильным растворителем, для которого подтверждено отсутствие антимикробного действия в условиях испытания, например, изопропилмиристатом. Дают маслу пропитать мембрану под действием собственной

тяжести, затем фильтруют, постепенно увеличивая давление или вакуум. Промывают мембрану не менее трех раз, фильтруя через нее каждый раз около 100 мл подходящего стерильного раствора, например, нейтрального раствора мясного или казеинового пептона с концентрацией 1 г/л, содержащего подходящий эмульгатор в концентрации, приемлемость которой была подтверждена в ходе проверки пригодности методики, например, полисорбат 80 в концентрации 10 г/л. Мембрану или мембраны переносят в питательную среду или среды (или наоборот) в соответствии с указаниями, приведенными выше для водных растворов, и инкубируют при таких же температурах в течение того же времени.

Мази и кремы. Для каждой питательной среды используют количество испытуемого продукта, не менее указанного в таблице 2.1.6.1.-2. Мази на жировой основе и водно-масляные эмульсии могут быть разбавлены до 1 % с помощью раствора изопропилмиристата, как описано выше, нагревая, при необходимости, до температуры, не превышающей 40 °С. В исключительных случаях может быть необходимо нагревание до температуры, не превышающей 44 °С. Фильтруют быстро, насколько возможно, и продолжают испытание в соответствии с указаниями, приведёнными выше для масел и масляных растворов.

ПРЯМОЙ ПОСЕВ

Количество испытуемого продукта, указанное в таблице 2.1.6.1.-2, помещают непосредственно в питательную среду. При этом объём продукта должен составлять не более 10 % объёма среды, если не указано иное. Если испытуемый продукт обладает антимикробным действием, испытания выполняют после его нейтрализации подходящим нейтрализующим агентом или путём разбавления в достаточном количестве питательной среды. При необходимости использования большого объёма испытуемого продукта предпочтительнее использовать концентрированную питательную среду, приготовленную с учётом последующего разбавления. При необходимости концентрированная питательная среда может быть добавлена непосредственно к испытуемому продукту в упаковку.

Масляные жидкости. Используют питательные среды с добавлением подходящего эмульгатора в концентрации, приемлемость которой была подтверждена в ходе проверки пригодности методики, например, полисорбата 80 с концентрацией 10 г/л.

Мази и кремы. Образец готовят разбавлением в соотношении около 1:10 путём эмульгирования с использованием выбранного эмульгатора в подходящем стерильном растворителе, например, растворе мясного или казеинового пептона с концентрацией 1 г/л. Разбавленный продукт переносят в питательную среду, не содержащую эмульгатора.

Инокулированную питательную среду инкубируют в течение не менее 14 дней, наблюдают несколько раз в течение периода инкубирования. Питательные среды, в которые были инокулированы масляные продукты, ежедневно осторожно встряхивают. Однако при использовании жидкой тиогликолевой среды для определения анаэробных микроорганизмов, необходимо свести к минимуму встряхивание или перемешивание для поддержания анаэробных условий.

Кетгут и другие хирургические шовные материалы для ветеринарного применения. Используют для каждой питательной среды количество продукта не менее указанного в Таблице 2.1.6.1.-2. Вскрывают герметичную упаковку, соблюдая асептические меры предосторожности и используют три отрезка нити для каждой питательной среды. Проводят испытание на трех отрезках, каждый длиной 30 см, отрезанных от начала, центра и конца нити. Используют целые нити из свежеоткрытых упаковок. Переносят каждый отрезок нити в выбранную питательную среду. Используют достаточное количество питательной среды, чтобы должным образом покрыть испытуемый материал (от 20 мл до 150 мл).

НАБЛЮДЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Время от времени в течение периода инкубации, а также по его завершении питательной среды оценивают на наличие макроскопических признаков роста микроорганизмов. Если внесение продукта приводит к помутнению питательной среды, вследствие чего наличие или отсутствие роста микроорганизмов не может быть определено визуально, через 14 дней после начала инкубации переносят порции питательной среды (каждая объёмом не менее 1 мл) в ёмкости, содержащие свежую аналогичную среду, и инкубируют исходные ёмкости и ёмкости с перенесёнными порциями не менее четырех дней.

Если признаков роста микроорганизмов не обнаруживают, испытуемый образец считают соответствующим требованиям испытания на стерильность. Если обнаруживают признаки роста микроорганизмов, испытуемый образец не соответствует требованиям испытания на стерильность, если не может быть убедительно доказано, что испытание невалидно по причинам, не связанным с испытуемым образцом. Испытание может быть признано невалидным только в случае выполнения одного или нескольких из следующих условий:

(a) данные микробиологического мониторинга помещений, в которых проводятся испытания на стерильность, указывают на наличие несоответствия помещений установленным требованиям;

(b) анализ выполнения методики выявил наличие несоответствия;

(c) в отрицательных контролях был обнаружен рост микроорганизмов;

(d) после идентификации микроорганизмов, выделенных в ходе испытания, рост этого вида или видов этих микроорганизмов может быть однозначно обусловлен ошибками, связанными с материалами и (или) методикой, использованных при проведении испытания на стерильность.

Если испытание признано невалидными, испытание повторяют, используя то же количество продукта, что и в первоначальном испытании.

Если в ходе повторного испытания признаков роста микроорганизмов не обнаруживают, продукт признают соответствующим требованиям испытания на стерильность. Если в ходе повторного испытания обнаруживают рост микроорганизмов, то продукт признают не соответствующим требованиями испытания на стерильность.

ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ И ДРУГИХ НЕИНЪЕКЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, КОТОРЫЕ ДОЛЖНЫ СООТВЕТСТВОВАТЬ ТРЕБОВАНИЯМ ИСПЫТАНИЯ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

При проведении испытания методом мембранной фильтрации используют по возможности всё содержимое упаковки, но не менее количеств, указанных в таблице 2.1.6.1.-2, при необходимости разбавляя его приблизительно до 100 мл подходящим стерильным раствором, например, нейтральным раствором мясного или казеинового пептона с концентрацией 1 г/л.

При проведении испытания методом прямого посева используют количества, указанные в таблице 2.1.6.1.-2, при отсутствии других указаний. Испытания на стерильность в отношении бактерий и грибов выполняют на одном и том же образце испытуемого продукта. В случаях, когда объём или количество, содержащиеся в упаковке, являются недостаточными для проведения испытаний, для посева на различные среды используют содержимое двух или более упаковок.

МИНИМАЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО ИСПЫТУЕМЫХ ЕДИНИЦ

Минимальное количество единиц, подлежащих испытанию в зависимости от размера серии, приведено в таблице 2.1.6.1.-3.

Таблица 2.1.6.1.-3. – *Минимальное количество испытуемых единиц*

Количество единиц в серии*	**Минимальное количество испытуемых единиц для каждой питательной среды, при отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа ****
Лекарственные препараты для парентерального применения	
Не более 100 упаковок	10% или 4 упаковки, в зависимости от того, какое из этих количеств является наибольшим
Более 100, но не более 500 упаковок	10 упаковок
Более 500 упаковок	2% или 20 упаковок (10 упаковок для парентеральных препаратов больших объёмов), в зависимости от того, какое из этих количеств является наименьшим
Лекарственные препараты для офтальмологического применения и другие неинъекционные лекарственные препараты	
Не более 200 упаковок	5 % или 2 упаковки, в зависимости от того, какое из этих количеств является наибольшим
Более 200 упаковок	10 упаковок
В случаях, когда лекарственный препарат выпускается в однодозовых упаковках, применяют приведенную выше схему для лекарственных препаратов для парентерального применения	-
Кетгут и другой хирургический шовный материал для ветеринарного применения	2 % или 5 упаковок, в зависимости от того, какое из этих количеств является наибольшим, но не более 20 упаковок
Готовый нерасфасованный продукт твердый (in bulk)	
Не более 4 упаковок	Каждую упаковку
Более 4, но не более 50 упаковок	20 % или 4 упаковки, в зависимости от того, какое из этих количеств является наибольшим
Более 50 упаковок	2 % или 10 упаковок, в зависимости от того, какое из этих количеств является наибольшим
** Если размер серии неизвестен, используют максимальное количество указанных единиц* *** Если содержимого одной упаковки достаточно для посева на две питательной среды, то в данной колонке дано количество упаковок, необходимое для обеих сред.*	

Рекомендации по проведению испытания на стерильность приведены в общей фармакопейной статье номер. Применение испытания на стерильность.