

2.1.6.6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НЕСТЕРИЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ: ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО МИКРООРГАНИЗМОВ

1. ВВЕДЕНИЕ

В общей фармакопейной статье приведены методы испытания, позволяющие проводить количественный подсчёт мезофильных бактерий и грибов, способных расти в аэробных условиях.

Испытания предназначены, прежде всего, для подтверждения соответствия фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ и лекарственных препаратов установленным критериям приемлемости микробиологического качества. При использовании в таких целях следуют указаниям, изложенным ниже, включая информацию о количестве образцов, отбираемых для испытания, и анализ полученных результатов.

Методы, представленные в данной общей фармакопейной статье, не применимы к лекарственным средствам, содержащим живые микроорганизмы в качестве действующего (активного) вещества.

Допустимо использование альтернативных микробиологических методик, включая автоматизированные, при условии подтверждения их эквивалентности фармакопейному методу.

2. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Испытания проводят в условиях, разработанных для предотвращения внешней микробной контаминации испытуемого образца. Меры предосторожности, предпринимаемые для предотвращения контаминации, не должны влиять ни на один из микроорганизмов, которые должны быть обнаружены в ходе испытания.

Если испытуемый продукт обладает антимикробным действием, оно должно быть устранено или нейтрализовано настолько, насколько это возможно. Если для этой цели используют инактиваторы, должна быть подтверждена их эффективность и отсутствие токсичности в отношении микроорганизмов.

Если для подготовки испытуемого образца используют поверхностно-активные вещества (ПАВ), должна быть подтверждена их совместимость с инактиваторами и отсутствие токсичности в отношении микроорганизмов.

3. МЕТОДЫ ПОДСЧЁТА

Используют метод мембранной фильтрации или чашечные методы, как указано.

Метод наиболее вероятных чисел (НВЧ) обычно является наименее точным методом подсчёта микроорганизмов, однако для определённых групп продуктов с очень низкой бионагрузкой данный метод может быть наиболее подходящим.

Выбор метода основывают на таких факторах, как совокупность основных характеристик продукта и требуемый предел содержания микроорганизмов. Выбранный метод должен обеспечивать проведение испытания на количестве образца, достаточном для оценки соответствия установленным критериям приемлемости микробиологического качества. Должна быть установлена пригодность выбранного метода.

4. ПРОВЕРКА *РОСТОВЫХ СВОЙСТВ* ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД (СПОСОБНОСТЬ ОБЕСПЕЧИВАТЬ РОСТ *МИКРООРГАНИЗМОВ*), ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ПРИГОДНОСТИ МЕТОДА ПОДСЧЁТА И ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ КОНТРОЛИ

4.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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.

4.2. 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.

Каждый тест-штамм бактерий или грибов выращивают отдельно, в соответствии с указаниями в таблице 2.1.6.6.-1.

Таблица 2.1.6.6.-1 – Подготовка и использование тест-штаммов микроорганизмов

Микроорганизм	Подготовка тест-штамма	Ростовые свойства		Пригодность метода подсчёта в присутствии продукта	
		Общее количество аэробных микроорганизмов	Общее количество дрожжей и грибов	Общее количество аэробных микроорганизмов	Общее количество дрожжей и грибов
<i>Staphylococcus aureus</i> такие, как	Соево-казеиновый агар или	Соево-казеиновый агар или	–	Соево-казеиновый агар /НВЧ	–

ATCC 6538 NCIMB 9518 CIP 4.83 NBRC 13276 *ГКПМ 201206*	соево- казеиновый бульон 30-35 °C 18-24 ч	соево- казеиновый бульон ≤ 100 КОЕ 30-35 °C ≤ 3 сут		соево- казеиновый бульон ≤ 100 КОЕ 30-35 °C ≤ 3 сут	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> такие, как ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275 *ГКПМ 190155*	Соево- казеиновый агар или соево- казеиновый бульон 30-35 °C 18-24 ч	Соево- казеиновый агар или соево- казеиновый бульон ≤ 100 КОЕ 30-35 °C ≤ 3 сут	–	Соево- казеиновый агар /НВЧ соево- казеиновый бульон ≤ 100 КОЕ 30-35 °C ≤ 3 сут	–
<i>Bacillus subtilis</i> такие, как ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134 *ГКПМ 010011*	Соево- казеиновый агар или соево- казеиновый бульон 30-35 °C 18-24 ч	Соево- казеиновый бульон или соево- казеиновый агар ≤ 100 КОЕ 30-35 °C ≤ 3 сут	–	Соево- казеиновый агар /НВЧ соево- казеиновый бульон ≤ 100 КОЕ 30-35 °C ≤ 3 сут	–
<i>Candida albicans</i> такие, как ATCC 10231 NCPF 3179 IP 48.72 NBRC 1594 *ГКПМ 303903*	Агар Сабуро с декстрозой или бульон Сабуро с декстрозой 20-25 °C 2-3 сут	Соево- казеиновый агар ≤ 100 КОЕ 30-35 °C ≤ 5 сут	Агар Сабуро с декстрозой ≤ 100 КОЕ 20-25 °C ≤ 5 сут	Соево- казеиновый агар ≤ 100 КОЕ 30-35 °C ≤ 5 сут НВЧ неприменим	Агар Сабуро с декстрозой ≤ 100 КОЕ 20-25 °C ≤ 5 сут
<i>Aspergillus brasiliensis</i> такие, как ATCC 16404 IMI 149007 IP 1431.83 NBRC 9455	Агар Сабуро с декстрозой или картофельн ый агар с декстрозой 20-25 °C 5-7 сут или до достижения хорошего спорообразо вания	Соево- казеиновый агар ≤ 100 КОЕ 30-35 °C ≤ 5 сут	Агар Сабуро с декстрозой ≤ 100 КОЕ 20-25 °C ≤ 5 сут	Соево- казеиновый агар ≤ 100 КОЕ 30-35 °C ≤ 5 сут НВЧ неприменим	Агар Сабуро с декстрозой ≤ 100 КОЕ 20-25 °C ≤ 5

Для приготовления суспензий тест-штаммов используют натрия хлорида и пептона забуференный раствор с рН 7,0 или фосфатный буферный раствор с рН 7,2; для суспендирования спор *A. brasiliensis* к буферному раствору можно добавить 0,05 %

полисорбат 80. Суспензии используют в течение двух часов или в течение 24 ч при условии хранения при температуре от 2 °С до 8 °С. В качестве альтернативы приготовлению и последующему разведению свежеприготовленной суспензии вегетативных клеток *A. brasiliensis* или *B. subtilis* готовят стабильную суспензию спор, затем для инокуляции используют подходящий объём суспензии спор. Стабильную суспензию спор можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение валидированного периода времени.

4.3. ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

Для проверки условий испытания проводят отрицательный контроль с использованием выбранного растворителя (разбавителя) вместо испытуемого образца. Рост микроорганизмов наблюдаться не должен. Отрицательный контроль проводят также при испытании продукта как описано в разделе 5 данной общей фармакопейной статьи. При неудовлетворительном отрицательном контроле проводят расследование.

4.4. ПРОВЕРКА РОСТОВЫХ СВОЙСТВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

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

Инокулируют ёмкости с порциями соево-казеинового бульона и чашки с соево-казеиновым агаром небольшим количеством (не более 100 КОЕ) микроорганизмов (таблица 2.1.6.6.-1), используя для каждого микроорганизма отдельную ёмкость и (или) чашку со средой. В чашки с агаром Сабуро с декстрозой инокулируют небольшое количество (не более 100 КОЕ) микроорганизмов (таблица 2.1.6.6.-1), используя для каждого из микроорганизмов отдельные чашки. Инкубируют в условиях, описанных в таблице 2.1.6.6.-1.

Для плотной среды количество выросших микроорганизмов не должно отличаться более чем в два раза от расчётного значения для инокулята стандартизированной суспензии. Для свежеприготовленного посевного материала должен наблюдаться рост микроорганизмов, сопоставимый с ростом, полученным на ранее проверенной и пригодной серии среды. Жидкая среда пригодна к использованию, если наблюдается чётко видимый рост микроорганизмов, сопоставимый с ростом, полученным на ранее проверенной и пригодной серии среды.

4.5. ПРИГОДНОСТЬ МЕТОДА ПОДСЧЁТА В ПРИСУТСТВИИ ПРОДУКТА

4.5.1. Подготовка образца

Метод подготовки образца зависит от физических характеристик испытуемого продукта. Если невозможно подтвердить пригодность ни одного из методов, описанных

ниже, должен быть разработан альтернативный метод.

Водорастворимые продукты. Растворяют или разбавляют (обычно готовят разведение 1:10) испытуемый продукт в натрия хлорида и пептона забуференном растворе с рН 7,0; фосфатном буферном растворе с рН 7,2 или соево-казеиновом бульоне. Если необходимо, доводят рН до значения 6–8. Если необходимо, готовят дальнейшие разведения с тем же растворителем (разбавителем).

Продукты, нерастворимые в воде и не содержащие жиры. Суспендируют (обычно готовят разведение 1:10) испытуемый продукт в натрия хлорида и пептона забуференном растворе с рН 7,0; фосфатном буферном растворе с рН 7,2 или соево-казеиновом бульоне. Для улучшения суспендирования плохо смачиваемых веществ может быть добавлено ПАВ, например, 1 г/л полисорбат 80. Если необходимо, доводят рН до значения 6–8. Если необходимо, готовят дальнейшие разведения с тем же растворителем (разбавителем).

Жиры. Испытуемый продукт растворяют в изопропилмиристате, стерилизованном методом фильтрации, или смешивают с минимально необходимым количеством стерильного полисорбата 80 или другого неингибирующего стерильного ПАВ, нагревая, при необходимости, до температуры не более 40 °С или, в исключительных случаях, до температуры не более 45 °С. Осторожно перемешивают и, если необходимо, поддерживают температуру на водяной бане. Прибавляют достаточное количество предварительно нагретого выбранного растворителя (разбавителя) так, чтобы получить разведение исходного продукта 1:10. Осторожно перемешивают, поддерживая температуру в течение минимального промежутка времени, необходимого для образования эмульсии. Может быть приготовлена серия последующих десятикратных разведений с использованием выбранного растворителя (разбавителя), содержащего соответствующую концентрацию стерильного полисорбата 80 или другого неингибирующего стерильного ПАВ.

Жидкости или твёрдые вещества в форме аэрозоля. Асептически переносят продукт или в аппарат для мембранной фильтрации, или в стерильную ёмкость для последующего взятия образца. Для испытаний используют либо все содержимое каждой испытуемой упаковки, либо определенное количество доз из каждой испытуемой упаковки.

Трансдермальные пластыри. С трансдермальных пластырей удаляют защитное покрытие и помещают в стерильные пластмассовые или стеклянные ёмкости клейкой поверхностью вверх. Клейкую поверхность накрывают стерильным пористым материалом, например, стерильной марлей, для предотвращения слипания пластырей друг с другом, и переносят пластыри в подходящий объём выбранного разбавителя, содержащего инактиваторы, такие как полисорбат 80 и (или) лецитин. Энергично встряхивают не менее 30 мин.

Плѐнки, диспергируемые в полости рта. Растворяют 10 плѐнок в натрия хлорида и пептона забуференном растворе с рН 7,0; фосфатном буферном растворе с рН 7,2 или соево-казеиновом бульоне, нагревая, при необходимости, до температуры не более 40 °С или, в исключительных случаях, до температуры не более 45 °С, со встряхиванием или без него, чтобы добиться растворения. Если необходимо, доводят рН до значения 6–8. Если необходимо, готовят дальнейшие разведения с тем же растворителем (разбавителем).

4.5.2. Инокуляция и разведение

К образцу, приготовленному, как описано в разделе 4.5.1 данной общей фармакопейной статьи, и к контрольному образцу (не содержащему испытуемый продукт) прибавляют достаточный объѐм суспензии микроорганизмов для получения инокулята, содержащего не более 100 КОЕ. Объѐм инокулята не должен превышать 1 % от объѐма разведенного продукта.

Для приемлемого извлечения микроорганизмов из продукта в испытании используют наименьшее разведение для приготовления образца. В случае, когда это невозможно из-за антимикробного действия или плохой растворимости, должны быть разработаны дополнительные соответствующие протоколы испытания. Если ингибирование роста микроорганизмов невозможно избежать другим способом, аликвота суспензии тест-штаммов микроорганизмов может быть добавлена после нейтрализации антимикробного действия, разведения или фильтрации.

4.5.3. Нейтрализация (устранение антимикробного действия)

Количество микроорганизмов, извлеченных в подготовленном образце, разведенном как описано в разделе 4.5.2 данной общей фармакопейной статьи и инкубированном в соответствии с методикой, представленной в разделе 4.5.4 данной общей фармакопейной статьи, сравнивают с количеством микроорганизмов, извлеченных в контрольном образце.

При ингибировании роста микроорганизмов (снижение более, чем в два раза), в данную методику вносят соответствующие изменения, чтобы обеспечить достоверность получаемых результатов. Изменения методики могут включать, например, (1) увеличение объѐма растворителя (разбавителя) или питательной среды, (2) введение в состав растворителя (разбавителя) специфических или неспецифических нейтрализующих веществ, (3) мембранную фильтрацию, (4) сочетание вышеописанных мер.

Нейтрализующие агенты. Для нейтрализации активности антимикробных веществ могут использоваться различные нейтрализующие агенты или методы (инактиватор) (таблица 2.1.6.6.-2). Они могут быть добавлены к выбранному растворителю (разбавителю) или внесены в питательную среду, предпочтительно до стерилизации. Если используют такие инактиваторы, их эффективность и отсутствие токсичности для микроорганизмов

должны быть доказаны проведением контрольного испытания с инактиватором в отсутствие испытуемого продукта.

Таблица 2.1.6.6.-2 – Методы нейтрализации мешающих веществ

Мешающие вещества	Нейтрализующие методы
Глутаровый альдегид; ртутьсодержащие соединения	Гидросульфит натрия (бисульфит натрия)
Фенольные соединения, спирты, альдегиды, сорбат	Разведение
Альдегиды	Глицин
Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), <i>пара</i> -гидроксибензоаты (парабены), бисбигуаниды	Лецитин
ЧАС, йодсодержащие соединения, парабены	Полисорбат
Ртутьсодержащие соединения	Тиогликолят
Ртутьсодержащие соединения, галогены, альдегиды	Тиосульфат
Соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА)	Ионы Mg ²⁺ или Ca ²⁺

Если подходящий метод нейтрализации не был найден, можно предположить, что невозможность выявить инокулированные микроорганизмы обусловлена антимикробным действием продукта. Указанные данные будут свидетельствовать о низкой вероятности контаминации продукта этими видами микроорганизмов. Однако существует возможность, что продукт ингибирует рост только некоторых из описанных в настоящем разделе микроорганизмов, и не обладает антимикробным действием в отношении других видов, не входящих в перечень указанных тест-микроорганизмов или для которых последние не репрезентативны. В этом случае испытание проводят с использованием наибольшего разведения, совместимого с ростом микроорганизмов и обоснованными критериями приемлемости.

4.5.4. Извлечение микроорганизмов в присутствии продукта

Для каждого из перечисленных тест-штаммов микроорганизмов проводят отдельное испытание. Подсчитывают только микроорганизмы добавленного тест-штамма.

4.5.4.1. Мембранная фильтрация

Используют мембранные фильтры с номинальным размером пор, не превышающим 0,45 мкм. Тип фильтрующего материала выбирают таким образом, чтобы компоненты испытуемого образца не влияли на эффективность удерживания бактерий. Для каждого из перечисленных микроорганизмов используют один мембранный фильтр.

Подходящее количество испытуемого образца, подготовленного согласно описанию в разделах 4.5.1 – 4.5.3 данной общей фармакопейной статьи (предпочтительно

соответствующего 1 г продукта, или меньшему количеству, если ожидается наличие большого количества КОЕ), наносят на мембранный фильтр, немедленно фильтруют и промывают подходящим объёмом растворителя (разбавителя). Для определения общего количества аэробных микроорганизмов (ОКАМ) мембранный фильтр переносят на поверхность соево-казеинового агара. Для определения общего количества дрожжевых и плесневых грибов (ОКГ) мембранный фильтр переносят на поверхность агара Сабуро с декстрозой и инкубируют, как указано в таблице 2.1.6.6.- 1. Проводят подсчёт.

4.5.4.2. Чашечные методы

Чашечный подсчет выполняют не менее чем в двух повторностях для каждой питательной среды и используют среднее значение результата.

4.5.4.2.1. Метод глубинного посева

При использовании чашек Петри диаметром 9 см в каждую чашку помещают 1 мл образца, подготовленного согласно описанию в разделах 4.5.1 – 4.5.3 данной общей фармакопейной статьи, и от 15 мл до 20 мл соево-казеинового агара или агара Сабуро с декстрозой, температура обеих сред не должна превышать 45 °С. Если используют чашки Петри большего размера, то пропорционально увеличивают количество питательной среды. Для каждого из микроорганизмов, перечисленных в таблице 2.1.6.6.- 1, используют не менее двух чашек Петри. Чашки инкубируют в соответствии с условиями, указанными в таблице 2.1.6.6.-1. Вычисляют среднее арифметическое значение количества колоний на каждой питательной среде и рассчитывают количество КОЕ в исходном посевном материале.

4.5.4.2.2. Метод поверхностного посева

Используют чашки Петри диаметром 9 см. В каждую чашку помещают от 15 мл до 20 мл соево-казеинового агара или агара Сабуро с декстрозой при температуре около 45 °С, и дают среде застыть. Если используют чашки Петри большего диаметра, то пропорционально увеличивают количество питательной среды. Чашки сушат, например, в ламинарном шкафу или в инкубаторе. Для каждого из микроорганизмов, перечисленных в таблице 2.1.6.6.-1, используют не менее двух чашек Петри. Распределяют не менее 0,1 мл образца, подготовленного как описано в разделах 4.5.1 – 4.5.3 данной общей фармакопейной статьи, по поверхности среды. Инкубируют и проводят подсчёт количества КОЕ, как описано в разделе 4.5.4.2.1 данной общей фармакопейной статьи.

4.5.4.3. Метод наиболее вероятных чисел

Метод наиболее вероятных чисел уступает по прецизионности и точности методам мембранной фильтрации и чашечного подсчёта. Метод дает недостоверные результаты, в частности, при подсчете плесневых грибов. Метод НВЧ применяют для подсчёта общего

количества аэробных бактерий только в тех случаях, когда другие методы неприменимы. Если использование метода обосновано, испытание проводят следующим образом.

Готовят серию из не менее трёх последовательных десятикратных разведений образца, подготовленного как описано в разделах 4.5.1 – 4.5.3 данной общей фармакопейной статьи. Для каждого разведения используют по три аликвоты по 1 г или по 1 мл для посева в три пробирки, содержащих от 9 мл до 10 мл соево-казеинового бульона. При необходимости, к питательной среде может быть добавлено ПАВ, такое как полисорбат 80, или инактиватор мешающих веществ. Таким образом, при использовании трёх степеней разведения, посев проводят в девять пробирок. Все пробирки инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение не более трёх дней. Если подсчет результатов затруднен или неоднозначен из-за свойств испытуемого продукта, производят пересев на ту же жидкую среду или на соево-казеиновый агар, инкубируют при той же температуре в течение от одного до двух дней и полученные результаты используют для подсчёта. Наиболее вероятное количество микроорганизмов в грамме или миллилитре испытуемого продукта определяют в соответствии с таблицей 2.1.6.6. -3.

Таблица 2.1.6.6.-3 – Наиболее вероятное количество микроорганизмов

Количество пробирок в каждом ряду, в которых наблюдают рост			Наиболее вероятное количество в 1 г (мл) продукта	95% доверительный интервал
Количество продукта в пробирке, г (мл)				
0,1	0,01	0,001		
0	0	0	менее 3	0 – 9,4
0	0	1	3	0,1 – 9,5
0	1	0	3	0,1 – 10
0	1	1	6,1	1,2 – 17
0	2	0	6,2	1,2 – 17
0	3	0	9,4	3,5 – 35
1	0	0	3,6	0,2 – 17
1	0	1	7,2	1,2 – 17
1	0	2	11	4 – 35
1	1	0	7,4	1,3 – 20
1	1	1	11	4 – 35
1	2	0	11	4 – 35
1	2	1	15	5 – 38
1	3	0	16	5 – 38
2	0	0	9,2	1,5 – 35
2	0	1	14	4 – 35
2	0	2	20	5 – 38
2	1	0	15	4 – 38
2	1	1	20	5 – 38
2	1	2	27	9 – 94

2	2	0	21	5 – 40
2	2	1	28	9 – 94
2	2	2	35	9 – 94
2	3	0	29	9 – 94
2	3	1	36	9 – 94
3	0	0	23	5 – 94
3	0	1	38	9 – 104
3	0	2	64	16 – 181
3	1	0	43	9 – 181
3	1	1	75	17 – 199
3	1	2	120	30 – 360
3	1	3	160	30 – 380
3	2	0	93	18 – 360
3	2	1	150	30 – 380
3	2	2	210	30 – 400
3	2	3	290	90 – 990
3	3	0	240	40 – 990
3	3	1	460	90 – 1980
3	3	2	1100	200 – 4000
3	3	3	более 1100	–

4.6. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

При проверке пригодности метода мембранной фильтрации или чашечного метода количество колоний любого тест-штамма микроорганизма, полученное в испытании, не должно отличаться более, чем в 2 раза от количества микроорганизмов, полученных при испытании контроля, проведенного как описано в разделе 4.5.2 данной общей фармакопейной статьи при отсутствии продукта. При проверке пригодности метода НВЧ рассчитанное значение количества колоний для инокулята должно находиться в пределах 95 % доверительного интервала результатов, полученных в контроле.

Если перечисленные выше критерии не могут быть выполнены для одного или более микроорганизмов в любом из описанных методов, для испытания продукта используют метод и условия испытания, которые наиболее близки к критериям.

5. ИСПЫТАНИЕ ПРОДУКТОВ

5.1. КОЛИЧЕСТВО ПРОДУКТА, ИСПОЛЬЗУЕМОЕ В ИСПЫТАНИЯХ

При отсутствии других указаний для испытаний используют 10 г или 10 мл испытуемого продукта, отобранного с соблюдением мер предосторожности, указанных выше. Для жидкостей или твёрдых веществ в форме аэрозоля отбирают 10 первичных упаковок. Для трансдермальных пластырей отбирают 10 пластырей. Для плёнок,

диспергируемых в полости рта отбирают 10 плёнок.

Количество, используемое в испытании, может быть сокращено для активной фармацевтической субстанции, которая будет включена в состав лекарственной формы, при следующих условиях: количество действующего (активного) вещества в дозированной единице (например, таблетке, капсуле, лекарственной форме для инъекций) составляет не более 1 мг или количество на грамм или миллилитр (для лекарственных препаратов, не представленных в виде дозированных единиц) составляет менее 1 мг. В этих случаях в испытании используют образец в количестве не менее, чем содержится в десяти дозированных единицах, или 10 г, или 10 мл продукта.

Для активной фармацевтической субстанции в случае, когда количество образца для испытаний ограничено или размер серии крайне мал (то есть менее 1000 мл или 1000 г), количество для испытаний должно составлять 1 % от серии в случае, если меньшее количество не указано или не обосновано и не разрешено.

Если общее количество единиц продукта в серии составляет менее 200 (например, образцы, используемые в клинических испытаниях), размер выборки может быть уменьшен до двух единиц или до одной единицы, если размер серии составляет менее 100. Образец(-цы) отбирают случайным образом из готового нерасфасованного продукта или из имеющихся упаковок лекарственного препарата. Для получения необходимого количества образца перемешивают содержимое достаточного количества первичных упаковок.

5.2. ИСПЫТАНИЕ ПРОДУКТА

5.2.1. Мембранная фильтрация

Используют установку для мембранной фильтрации, конструкция которой обеспечивает возможность переноса фильтра в питательную среду. Проводят подготовку образца как описано разделе 4 данной общей фармакопейной статьи с использованием методики, пригодность которой была подтверждена, переносят соответствующее количество на каждый из двух мембранных фильтров и немедленно фильтруют. Промывают каждый фильтр с использованием процедуры, пригодность которой была подтверждена.

Для определения общего количества аэробных микроорганизмов один мембранный фильтр переносят на поверхность соево-казеинового агара. Для определения общего количества дрожжевых и плесневых грибов другой мембранный фильтр переносят на агар Сабуро с декстрозой. Чашки с соево-казеиновым агаром инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение от трех суток до пяти суток, чашки с агаром Сабуро с декстрозой инкубируют при температуре от 20 °С до 25°С в течение от пяти суток до семи

суток. Вычисляют количество КОЕ на грамм или миллилитр продукта.

При испытании трансдермальных пластырей или плёнок, диспергируемых в полости рта, фильтруют 10 % объёма образца, подготовленного как описано в разделе 4.5.1 данной общей фармакопейной статьи, через каждую из двух стерильных фильтрующих мембран отдельно. Одну мембрану переносят на соево-казеиновый агар для подсчёта общего количества аэробных микроорганизмов, другую – на агар Сабуро с декстрозой для подсчёта общего количества дрожжевых и плесневых грибов.

5.2.2. Чашечные методы

5.2.2.1. Метод глубинного посева. Проводят подготовку образца как описано разделе 4 данной общей фармакопейной статьи с использованием методики, пригодность которой была подтверждена. Для каждой среды используют не менее двух чашек Петри для каждого из разведений. Чашки с соево-казеиновым агаром инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение от трех суток до пяти суток, чашки с агаром Сабуро с декстрозой инкубируют при температуре от 20 °С до 25 °С в течение от пяти суток до семи суток. Выбирают чашки, соответствующие определенному разведению и содержащие наибольшее количество колоний, но менее 250 для общего количества аэробных микроорганизмов и менее 50 для общего количества дрожжевых и плесневых грибов. Определяют среднее арифметическое значение подсчитанных колоний на питательной среде и вычисляют количество КОЕ на грамм или миллилитр продукта.

5.2.2.2. Метод поверхностного посева. Проводят подготовку образца как описано разделе 4 данной общей фармакопейной статьи с использованием методики, пригодность которой была подтверждена. Для каждой среды используют не менее двух чашек Петри для каждого из разведений. Инкубируют и вычисляют количество КОЕ, согласно указаниям, приведенным для метода глубинного посева.

5.2.3. Метод наиболее вероятных чисел

Проводят подготовку образца как описано разделе 4 данной общей фармакопейной статьи с использованием методики, пригодность которой была подтверждена. Все пробирки инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение от трех суток до пяти суток. При необходимости проводят пересев, используя процедуру, пригодность которой была подтверждена. Для каждого из разведений подсчитывают количество пробирок, в

которых обнаружен рост микроорганизмов. Определяют наиболее вероятное количество микроорганизмов на грамм или миллилитр испытуемого продукта (таблица 2.1.6.6. - 3).

5.3. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Общее количество аэробных микроорганизмов считают равным количеству КОЕ, обнаруженных на соево-казеиновом агаре; если на этой среде обнаруживают колонии грибов, их подсчитывают, как часть общего количества аэробных микроорганизмов. Общее количество дрожжевых и плесневых грибов считают равным количеству КОЕ на агаре Сабуро с декстрозой; если на этой среде обнаруживают колонии бактерий, их подсчитывают, как часть общего количества дрожжей и плесневых грибов. В случае превышения критерия приемлемости из-за роста бактерий может быть использован агар Сабуро с декстрозой, содержащий антибиотики. Если подсчёт выполнен методом НВЧ, то рассчитанное значение представляет собой общее количество аэробных микроорганизмов.

Критерии приемлемости микробиологического качества интерпретируют следующим образом:

- 10^1 КОЕ: максимально допустимое количество = 20;
- 10^2 КОЕ: максимально допустимое количество = 200;
- 10^3 КОЕ: максимально допустимое количество = 2000 и т.д.

Рекомендуемые растворы и питательные среды приведены в общей фармакопейной статье 2.1.6.7.