

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящей общей фармакопейной статье приведены подходы к использованию биологических индикаторов, предназначенных для оценки эффективности процесса финишной стерилизации и процессов стерилизации упаковки и предметов, вступающих в непосредственный контакт со стерильной промежуточной продукцией, активной фармацевтической субстанцией, нерасфасованной продукцией (далее – продуктом).

Настоящая общая фармакопейная статья не распространяется на использование биологических индикаторов для валидации процесса стерилизации иных объектов, не вступающих в непосредственный контакт со стерильным продуктом.

Биологические индикаторы – системы, содержащие жизнеспособные тест-микробы (обычно споры бактерий), которые обеспечивают проверку требуемой эффективности процесса стерилизации.

Биологические индикаторы предназначены для разработки и валидации процессов стерилизации. Данные индикаторы не предназначены для рутинного мониторинга, если иное не указано в настоящей общей фармакопейной статье.

Биологические индикаторы промышленного производства обычно содержат стандартизованную стабильную популяцию спор подходящих бактерий, полученных из четко охарактеризованного и надлежащим образом поддерживаемого штамма спорообразующих бактерий. Бактериальные споры являются устойчивыми формами жизнеспособных микроорганизмов, которые можно производить и стандартизировать, а также можно хранить длительный период времени при соблюдении соответствующих условий.

Эффективность стерилизации и пригодность биологических индикаторов можно подтвердить с помощью сокращенного цикла стерилизации, при проведении которого небольшая часть тест-микробов в биологическом индикаторе способна выжить. При этом использование полного валидированного цикла стерилизации будет приводить к гибели жизнеспособных микроорганизмов (см. раздел 4.1.2).

2. ТИПЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ ПРОЦЕССОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ

В зависимости от характера процесса стерилизации, могут использоваться разные типы биологических индикаторов:

- носители, инокулированные тест-микробами;
- автономные биологические индикаторы;

– предметы или продукты, инокулированные тест-микроорганизмами.

Перед использованием биологического индикатора пользователь должен удостовериться, что характеристики биологического индикатора отвечают установленным требованиям. С этой целью пользователь должен убедиться, что производство биологического индикатора осуществляется в рамках соответствующей системы обеспечения качества (например, посредством аудита) или проверить характеристики биологического индикатора самостоятельно или в независимой контрактной лаборатории (см. раздел 2.3).

2.1. Носитель, инокулированный тест-микроорганизмами – представляет собой носитель (удерживающий материал, например, полоска фильтровальной бумаги, стеклянная пластинка, полимерная пробирка), инокулированный определенной популяцией бактериальных спор. Этот вид биологического индикатора в большинстве случаев находится в защитной оболочке. После стерилизации носитель асептически переносят в подходящую питательную среду и инкубируют в течение достаточного периода времени при соответствующей температуре.

Тип носителя (оболочка, если используется) может влиять на устойчивость бактериальных спор и должен быть совместим с выбранным процессом стерилизации (например, полоски фильтровальной бумаги в оболочке из подходящей бумаги часто используют для стерилизации паром и этиленоксидом, в то время как металлические диски, упакованные в нетканый материал, для стерилизации парами водорода пероксида).

2.2. Автономные биологические индикаторы – представляют собой, например:

– систему, состоящую из инокулированного тест-микроорганизмом носителя и контейнера (например, ампулы) с питательной средой, подходящей для используемого тест-микроорганизма. Система спроектирована таким образом, что стерилизующий агент вступает в контакт с носителем, содержащим инокулированные тест-микроорганизмы (например, через фильтр), а процесс стерилизации не оказывает неблагоприятного воздействия на ростовые свойства питательной среды. После стерилизации носитель приводят в контакт с питательной средой простыми манипуляциями. Данный тип биологических индикаторов может использоваться для оценки процессов стерилизации влажным паром, включая подтверждение проникновения пара в систему;

– контейнер (например, ампулу), содержащую популяцию тест-микроорганизма в подходящей питательной среде. После стерилизации

контейнер инкубируют без дальнейших манипуляций. Данный тип биологического индикатора чувствителен только ко времени воздействия и температуре и может использоваться главным образом для контроля стерилизации водных жидкостей. Для удобства и упрощения обнаружения роста тест-микроорганизмов, среда может содержать индикатор (например, рН-индикатор).

Автономные биологические индикаторы могут не подходить для валидации определенных процессов стерилизации.

2.3. Предметы или продукты, инокулированные тест-микроорганизмами – представляют собой предметы (например, резиновые пробки) или продукты, на или в которые инокулированы подходящие тест-микроорганизмы (например, родов *Bacillus* или *Clostridium*), в тех случаях, когда для оценки эффективности стерилизации отсутствуют биологические индикаторы промышленного производства. В этом случае пользователь может приготовить биологический индикатор, представляющий собой хорошо охарактеризованную суспензию спор, инокулированную на предмет или в продукт, подлежащие стерилизации.

Как правило, тест-микроорганизмы инокулируют на или в предмет (продукт) в виде стандартизованной суспензии спор промышленного производства или в виде охарактеризованной суспензии спор, приготовленной из изолятов, полученных в процессе мониторинга окружающей среды или других микробиологических испытаний с четко определенной процедурой, обеспечивающей удовлетворительное спорообразование.

Для суспензий спор должны быть определены значение величины D (время для уменьшения количества тест-микроорганизмов в 10 раз (на 90 %) в указанных условиях) и, при необходимости, значение величины z . Также значения величины D и величины z (если необходимо) спор должны определяться для тест-предметов или продуктов, инокулированных тест-микроорганизмами, поскольку они могут отличаться от значений для спор в суспензии (см. раздел 4.1).

По окончании цикла стерилизации биологический индикатор проверяют на наличие или отсутствие живых тест-микроорганизмов или проводят подсчет живых тест-микроорганизмов с использованием подходящего валидированного микробиологического метода.

3. ТРЕБОВАНИЯ К КАЧЕСТВУ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРОВ

При поставке каждой серии биологического индикатора пользователю должна быть представлена следующая информация:

– род и виды тест-микроорганизмов (включая номер коллекции типовых культур, где это применимо);

- уникальный номер, по которому может быть восстановлена история изготовления (например, номер серии);
- количество жизнеспособных спор, выраженное с точностью до одного десятичного знака десятичного логарифма;
- используемый метод восстановления;
- тип носителя;
- тип первичной упаковки (например, оболочка);
- состав среды для восстановления, если необходимо (например, в случае автономных биологических индикаторов);
- тип индикатора роста (например, индикатор pH), если это необходимо;
- тип процесса стерилизации и условия, для которых был охарактеризован биологический индикатор;
- устойчивость (величина D) для серии готового биологического индикатора к указанным процессам стерилизации в течение всего отмеченного срока годности; значение величины D должно быть указано в применимых единицах (например, время или доза) и выражаться с точностью до одного десятичного знака и с 95 % доверительным интервалом, если это возможно;
- метод (метод кинетики летальности или метод фракционного негативного анализа), используемый для определения устойчивости (значения величины D); параметры для проверки, например, условия воздействия, количество повторных испытаний, среда и условия инкубации, используемые для восстановления после воздействия и т.д.;
- значение величины z (где применимо) для биологического индикатора, выраженное в единицах температуры с точностью до одного десятичного знака, включая диапазон температур, используемый для определения величины z ;
- условия хранения и дата истечения срока годности.

3.1. Спецификация пользователя

Выбор биологического индикатора зависит от особенностей процесса стерилизации (влажный пар, сухой жар, газ или ионизирующее излучение). Выбор заключается в подборе штамма тест-микроорганизмов, типа биологического индикатора, значения величины D и начального количества спор. Кроме того, испытываемый штамм должен быть более устойчив к конкретному методу стерилизации, чем микроорганизмы, потенциально контаминирующие продукт.

3.2. Контроль качества

Контроль качества биологических индикаторов заключается в проверке на чистоту и подлинность и в оценке количества жизнеспособных клеток. Биологический индикатор должен соответствовать спецификациям пользователя. Пользователи,

использующие биологические индикаторы вне рекомендаций производителя, должны тщательно подбирать их по параметрам для конкретного процесса стерилизации.

Чистота

Исследование тест-микроорганизмов на подходящей питательной среде, инкубированной в соответствующих условиях, не должно выявлять никаких признаков загрязнения посторонними микроорганизмами.

Идентификация

При необходимости проверяют морфологию колоний и однородность популяции.

Количество жизнеспособных микроорганизмов

Подсчет жизнеспособных микроорганизмов производят в соответствии с инструкциями производителя или любым другим валидированным методом.

3.3. Пригодность

Пользователь должен убедиться, что биологический индикатор инактивирован до ожидаемой степени выживаемости микроорганизмов в конкретном диапазоне условий стерилизации.

4. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССОВ ТЕРМИЧЕСКОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

4.1. ПАРАМЕТРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ ТЕРМИЧЕСКОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

4.1.1. Величина z

Процессы стерилизации можно проводить при температурах ниже стандартных 121 °C (при более длительном времени воздействия) или при более высоких температурах (при более коротком времени воздействия). Величина z (разность температур, которая приводит к 10-кратному изменению значения величины D биологического индикатора) используется при сравнении эффективности двух циклов, работающих при разных температурах. Для определения величины z значение величины D должно быть определено при трех или более значениях температуры. Предполагаемая температура процесса должна быть в пределах диапазона трех значений температур. Строят кривую зависимости десятичного логарифма значения величины D от температуры, выраженной в градусах Цельсия. Величина z равна отрицательной обратной величине наклона построенной кривой, определенной с помощью регрессионного анализа.

4.1.2. Установление параметров цикла стерилизации при валидации

Характеристики процесса стерилизации (например, комбинация

времени и температуры, требуемый уровень обеспечения стерильности или требуемая величина F_0) являются основой для выбора биологического индикатора (тип биологического индикатора, тест-микроорганизм и начальное количество жизнеспособных тест-микроорганизмов).

Инактивация тест-микроорганизмов в условиях стерилизации может быть описана кинетикой летальности с учетом статистических вероятностей. Для ряда единиц биологических индикаторов с исходной популяцией тест-микроорганизмов на единицу N_0 и заданным значением величины D рассчитывают время выживания и время гибели. Время выживания – время воздействия в минутах, по истечении которого во всех единицах биологического индикатора ожидаемо присутствие выживших тест-микроорганизмов (в среднем 100 выживших спор на единицу биологического индикатора), рассчитывают по уравнению (1):

$$t_s = D \cdot (\lg N_0 - 2), \quad (1)$$

где: t_s – время выживания, в минутах.

Время гибели – время воздействия в минутах, в течение которого все единицы биологического индикатора ожидаемо должны быть инактивированы (в среднем 10^{-4} выживших спор на единицу биологического индикатора), рассчитывают по уравнению (2):

$$t_k = D \cdot (\lg N_0 + 4), \quad (2)$$

где: t_k – время гибели, в минутах.

Целью валидации является подтверждение эффективности стерилизации, ожидаемой от физических параметров процесса, эквивалентной биологической эффективности стерилизации. С этой целью время экспозиции при валидации t_{v1} не должно превышать t_k . Если выбрано слишком высокое значение t_{v1} , даже относительно большое увеличение значения величины D приводит к появлению единиц биологического индикатора без выживших тест-микроорганизмов. В данном случае неоптимальные условия стерилизации не будут обнаружены. Считается целесообразным выбрать t_{v1} не выше требуемого, чтобы ожидать 1 из 1000 единиц биологических индикаторов с выжившими тест-микроорганизмами. Однако, не должен быть выбран слишком короткий t_{v1} . Если выбрать t_{v1} таким образом, что 50 % единиц биологического индикатора будут содержать выжившие тест-микроорганизмы, изменения в условиях стерилизации (например, время, температура) все еще могут привести к тому, что 100 % единиц биологического индикатора будут содержать выжившие тест-микроорганизмы, и испытание будет недействительным. По этим

причинам t_{v1} выбирают таким образом, чтобы ожидаемая теоретическая выживаемость тест-микробов находилась между 10^{-1} и 10^{-3} , и рассчитывают следующим образом (3):

$$D \cdot (\lg N_0 + 1) \leq t_{v1} \leq D \cdot (\lg N_0 + 3). \quad (3)$$

В целом, биологические индикаторы подвергаются предполагаемому процессу стерилизации, но для процессов стерилизации с избыточно высокой эффективностью расчетная эффективность цикла может быть такой, что t_k окажется превышен с большим запасом. В таких случаях валидация проводится с сокращенными циклами стерилизации. Такие сокращенные циклы могут быть короче во времени (например, полупериод) или проводиться при более низкой температуре. В последнем случае значения величины z для тест-микроба при фактических условиях стерилизации должны быть известны. Сокращенный цикл выбирают так, чтобы температура была не более чем на одно значение величины z ниже контрольной температуры процесса стерилизации. Биологические индикаторы соответствующей устойчивости для этого цикла показывают ожидаемую выживаемость тест-микробов в диапазоне между нижним t_{v1} и t_k (см. уравнение (3)). Решение не проводить данное испытание должно быть обоснованным.

В зависимости от значения величины D тест-микроба и выбранного t_{v1} , в биологических индикаторах содержание выживших тест-микробов можно ожидать с низкой частотой (не более 1 из 10). Если подтверждается, что частота биологических индикаторов, содержащих выжившие тест-микробы, находится в пределах ожидаемого диапазона и не связана с неподходящими условиями стерилизации, процесс может быть одобрен.

При валидации полного цикла стерилизации все биологические индикаторы должны быть инактивированы, тем самым доказывая снижение количества тест-микробов не менее чем в 10^6 раз. Тогда, исходя из устойчивости используемых спор, можно сделать вывод, что процесс обеспечил достаточную летальность для достижения требуемого уровня обеспечения стерильности.

4.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССА ПАРОВОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ (АВТОКЛАВИРОВАНИЯ)

Для оценки процесса паровой стерилизации наиболее широко используемыми биологическими индикаторными тест-микробами являются *Geobacillus stearothermophilus*. Указанные значения величины $D_{121^\circ\text{C}}$ для спор, в зависимости от условий споруляции, материала носителя, на который инокулированы споры, первичной упаковки,

окружающей носитель с инокулированными спорами, и окружающей среды во время стерилизации находятся, как правило, в диапазоне от 1,5 мин до 4,5 мин.

Штаммы *ATCC 7953*, *NCTC 10007*, *CIP 52.81*, *NCIMB 8157* и *ATCC 12980* (эквивалент *NRRL B-4419*) являются подходящими. Могут быть использованы другие штаммы, если подтверждена эквивалентность их характеристик. Доказано, что популяция *Geobacillus stearothermophilus* в количестве 10^5 или 10^6 может не подходить для процессов стерилизации при значении F_0 между 8 и 15, поэтому может быть использовано меньшее число спор (10^3 или 10^4) или другие тест-микроорганизмы. Если используют тест-микроорганизмы, отличные от *Geobacillus stearothermophilus* (например, *Bacillus subtilis ATCC 35021*), чтобы гарантировать их пригодность для процесса, оценивают их устойчивость.

4.3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССА СУХОЖАРОВОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Для оценки процессов стерилизации сухим жаром, проводимых при температурах от 160 °С до 180 °С подходят споры *Bacillus atrophaeus* (например, *ATCC 9372*, *NCIMB 8058*, *NRRL B-4418* или *CIP 77.18*). Если используют тест-микроорганизмы, отличные от *Bacillus atrophaeus*, для подтверждения их пригодности оценивают их устойчивость к процессу стерилизации, как описано в разделе 4.1.2.

Как правило, биологические индикаторы, пригодные для стерилизации сухим жаром, имеют значение величины $D_{160\text{ °C}}$ в диапазоне от 1 до 5 мин. При воздействии стандартного цикла продолжительностью 2 ч при температуре 160 °С биологический индикатор со значением величины $D_{160\text{ °C}}$ равным 2,5 мин будет инактивирован на 48 по шкале десятичного логарифма. Для процессов стерилизации сухим жаром при расчетах эквивалентности эффективности цикла (F_N -расчеты) обычно значение величины z принимается около 20 °С. F_N – это эквивалентное время в минутах при температуре 160 °С, достигаемой в продукте при его стерилизации в первичной упаковке. Для биологического индикатора со значением величины $D_{160\text{ °C}}$, равным 5 мин, значение величины $D_{150\text{ °C}}$ будет около 16 мин, инактивация в контрольном цикле составит 7,5 по шкале десятичного логарифма. Использование процесса стерилизации при температуре, сниженной на 10 °С по сравнению с заданной температурой, может выдать ожидаемую 1 из 30 единиц биологических индикаторов, имеющих выжившие тест-микроорганизмы.

5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССА СТЕРИЛИЗАЦИИ ГАЗОМ (ПАРОФАЗНОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ)

Использование биологических индикаторов необходимо для

разработки, валидации и мониторинга всех процессов газовой стерилизации. Газовая стерилизация является многофакторным процессом, где концентрация газа, влажность, температура, время и характеристики поверхности взаимодействуют сложным образом. В настоящее время в процессе газовой стерилизации используют этиленоксид, водорода пероксид и надуксусную кислоту или их комбинации.

Обеззараживание поверхности газом широко используют для медицинских приборов, изоляторов, камер и т.д. Использование биологических индикаторов для данных целей не рассматривается в рамках Фармакопеи, но информация настоящей общей фармакопейной статьи, может пригодиться при валидации процессов дезинфекции.

Для стерилизации этиленоксидом рекомендуется использование спор *Bacillus atrophaeus* (например, ATCC 9372, NCIMB 8058, NRRL B-4418 или CIP 77.18). Могут быть использованы другие штаммы, если подтверждена эквивалентность их характеристик. Количество жизнеспособных спор должно быть больше или равно 10^6 на носитель. Тест-микроорганизмы должны иметь величину D , соответствующую процессу валидации. Данные биологические индикаторы обычно используют рутинно в каждом цикле стерилизации, что позволяет контролировать эффективность процесса.

Для процессов с испарением водорода пероксида подходит *Geobacillus stearothermophilus*.

Пользователь несет ответственность за установленные условия цикла стерилизации и пригодности любого используемого биологического индикатора.

6. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССА РАДИАЦИОННОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Для проверки стерилизующей дозы при радиационной стерилизации, нет необходимости использования биологических индикаторов, если не указано иное. Однако, использование биологических индикаторов может потребоваться для разработки и валидации процесса стерилизации ионизирующим излучением некоторых продуктов, например, содержащих клетки или ткани или продуктов, которые потенциально могут обеспечить защиту для спор. Рекомендуются к использованию споры *Bacillus pumilus* (например, ATCC 27142, NCTC 10327, NCIMB 10692 или CIP 77.25). Могут быть использованы другие штаммы, если подтверждена эквивалентность их характеристик.

7. ВЫБОР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ ПРОЦЕССА СТЕРИЛИЗАЦИИ

Кроме физических параметров стерилизации, описанных в общей фармакопейной статье *Методы обеспечения стерильности продуктов*, эффективность процесса стерилизации зависит от большого числа переменных, например, от количества и устойчивости контаминирующих микроорганизмов, проникновения стерилизующего агента, времени, температуры, концентрации, рН, содержания влаги и химического состава стерилизуемого продукта.

Для валидации процесса стерилизации выбирают физические условия, при которых ожидают достижения уровня обеспечения стерильности, равного или меньшего 10^{-6} , как описано в общей фармакопейной статье *Методы обеспечения стерильности продуктов*. В процессе проверки физических условий подтверждают, что эти условия однородно достигаются для всех частей и положений загрузки. Целью валидации является подтверждение корреляции между прогнозируемым влиянием физических условий, применяемых в ходе процесса, и наблюдаемым биологическим воздействием (эффектом) на биологические индикаторы. Использование параметров процесса, которые подтвердили требуемый биологический эффект, обеспечит стерильность полученного продукта при рутинном процессе.

Выбор используемого биологического индикатора зависит от:

- природы стерилизующего агента (например, тепло, газ или излучение);
- ожидаемой эффективности обработки (например, от значения величины F_{phys} , рассчитанной по параметрам процесса);
- условий процесса (например, температура, время, относительная влажность, концентрация газа, доза облучения);
- характеристик продукта или предметов, подлежащих стерилизации (например, продукт в первичной упаковке, упаковочный материал, другие объекты: посуда, трубки или насосы).

При разработке процесса стерилизации оценивают продукт и его загрузку для определения наиболее труднодоступных для стерилизующего агента мест (например, холодные участки загрузки, система упаковка-укупорка, труднопроходимые участки). При выборе оптимальной схемы биологической проверки для процесса стерилизации, условия стерилизации, положения в загрузке и продукт должны быть подобраны как можно ближе к ситуации «наихудший случай».