**МКС 11.220**

**Изменение № 2 ГОСТ 28085─2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Методы контроля стерильности»**

**Принято Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от № )**

**Зарегистрировано Бюро по стандартам МГС №**

**За принятие изменения проголосовали национальные органы по стандартизации следующих государств:**

**[коды альфа-2 по МК (ИСО 3166) 004]**

**Дату введения в действие настоящего изменения устанавливают указанные национальные органы по стандартизации**

Номер пункта 7.5.12 заменить на номер 7.5.13. Пункт 7.5.12 изложить в новой редакции: «Приготовление питательных сред Каган (жидкой, полужидкой, плотной»

Для выделения и культивирования микоплазм, используют полужидкую питательную среду, содержащую 0,3 % агара;

Для подтверждения наличия микоплазм используют плотную питательную среду, содержащую 1,3 % агара, на которой микоплазмы формируют характерные колонии в форме яичницы-глазуньи.

Жидкую питательную среду используют как вспомогательную для накопления микоплазм.

Все среды Каган для выделения и культивирования микоплазм готовят на основе жидкой среды, в состав которой входят:

-гидролизат бычьего сердца жидкий – 200 см3 (сухой – 20 г);

-мясная вода – 400 см3 или

- мясной экстракт – 13 г (3,0−3,5 % сухих веществ на 1 дм3 среды);

-дрожжевой экстракт (экстракт хлебопекарских дрожжей) – 5,0 г (1,5 г сухих веществ на 1 дм3 среды);

-натрия хлорид – 5,0 г;

-вода очищенная – до 1 дм3.

Значение рН готовой среды после стерилизации (7,8±0,1).

Для приготовления полужидкой среды, содержащей 0,3 % агара, дополнительно вносят 3,0 г агара микробиологического на 1 дм3 среды. Для приготовления плотной среды, содержащей 1,3 % агара, дополнительно вносят 13 г агара на 1 дм3 среды.

Для приготовления жидкой питательной среды в очищенную воду добавляют гидролизат бычьего сердца, мясной экстракт (или мясную воду), экстракт хлебопекарских дрожжей, хлорид натрия и перемешивают. Для приготовления полужидкой или плотной среды дополнительно вносят 3,0 г или 13,0 г агара соответственно. Доводят рН среды до (8,1 ± 0,1) ед , используя для этого 10 %-ный раствор NaOH. . Среду нагревают до кипения, кипятят 2−3 мин и фильтруют. Затем доводят рН готовой среды до (7,8 ± 0,1), используя для этого 5 %-ный раствор соляной кислоты.

Среды разливают в стеклянные флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре 110 оС в течение 30 мин.

Готовые среды хранят при температуре от 2 оС до 10 оС не более 4 мес.

П р и м е ч а н и я:

1)Перед применением полужидкую среду, содержащую 0,3 % агара, нагревают на водяной бане до полного расплавления агара и охлаждают до температуры 40−50 оС. Добавляют 15 %−20 % нормальной сыворотки крови лошади без консерванта, предварительно прошедшей контроль на стерильность и отсутствие контаминации микоплазмами;

2)При необходимости возможно внесение во все готовые питательные среды стерильного раствора аргинина до конечной концентрации 1 %. В качестве индикатора роста микоплазм допускается внесение в жидкую среду Каган раствора фенолового красного 5,0 см3 (0,6 г/дм3).

3)Полужидкую среду разливают в пробирки по 10 см3 и хранят при температуре от 2 оС до 10 оС в течение 7 сут.

Пункт 8.3.1 Первое предложение. В скобках заменить «7.5.11» на «7.5.12».

Пункт 8.3 дополнить пунктом 8.3.4

Испытание на присутствие микоплазм с применением среды Каган проводят по следующим схемам:

Схема 1− посев испытуемого образца на среду Каган полужидкую.

Испытуемый образец вносят по 0,5см3 в каждую из 10 пробирок с полужидкой питательной средой, содержащей 0,3 % агара. Посев производят прокалыванием всего столбика питательной среды концом пипетки, равномерно выпуская ее содержимое при продвижении пипетки в толще среды от дна к ее поверхности. Посевы инкубируют во влажной атмосфере при температуре (37 ± 1) оС в течение 14 сут.

Схема 2 – применяется для испытания препаратов, вызывающих помутнение питательной среды или обладающих ингибирующим действием. Методика посева включает предварительный высев испытуемого образца в жидкую питательную среду для накопления микоплазм с последующим пересевом на полужидкую питательную среду.

Обнаружение микоплазм с предварительным накоплением состоит из следующих этапов:

-внесение 10 см3 испытуемого образца в 100 см3 жидкой питательной среды, инкубирование во влажной атмосфере в течение 7 сут при температуре (37 ± 1) оС.

-пересев на седьмые сутки от начала исследования по 0,5−1,0 см3 культуры в каждую из 10 пробирок с полужидкой питательной средой, содержащей 0,3 % агара с дальнейшим инкубированием во влажной атмосфере при температуре (37 ± 1) оС в течение 14 сут.

При проведении испытаний в качестве положительного контроля может быть использован тест-штамм *M. arginine* G230 в количестве 10−100 КОЕ или один из тест-штаммов, использованных при определении ростовых свойств среды. В качестве отрицательного контроля одновременно инкубируют стерильные питательные среды.

Учет результатов при проведении испытаний по обеим схемам проводят путем визуального просмотра засеянных пробирок в проходящем свете на 3, 7, 10 и 14 сут. В качестве контроля одновременно инкубируют незасеянные питательные среды. На 14 сут проводят окончательный учет результатов. Наличие роста микоплазм оценивают визуально по обнаружению легкой мутности или зернистости в зоне посева. При отсутствии видимого роста микоплазм испытуемый образец считают прошедшим испытания.

Испытание считается недействительным, если обнаружен нетипичный рост микоплазм, обнаружен рост посторонних микроорганизмов в отрицательном контроле или ростовые свойства питательной среды неудовлетворительны, а также при отсутствии роста микоплазм в положительном контроле или, при обнаружении роста микоплазм в отрицательном контроле. В случае признания испытания недействительными проводят повторные испытания.

Пункт 8.1.1 Первое предложение. Заменить «и» на «или».

Пункт 8.1.3изложить в новой редакции: При испытании проб препаратов на стерильность проводят контроль стерильности питательных сред: три пробирки с тиогликолевой средой выдерживают в термостате при температуре (32,5±2,5 ) °С, с соево-казеиновой средой или со средой Сабуро – при температуре (22,5±2,5) °С в течение 14 сут.

Пункт 8.2.1 Дополнить: «При испытании проб лекарственных средств на стерильность проводят контроль стерильности питательных сред : по три пробирки с жидкой и твердой средой Сабуро по 8.1.3 и по три пробирки с МПА. МПБ, МППБ при температуре (37 ± 1) оС в течение 14 сут.»

П р и м е ч а н и е-

В качестве альтернативного метода контроля микробиологической чистоты лекарственных средств, содержащих живые микроорганизмы допускается использование жидкой тиогликолевой и соево-казеиновой сред. Для этого проводят посев проб в три пробирки с каждой средой. Режим инкубирования по 8.1.1. Контроль стерильности питательных сред по 8.1.3.