

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 200 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФГУН
Государственный научный центр
прикладной микробиологии и
биотехнологии
_____ И.А. Дятлов
«___» _____ 200 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для бактериологических исследований
«Питательная среда для контроля стерильности сухая»
(Тиогликолевая среда)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тиогликолевая среда предназначена для проведения испытаний на стерильность лекарственных средств и медицинских иммунобиологических препаратов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Тиогликолевая среда представляет собой гомогенный, гигроскопичный, светочувствительный порошок светло-желтого цвета, получаемый смешиванием сухих компонентов.

Выпускается в полиэтиленовых банках по 250 г.

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Редуцирующие компоненты – тиогликолят и цистеин обеспечивают анаэробизис, достаточный даже для строгих анаэробов. Вязкость Тиогликолевой среды защищает от быстрого проникновения кислорода.

2.2. СОСТАВ

Тиогликолевая среда представляет собой смесь сухих компонентов из расчета, г/л:

| | |
|---|------|
| Панкреатический гидролизат казеина неглубокой степени расщепления сухой | 15,0 |
| Дрожжевой экстракт | 5,0 |

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Натрия хлорид | 2,5 |
| Д-глюкоза | 5,0 |
| Натрия тиогликолят | 0,5 ^{*)} |
| Натрий углекислый | 0,8±0,2 |
| Цистеина гидрохлорид | 0,75 |
| Агар микробиологический | 0,75 |

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Питательная среда должна обеспечивать при посеве в 3 пробирки для каждого разведения с 10 мл тиогликолевой среды по 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма *Alcaligenes faecalis* 415 из разведений 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} и *Clostridium novyi* 198 из разведений 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} не позднее 48 ч инкубации при температуре 34-35 °С визуально обнаруживаемый рост культуры не ниже, чем из разведения 10^{-7} для *A. faecalis* 415 (около 40 жизнеспособных клеток в посевной дозе) и 10^{-4} для *C. novyi* 198 (около 50 жизнеспособных клеток в посевной дозе).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При анализе исследуемого материала – соблюдение СП 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и гельминтами».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат, обеспечивающий температуру 37 ± 1 °С
- Весы лабораторные 2 класса точности
- Автоклав
- Пробирки стеклянные
- Пипетки стеклянные позволяющие отбирать объемы жидкости 1 и 2 мл
- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 1000 мл
- Чашки Петри стерильные
- Вода дистиллированная
- Колбы
- Воронки стеклянные

^{*)} Возможен выпуск среды без тиогликолята натрия. В этом случае тиогликолят натрия (тиогликолевую кислоту) добавляют ex tempore

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Объекты исследований в санитарной и клинической микробиологии.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление Тиогликолевой среды.

31,0 г препарата размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят в течение 2 мин (в случае необходимости добавляют в горячую среду 0,5 г тиогликолята натрия или 0,3 мл тиогликолевой кислоты), фильтруют через бумажный фильтр, разливают в соответствующие стерильные емкости и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Готовая среда должна иметь рН $7,0 \pm 0,2$.

Контроль приготовленной тиогликолевой среды должен предусматривать оценку ее качества по ростовым и нейтрализующим свойствам, а также по показателю стерильности. Проверку ее нейтрализующих свойств осуществляют только в том случае, если среду используют для контроля стерильности препаратов, содержащих ртутный консервант (мертиолят).

В случае использования среды с тиогликолятом натрия в составе сухого порошка проверку ее нейтрализующих свойств осуществляют только при «входном» контроле, т.е. каждая последующая партия среды, приготовленная из одной серии сухого препарата, контролю по данному показателю не подлежит, а при добавлении тиогликолята натрия или тиогликолевой кислоты ex tempore контролю по нейтрализующим свойствам подлежит каждая партия среды.

Оценку качества партии (серии) тиогликолевой среды по ростовым и нейтрализующим свойствам осуществляют в соответствии с методикой, изложенной в Приложении к данной Инструкции.

Оценку стерильности каждой приготовленной партии среды проводят по следующей методике.

После стерилизации пробирки (или другие емкости) со средой в количестве не менее 2 % от партии помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С. Учет результатов проводят через 46-50 ч путем визуального осмотра всех пробирок со средой. В случае обнаружения пророста (помутнение среды) в оставленных на контроль пробирках бракуют всю партию. Образцы среды, выдержанные при температуре (37 ± 1) °С для проверки стерильности препаратов, не используют.

Срок годности каждой приготовленной партии тиогликолевой среды определяется наличием или отсутствием ртутного консерванта в составе контролируемого препарата (МИБП): для проверки стерильности препаратов без ртутного консерванта (мертиолята) тиогликолевая среда должна быть использована не позднее 2-х недель со дня приготовления, а для препаратов, содержащих данный консервант, в течение 1-3 суток со дня приготовления. Конкретный срок годности – 1, 2, 3 суток – устанавливают при «входном» контроле новой серии среды путем определения ее нейтрализующих свойств после хранения приготовленной среды в течение 1-х, 2-х, 3-х суток.

Приготовленную среду хранят при температуре 2-8 °С, перед использованием регенерировать путем нагревания ее в кипящей водяной бане в течение 15-20 мин и последующего охлаждения в холодной воде.

Партия тиогликолевой среды, качество которой не соответствует требованиям по нейтрализующим свойствам (см. Приложение), может быть использована (при положительных результатах контроля по другим показателям) для проверки стерильности препаратов, не содержащих ртутный консервант.

7.2. Взятие образцов для анализа и посев производят в соответствии с ГФ XI вып. 1, 2 с. 187-193 «Испытание на стерильность».

8. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят визуально ежедневно в течение 14 сут инкубации при температуре 34-35 °С. Наличие роста микроорганизмов оценивают по появлению мутности, отдельных шарообразных колоний и других макроскопических изменений в среде. Выявленный рост микроорганизмов необходимо подтвердить микроскопированием мазков, окрашенных по Граму. Испытуемый препарат считают стерильным при отсутствии роста микроорганизмов.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Тиогликолевую среду необходимо хранить в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 30 °С.

Срок годности – 2 года. Среда с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества Тиогликолевой среды в течение срока годности следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-20, факс 36-01-16.

Зам. директора
по научно-производственной работе

А.П. Шепелин

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор
ЗАО «Вымпел-Медцентр»
_____ С.П. Кондрашов

« ____ » _____ 200 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ

к инструкции по применению питательной среды для контроля стерильности сухой (Тиогликолевой среды)

Ростовые свойства среды

Питательная среда должна обеспечивать рост аэробного (*A. faecalis* 415) и анаэробного (*S. novyi* 198) тест-штаммов при посеве их в количестве менее 100 жизнеспособных клеток.

Определение ростовых свойств:

1. Подготовка тест-штаммов для контроля питательной среды.

Тест-штаммы *A. faecalis* 415 и *S. novyi* 198 получают из ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Используемые для контроля среды тест-штаммы должны быть типичными по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам.

Характеристика, хранение и пересевы тест-штаммов с целью подготовки их для контроля тиогликолевой среды изложены в МУК 4.1/4.2.588-96 «Методы контроля медицинских иммунологических препаратов, вводимых людям» МЗ РФ, Москва, 1998 г.

Выращенную на скошенном агаре Хоттингера при температуре (37 ± 1) °С в течение 18-24 ч культуру *A. faecalis* 415 смывают с поверхности среды стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида, доводят концентрацию микробной взвеси до 10 единиц мутности по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85 П, соответствующего года выпуска. Из данной взвеси культуры десятикратными разведениями (9,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 1,0 мл микробной взвеси) получают разведение 10^{-1} . Микробную взвесь из разведения 10^{-1} разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:1 (4,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 4,5 мл микробной взвеси) – разведение 10^{-2} (условно). Полученную взвесь культуры десятикратными разведениями доводят до разведения 10^{-8} , меняя пипетку для каждого разведения. Для контроля среды используют разведения культуры *A. faecalis* 415 - 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} .

Выращенную на среде Тароцци при температуре (37 ± 1) °С в течение 17-19 ч культуру *S. novyi* 198 центрифугируют при частоте вращения 3000 об/мин в течение 20 мин, удаляют надосадочную жидкость. Полученную биомассу разводят стерильным раствором для разведения культуры (разводящей жидкостью) до концентрации микробной взвеси, соответствующей 10 единицам мутности по стандартному образцу мутности. (Рецепты приготовления

среды Тароцци и раствора для разведения культуры изложены в МУК 4.1/4.2.588-96). Из данной взвеси культуры десятикратным разведением (1,0 мл микробной взвеси и 9,0 мл разводящей жидкости) получают разведение 10^{-1} . Микробную взвесь из разведения 10^{-1} разводят стерильной разводящей жидкостью в соотношении 1:3 (2,0 мл микробной взвеси и 6,0 мл разводящей жидкости) - разведение 10^{-2} (условно). Полученную взвесь культуры десятикратными разведениями доводят до разведения 10^{-5} , меняя пипетку для каждого разведения². Для контроля питательной среды используют разведения культуры *S. novyi* 198 из разведениях 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

2. Посев и учет результатов.

По 0,1 мл микробной взвеси каждого из тест-штаммов: *A. faecalis* 415 из разведений 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} и *S. novyi* 198 из разведений 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} вносят в 3 пробирки с 10,0 мл тиогликолевой среды (погружая пипетку в середину столбика среды). Посев осуществляют, начиная с последнего разведения. Не позднее 48 ч инкубации при температуре 34-35 °С производят учет результатов.

Серию тиогликолевой среды признают пригодной в случае визуального обнаружения роста культуры не менее, чем в 2-х пробирках при посеве тест-штамма *A. faecalis* 415 из разведения 10^{-7} и не менее одной пробирки из разведения 10^{-8} , а тест-штамма *S. novyi* 198 - из разведений 10^{-4} , 10^{-5} , соответственно.

При росте в тиогликолевой среде тест-штамма *S. novyi* 198 наблюдается образование отдельных шарообразных колоний через 24 ч инкубации и диффузное помутнение среды с выраженной прозрачной зоной в верхней части столбика через 48 ч.

При росте тест-штамма *A. faecalis* 415 происходит помутнение верхней части столбика среды.

Нейтрализующие свойства среды³.

Питательная среда должна нейтрализовать действие мертиолята в концентрации $0,5 \cdot 10^{-5}$ г/мл среды.

Определение нейтрализующих свойств:

1. Подготовка тест-штамма для контроля питательной среды изложена в разделе «Ростовые свойства среды».

² Не допускается выдерживание культуры в разводящей жидкости более 30 мин

³ Нейтрализующие свойства среды определяют в одном опыте с ростовыми свойствами

2. Посев и учет результатов.

В каждую из 9-ти пробирок с 10,0 мл тиогликолевой среды пипеткой вместимостью 2 мл вносят по 0,5 мл 0,01 % раствора мертиолята ⁴, погружая пипетку в середину столбика среды. Одной пипеткой вносят раствор мертиолята в 3-4 пробирки. Во избежание аэрирования не следует содержимое из пипетки выдувать до конца. По 0,1 мл микробной взвеси тест-штамма *A. faecalis* 415 каждого разведения 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ вносят в 3 пробирки с питательной средой, погружая пипетку в середину столбика среды. Не позднее 5 суток инкубации при температуре 34-35 °С производят учет результатов.

Серию тиогликолевой среды признают пригодной в случае визуального обнаружения роста культуры не менее чем в 2-х пробирках при посеве тест-штамма *A. faecalis* 415 из разведения 10⁻⁷ и не менее одной пробирки из разведения 10⁻⁸.

⁴ Приготовление 0,01 % раствора мертиолята: 0,1 г мертиолята (thimerosal, Merck, Cat. № 81043, или другой фирмы, при соответствии качества требованиям Merck) растворяют в 100 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Полученный 0,1 % раствор мертиолята хранят во флаконе из темного стекла не более 3-х месяцев при температуре 2-8 °С. Перед посевом 0,1 % раствор мертиолята разводят в 10 раз стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида (1,0 мл 0,1 % раствора мертиолята и 9,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида).