2.6.36. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ЖИВЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В КАЧЕСТВЕ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ: ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО КОНТАМИНИРУЮЩИХ АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.

Испытания, описанные в данной общей фармакопейной статье, позволяют определять общее количество мезофильных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов, способных расти в аэробных условиях.

Испытания могут применяться для подтверждения соответствия активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата, содержащих живые микроорганизмы установленным требованиям по микробиологической чистоте.

Альтернативные микробиологические методики, включая автоматизированные методы, могут использоваться в том случае, если доказана их эквивалентность фармакопейным методикам.

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Испытания биологического лекарственного препарата, содержащего живые микроорганизмы в качестве активных фармацевтических субстанций (БПЖМ), проводят в асептических условиях. Меры предосторожности должны быть такими, чтобы исключить влияние на возможные контаминанты, обнаруживаемые в ходе испытания.

Если БПЖМ препятствует выявлению контаминации микроорганизмами, то необходимо следовать схеме принятия решений на рис. 2.6.36.-1.

Если компоненты лекарственного препарата, отличные от активной фармацевтической субстанции (т.е. микроорганизмов), обладают ингибирующим действием, то его удаляют, насколько это возможно, или нейтрализуют, как описано в общей фармакопейной статье *2.1.6.6. Микробиологические испытания нестерильных лекарственных средств: общее количество жизнеспособных аэробных микроорганизмов*.

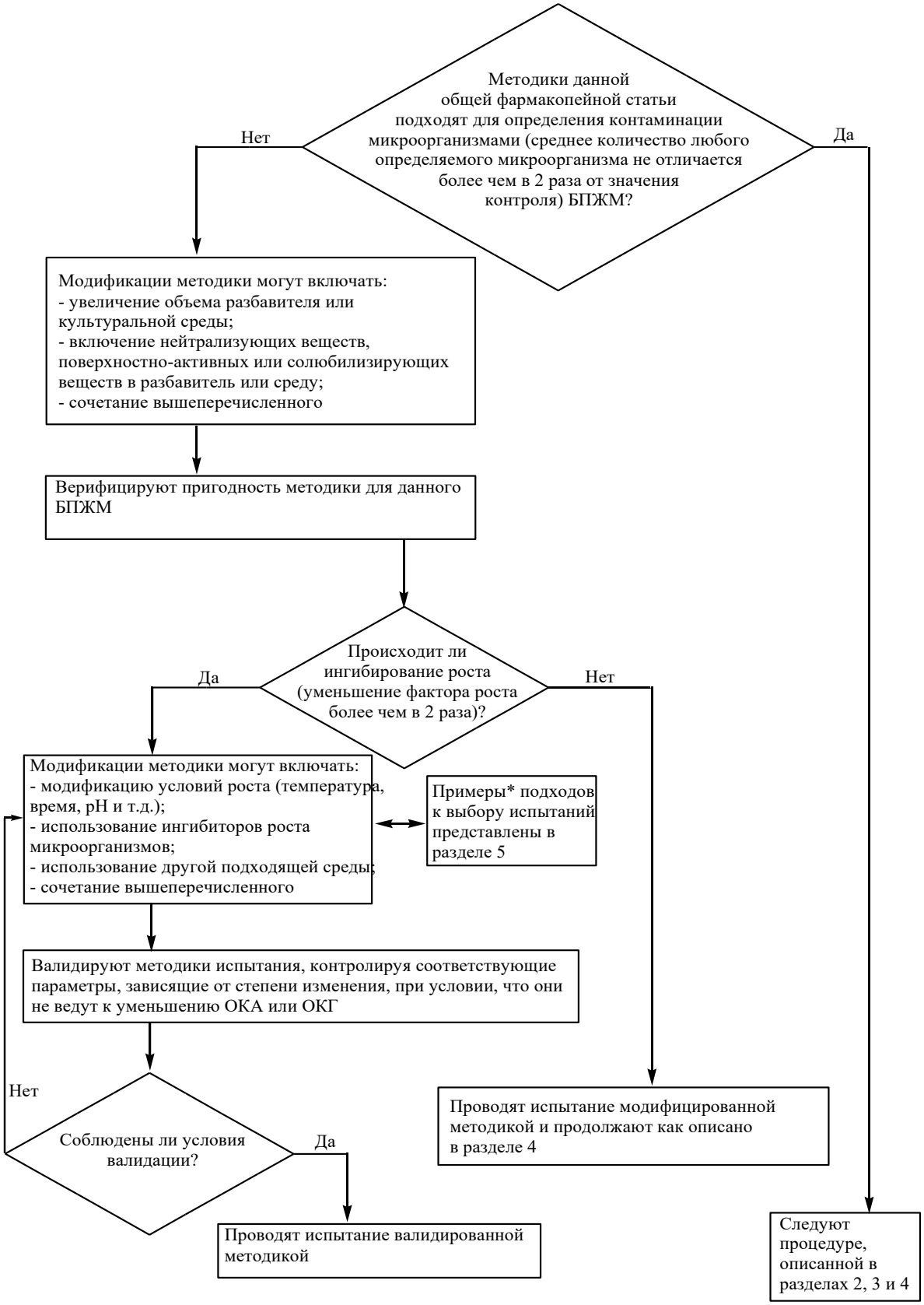
Если для этой цели используются инактиваторы, должны быть подтверждены их эффективность и отсутствие токсичности для определяемых микроорганизмов-контаминантов.

Если при подготовке испытуемого образца используют поверхностно-активные вещества, то должно быть подтверждено отсутствие их токсичности для определяемых микроорганизмов-контаминантов и их совместимость с применяемыми инактиваторами.

2.МЕТОДЫ ПОДСЧЕТА

Для подсчета суммарного количества жизнеспособных аэробных микроорганизмов используют чашечные агаровые методы или метод наиболее вероятных чисел. Метод наиболее вероятных чисел обычно является наименее точным методом микробиологических подсчетов.

Выбор метода основывается на таких факторах, как природа БПЖМ и установленный предел микробной контаминации. Выбранный метод должен позволять проводить испытания образца подходящего размера для возможности вынесения заключения о соответствии нормативному документу по качеству. Пригодность выбранного метода должна быть доказана.



* Этот раздел является информационным. При соответствующем обосновании допускаются и иные подходы

Рисунок 2.6.36.-1. – *Схема принятия решений по методикам определения контаминации аэробными микроорганизмами*

3. ПРОВЕРКА РОСТОВЫХ СВОЙСТВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ПРИГОДНОСТИ МЕТОДА ПОДСЧЕТА И ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ КОНТРОЛИ

3.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Возможность обнаружения контаминации микроорганизмами в присутствии БПЖМ, должна быть доказана.

Пригодность методики должна быть подтверждена, если в процедуру испытания или в лекарственный препарат вносят изменения, которые могут повлиять на проведение испытаний.

3.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТЕСТ-ШТАММОВ

Используют стабильные стандартизированные суспензии тест-штаммов или их готовят, как указано ниже. Посевную культуру, поддерживаемую при помощи специальных техник (система посевного материала), используют так, чтобы жизнеспособные микроорганизмы, применяемые для посева, проходили не более 5 пассажей от исходного посевного материала. Отдельно выращивают каждый из тест-штаммов бактерий и грибов, как указано в таблице 2.6.36.-1.

Для приготовления суспензии тест-штаммов используют буферный раствор натрия хлорида и пептона с pH 7,0 или фосфатный буферный раствор с pH 7,2; для суспензирования спор *A. brasiliensis* в буфер может быть добавлено 0,05 % полисорбата 80. Используют суспензии в течение 2 ч или в течение 24 ч (в случае хранения при температуре 2–8 °C). В качестве альтернативы приготовлению и последующему разведению свежей суспензии вегетативных клеток *A. brasiliensis* и *B. subtilis* может быть приготовлена стабильная суспензия спор с дальнейшем использованием подходящего объема суспензии спор для посева в ходе испытания. Стабильная суспензия спор может храниться при 2–8 °C в течение всего периода времени, установленного при валидации.

3.3. ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

Отрицательный контроль проводят при испытании БПЖМ, как описано в разделе 4 данной общей фармакопейной статьи. При обнаружении роста микроорганизмов в отрицательном контроле необходимо проведение расследования.

3.4. ПРОВЕРКА РОСТОВЫХ СВОЙСТВ СРЕД

Проводят испытание ростовых свойств каждой серии предварительно приготовленной среды и каждой серии среды, приготовленной из обезвоженной среды или из указанных ингредиентов.

Инокулируют небольшим количеством индикаторных микроорганизмов (не более 100 КОЕ), указанных в таблице 2.6.36.-1, порции или чашки Петри с соево-казеиновым бульоном и соево-казеиновым агаром, используя раздельные порции или чашки Петри для каждого вида. Чашки Петри с агаром Сабуро с глюкозой инокулируют небольшим количеством индикаторных микроорганизмов (не более 100 КОЕ), как указано в таблице 2.6.36.-1, используя отдельные чашки Петри для каждого вида. Инкубируют в условиях, описанных в таблице 2.6.36.-1.

Для плотных питательных сред, полученный рост не должен отличаться более чем в 2 раза от рассчитанного значения для используемого инокулята. Для свежеприготовленного инокулята, рост микроорганизмов должен быть сопоставим с полученным в ранее проведенном испытании с использованием одобренной серии среды. Жидкая питательная среда считается подходящей, если визуально отчетливо определяют рост микроорганизмов, сопоставимый с ростом, полученным в ранее проведенном испытании с использованием одобренной серии среды.

3.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИГОДНОСТИ МЕТОДА ПОДСЧЕТА В ПРИСУТСТВИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ЖИВЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В КАЧЕСТВЕ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

3.5.1. Приготовление испытуемого образца

Методика приготовления испытуемого образца зависит от физических характеристик испытуемого БПЖМ. Если ни одна из описанных ниже методик не приемлема, то должна быть разработана альтернативная методика приготовления.

Готовят гомогенную суспензию (обычно в разведении 1 : 10) БПЖМ в буферном растворе натрия хлорида и пептона с pH 7,0, фосфатном буферном растворе с pH 7,2 или соево-казеиновом бульоне. Для облегчения суспендирования плохо смачиваемых веществ может быть добавлено поверхностно-активное вещество, например, раствор 1 г/л полисорбата 80. Если необходимо, доводят до pH 6–8. Дальнейшие разведения, при необходимости, готовят с использованием этого же разбавителя.

Таблица 2.6.36.–1. – *Приготовление и использование тест-микроорганизмов*

Микроорганизм	Приготовление тест-штамма	Стимуляция роста		Подходящий метод подсчета в присутствии БПЖМ	
		Общее количество контаминирующих аэробов (ОКА)	Общее количество контаминирующих дрожжевых и плесневых грибов (ОКГ)	Общее количество контаминирующих аэробов (ОКА)	Общее количество контаминирующих дрожжевых и плесневых грибов (ОКГ)
Staphylococcus aureus такие как: ATCC 6538 NCIMB 9518 CIP 4.83 NBRC 13276	Соево-казеиновый агар или соево-казеиновый бульон 30–35 °C 18–24 ч	Соево-казеиновый агар и соево-казеиновый бульон ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 сут	-	Соево-казеиновый агар / метод наиболее вероятных чисел: соево-казеиновый бульон ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 сут	-
Pseudomonas aeruginosa такие как: ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275	Соево-казеиновый агар или соево-казеиновый бульон 30–35 °C 18–24 ч	Соево-казеиновый агар и соево-казеиновый бульон ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 сут	-	Соево-казеиновый агар / метод наиболее вероятных чисел: соево-казеиновый бульон ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 сут	-

Bacillus subtilis такие как: ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134	Соево-казеиновый агар или соево-казеиновый бульон 30–35 °C 18–24 ч	Соево-казеиновый агар и соево-казеиновый бульон ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 сут	-	Соево-казеиновый агар / метод наиболее вероятных чисел: соево-казеиновый бульон ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 сут	-
Candida albicans такие как: ATCC 10231 NCPF 3179 IP 48.72 NBRC 1594	Агар Сабуро с глюкозой или бульон Сабуро 20–25 °C 2–3 сут	Соево-казеиновый агар ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 5 сут	Агар Сабуро с глюкозой ≤ 100 КОЕ 20–25 °C ≤ 5 сут	Соево-казеиновый агар ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 5 сут Метод наиболее вероятных чисел: неприменимо	Агар Сабуро с глюкозой ≤ 100 КОЕ 20–25 °C ≤ 5 сут
Aspergillus brasiliensis такие как: ATCC 16404 IMI 149007 IP 1431.83 NBRC 9455	Агар Сабуро с глюкозой или картофельно-декстрозный агар 20–25 °C 5–7 сут, или до тех пор, пока не будет выявлено хорошего спороношения	Соево-казеиновый агар ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 5 сут	Агар Сабуро с глюкозой ≤ 100 КОЕ 20–25 °C ≤ 5 сут	Соево-казеиновый агар ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 5 сут Метод наиболее вероятных чисел: не применимо	Агар Сабуро с глюкозой ≤ 100 КОЕ 20–25 °C ≤ 5 сут

3.5.2. Посев и разведение

Добавляют к приготовленному как описано в подразделе 3.5.1 данной общей фармакопейной статьи испытуемому образцу и к контролю (без испытуемого материала) достаточный объем микробной суспензии до получения инокулята не более 100 КОЕ. Объем суспензии инокулята не должен превышать 1 % от объема разбавленного БПЖМ.

Для подтверждения приемлемой активации роста тест-микроорганизмов в присутствии БПЖМ, в испытании должен быть использован минимально возможный фактор разведения. Если это невозможно в связи с ингибирующей активностью БПЖМ, должен быть разработан подходящий протокол (смотри схему принятия решений, рисунок 2.6.36.-1). В противном случае, если ингибирующие свойства образца невозможно предотвратить, то аликвота тест-микроорганизмов может добавляться после нейтрализации или разведения.

Ингибирующая активность. Количество микроорганизмов, восстановивших жизнеспособность из приготовленного образца, разведенного как описано в подразделе 3.5.2 данной общей фармакопейной статьи и инкубированного согласно методике, описанной в подразделе 3.5.3 данной общей фармакопейной статьи, сравнивают с количеством микроорганизмов, восстановивших жизнеспособность в контроле.

Если рост ингибируется более чем в 2 раза, следуют схеме принятия решения на рисунке 2.6.36.-1 и модифицируют методику для обеспечения достоверных результатов. Модификация методики может включать, например, (1) увеличение объема разбавителя или культуральной среды, (2) введение специфических или общих нейтрализующих веществ в разбавитель, (3) мембранная фильтрация, или (4) сочетание вышеперечисленных способов.

Если рост по-прежнему ингибируется более чем в 2 раза, то продолжают следовать схеме принятия решений на рисунке 2.6.36.-1.

Новый подход необходимо обосновать, используя соответствующие параметры, зависящие от степени изменения, при условии, что оно не ведет к уменьшению ОКА или ОКГ.

3.5.3. Восстановление жизнеспособности тест-микроорганизмов в присутствии БПЖМ

Для каждого тест-микроорганизма выполняют отдельное испытание. Подсчитывают только микроорганизмы добавленных штаммов.

3.5.3.1. Чашечные агаровые методы. При использовании чашечных агаровых методов испытание проводят минимум в 2 повторностях для каждой среды и затем рассчитывают среднее значение.

3.5.3.1.1. Метод глубинного посева. В чашку Петри диаметром 9 сантиметров добавляют 1 мл испытуемого образца, приготовленного как описано в подразделах 3.5.1 и 3.5.2 данной общей фармакопейной статьи, и 15–20 мл соево-казеинового агара или агара Сабуро с глюкозой, температура обеих сред должна быть не более 45 °C. Если используют большие чашки Петри, то количество агаризованной среды должно быть соответственно увеличено. Для каждого микроорганизма, перечисленного в таблице 2.6.36.-1, используют не менее 2 чашек Петри. Инкубируют чашки как указано в таблице 2.6.36.-1. Учитывают среднее арифметическое количество на среду и рассчитывают количество КОЕ в исходном инокуляте.

3.5.3.1.2. Метод поверхностного посева. В чашку Петри диаметром 9 сантиметров, добавляют 15–20 мл соево-казеинового агара или агара Сабуро с глюкозой температурой около 45 °C и выдерживают до затвердевания. Если используют большие чашки Петри, количество агаризованной среды должно быть соответственно увеличено. Сушат чашки, например, в ламинарном шкафу или инкубаторе. Для каждого микроорганизма, перечисленного в таблице 2.6.36.-1 используют не менее 2 чашек Петри. На поверхность среды инокулируют не менее 0,1 мл испытуемого образца, приготовленного как описано в подразделах 3.5.1 и 3.5.2 данной общей фармакопейной статьи. Инкубируют и рассчитывают количество КОЕ в исходном инокуляте как описано в подразделе 3.5.3.1.1 данной общей фармакопейной статьи.

3.5.3.2. Метод наиболее вероятных чисел. Точность и правильность метода наиболее вероятных чисел меньше, чем у чашечных агаровых методов. Ненадежность результата наблюдается, в частности, при подсчете плесневых грибов. По этой причине метод наиболее вероятных чисел применяется для подсчета ОКА в ситуациях, когда ни один другой метод не пригоден. Если использование метода обосновано, то его проводят следующим образом.

Готовят по крайней мере 3 серии десятикратных разведений БПЖМ, как описано в подразделах 3.5.1 и 3.5.2 данной общей фармакопейной статьи. Для каждого разведения используют 3 аликвоты из 1 г или 1 мл, которые вносят в 3 пробирки, содержащих 9–10 мл соево-казеинового бульона. В среду, при необходимости, может быть добавлено поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80). Таким образом, если готовится 3 разведения, то засевают 9 пробирок.

Инкубируют все пробирки при 30–35 °C не более 3 сут. Если получение результатов осложнено или они неточные из-за природы испытуемого БПЖМ, то проводят пересев на соево-казеиновый бульон или соево-казеиновый агар, инкубируют в течение 1–2 сут при той же температуре и используют эти результаты. Определяют наиболее

вероятное число микроорганизмов на грамм или миллилитр испытуемого БПЖМ согласно таблице 2.6.36.-2.

3.6. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Чашечные агаровые методы считают пригодными, если среднее количество тест-микроорганизмов не отличается более чем в 2 раза от контрольного значения (в отсутствии БПЖМ), определённого как указано в подразделе 3.5.2 данной общей фармакопейной статьи. Метод наиболее вероятных чисел считают пригодным, если рассчитанное значение для инокулята укладывается в пределы с доверительным интервалом 95 % от результата, полученного в контроле.

Если критерии не могут быть достижимы, то следуют схеме принятия решений на рисунке 2.6.36.-1, и модифицируют методику для обеспечения достоверных результатов.

4. ИСПЫТАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ЖИВЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В КАЧЕСТВЕ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

4.1. КОЛИЧЕСТВО ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ

При отсутствии других указаний, для испытания используют 10 г или 10 мл испытуемого БПЖМ, отобранного с соблюдением упомянутых мер предосторожности.

Для БПЖМ, общее количество единиц которых в серии менее 200 (например, образец используется в клинических испытаниях), размер образца может быть уменьшен до 2 единиц, или до 1 единицы, если размер серии менее 100.

Образец(ы) отбирают произвольно из балк-продукта или из упаковки с препаратом. Чтобы получить требуемое количество образца смешивают содержимое из достаточного числа упаковок.

Таблица 2.6.36.-2.

Наиболее вероятное число микроорганизмов

Наблюдаемые комбинации количества пробирок, демонстрирующих рост в каждом пассаже			**Наиболее вероятное число на грамм или на миллилитр БПЖМ**	**95 % доверительный интервал**
Количество грамм или миллилитров БПЖМ на пробирку				
0,1	0,01	0,001		
0	0	0	< 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	> 1100	

4.2. ИСПЫТАНИЕ

4.2.1. Чашечные агаровые методы

4.2.1.1. Метод глубинного посева. Готовят испытуемый образец, используя подходящую методику, как описано в разделе 3. Для каждой среды готовят как минимум 2 чашки Петри для каждой степени разведения. Инкубируют чашки с соево-казеиновым агаром при температуре 30–35 °C в течение 3–5 сут и чашки с агаром Сабуро с глюкозой при температуре 20–25 °C в течение 5–7 сут. Отбирают чашки соответствующего разведения, в которых обнаруживаемое количество колоний бактерий-контаминантов не превышает 250, а колоний грибов – 50. Из результатов среднего арифметического количества на культуральную среду рассчитывают количество КОЕ на грамм или на миллилитр БПЖМ.

4.2.1.2. Метод поверхностного посева. Готовят испытуемый образец, используя подходящую методику, как описано в разделе 3 данной общей фармакопейной статьи. Для каждой среды каждой степени разведения готовят как минимум 2 чашки Петри. Инкубацию и расчет количества КОЕ контаминант проводят, как описано для метода глубинного посева.

4.2.2. Метод наиболее вероятных чисел

Готовят и разводят испытуемый образец, используя подходящую методику, как описано в разделе 3 данной общей фармакопейной статьи. Инкубируют все пробирки при температуре 30–35 °C в течение 3–5 сут. Если необходимо, используют подходящую процедуру пересева. Для каждого уровня разведения регистрируют число пробирок, в которых обнаруживается рост микроорганизмов. Определение наиболее вероятного числа контаминирующих микроорганизмов на грамм или миллилитр БПЖМ проводят согласно таблице 2.6.36.-2.

4.3. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Количество аэробных микроорганизмов-контаминантов (ОКА) считается равным количеству контаминирующих КОЕ, обнаруженному в соево-казеиновом агаре; если в этой среде определены колонии контаминирующих дрожжевых и плесневых грибов, они учитываются как часть ОКА. Суммарное количество дрожжевых и плесневых грибов считают равным количеству КОЕ, выявленному с использованием агара Сабуро с глюкозой; если в этой среде обнаруживают колонии бактерий-контаминантов, они могут быть исключены из ОКГ. В случае, если предполагают превышение приемлемых критериев ОКГ ввиду бактериального роста, может быть использован агар Сабуро с глюкозой, содержащий антибиотики (смотри рисунок 2.6.36.-1, схема принятия решений). Если подсчет осуществляют методом наиболее вероятных чисел, то рассчитанное значение рассматривают, как ОКА.

Критерий приемлемости качества по микробиологической чистоте

интерпретируют следующим образом:

– 10^1 КОЕ: максимально допустимое число = 20;

– 10^2 КОЕ: максимально допустимое число = 200;

– 10^3 КОЕ: максимально допустимое число = 2000 и так далее.

Рекомендованные растворы и среды описаны в общих фармакопейных статьях *2.1.6.7. Микробиологические испытания нестерильных лекарственных средств на наличие отдельных видов микроорганизмов* и *номер Питательные среды*.

5. ПОДХОДЫ ПРИ НАЛИЧИИ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ЖИВЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В КАЧЕСТВЕ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

Данный раздел представлен для информации. Возможно использование других подходов при наличии их обоснования. В разделе приведены примеры подходов к выбору испытания для определения контаминации микроорганизмами БПЖМ, обладающего ингибирующим действием.

Каждый подход необходимо обосновать, используя соответствующие параметры, зависящие от степени изменения, при условии, что оно не ведет к уменьшению ОКА или ОКГ.

Используют тест-штаммы, указанные в таблице 2.6.36.-1. Приготовление тест-штаммов проводят, как описано в разделе 4.2 данной общей фармакопейной статьи. Отрицательный контроль проводят, как описано в разделе 4.3 данной общей фармакопейной статьи. Ростовые свойства среды и пригодность новой культуральной среды определяют путем посева небольшого количества (не более 100 КОЕ) микроорганизмов на каждую серию среды. Полученный рост, определенного с использованием соево-казеинового агара (ОКА) или агара Сабуро с глюкозой (ОКГ), не должен отличаться более чем в 2 раза от значения, рассчитанного для используемого инокулята.

5.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ-КОНТАМИНАНТОВ

Если БПЖМ, в качестве активной фармацевтической субстанции содержит молочнокислые бактерии, то испытание на контаминацию аэробными микроорганизмами проводят на чашках Петри с агаром, не содержащим сахаров, инкубируя при температуре 30–35 °C в течение 72 ч. Молочнокислые бактерии растут медленно в виде точечных колоний, в то время как микроорганизмы-контаминанты можно легко обнаружить как большие и быстрорастущие колонии.

В качестве альтернативы, испытания на контаминацию аэробными микроорганизмами могут быть проведены на чашках Петри с соево-казеиновым агаром с добавлением 5 % овечьей крови при температуре 30–35 °C в течение 44–48 ч. Добавление крови усиливает рост микроорганизмов-контаминантов и формирование морфологически отличимых колоний, что облегчает возможность их дифференцирования от присутствующих молочнокислых бактерий.

Если БПЖМ, содержит в качестве активной фармацевтической субстанции споры *Bacillus clausii,* то испытания на контаминацию аэробными микроорганизмами могут быть проведены на спорулирующем агаре. Среда, способствующая споруляции *Bacillus clausii*, подавляет вегетативный рост микроорганизмов БПЖМ, что делает возможным обнаружение микроорганизмов-контаминантов. Чашки Петри инкубируют при температуре 33–37°C в течение 48 ч.

Если БПЖМ, в качестве активной фармацевтической субстанции содержит *Saccharomyces cerevisiae*, тип *boulardii*, то испытания на контаминацию аэробными микроорганизмами могут быть проведены с использованием соево-казеинового агара, содержащего циклогексимид, как подходящий ингибитор для *Saccharomyces*. Чашки Петри инкубируют при температуре 30–35 °C в течение 3–5 сут.

Если для БПЖМ, для определения общего количества аэробных микроорганизмов-контаминантов невозможно установить подходящие среду и условия роста, то контролируют не только отсутствие отдельных контаминирующих микроорганизмов таких, как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp*. и грамотрицательных бактерий устойчивых к желчи с использованием методик описанных в общей фармакопейной статье *2.6.38 Микробиологические испытания биологических лекарственных средств, содержащих живые микроорганизмы в качестве активных фармацевтических субстанций: испытания на отдельные виды микроорганизмов*, но и, основываясь на оценке рисков, проводят испытания на другие микроорганизмы-контаминанты (например, отдельные контаминанты из окружающей среды).

5.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЭРОБНЫХ КОНТАМИНИРУЮЩИХ ДРОЖЖЕВЫХ И ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

Если БПЖМ, в качестве активной фармацевтической субстанции содержит бактерии, то испытание на аэробные контаминирующие дрожжевые и плесневые грибы может быть выполнено с использованием агара Сабуро с глюкозой, содержащего антимикробное средство (например, хлорамфеникол), инкубируя при температуре 20–25 °C в течение 5–7 сут.

Если БПЖМ, в качестве активной фармацевтической субстанции содержит *Saccharomyces cerevisiae*, тип *boulardii*, содержание дрожжевых и плесневых грибов может быть определено с использованием нескольких сред (агар Сабуро с глюкозой дополненный хлорамфениколом и циклогексимидом, агар Чапека-Докса, картофельно-декстрозный агар).