2.1.6.22. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, СОДЕРЖАЩИХ ЖИВЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ: ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО КОНТАМИНИРУЮЩИХ АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.

1. ВВЕДЕНИЕ

Испытания, описанные в данной общей фармакопейной статье, позволяют определять количество контаминирующих микроорганизмов: мезофильных бактерий (контаминирующие аэробные микроорганизмы, КАМ), дрожжевых и плесневых грибов (контаминирующие грибы, КГ), способных расти в аэробных условиях.

Испытания, прежде всего, предназначены для подтверждения соответствия лекарственных средств, содержащих живые микроорганизмы, (далее – продукты) установленным требованиям по микробиологическому качеству.

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

2. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Испытания продукта проводят в асептических условиях. Меры предосторожности, предпринимаемые для предотвращения контаминации, не должны влиять ни на один из выявляемых в ходе испытания контаминирующих микроорганизмов.

Если компоненты продукта препятствуют выявлению контаминации микроорганизмами, то необходимо следовать схеме принятия решений на рис. 2.1.6.22.–1.

Если компоненты продукта, отличные от действующего (активного) вещества (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 продуктов: общее количество микроорганизмов.*

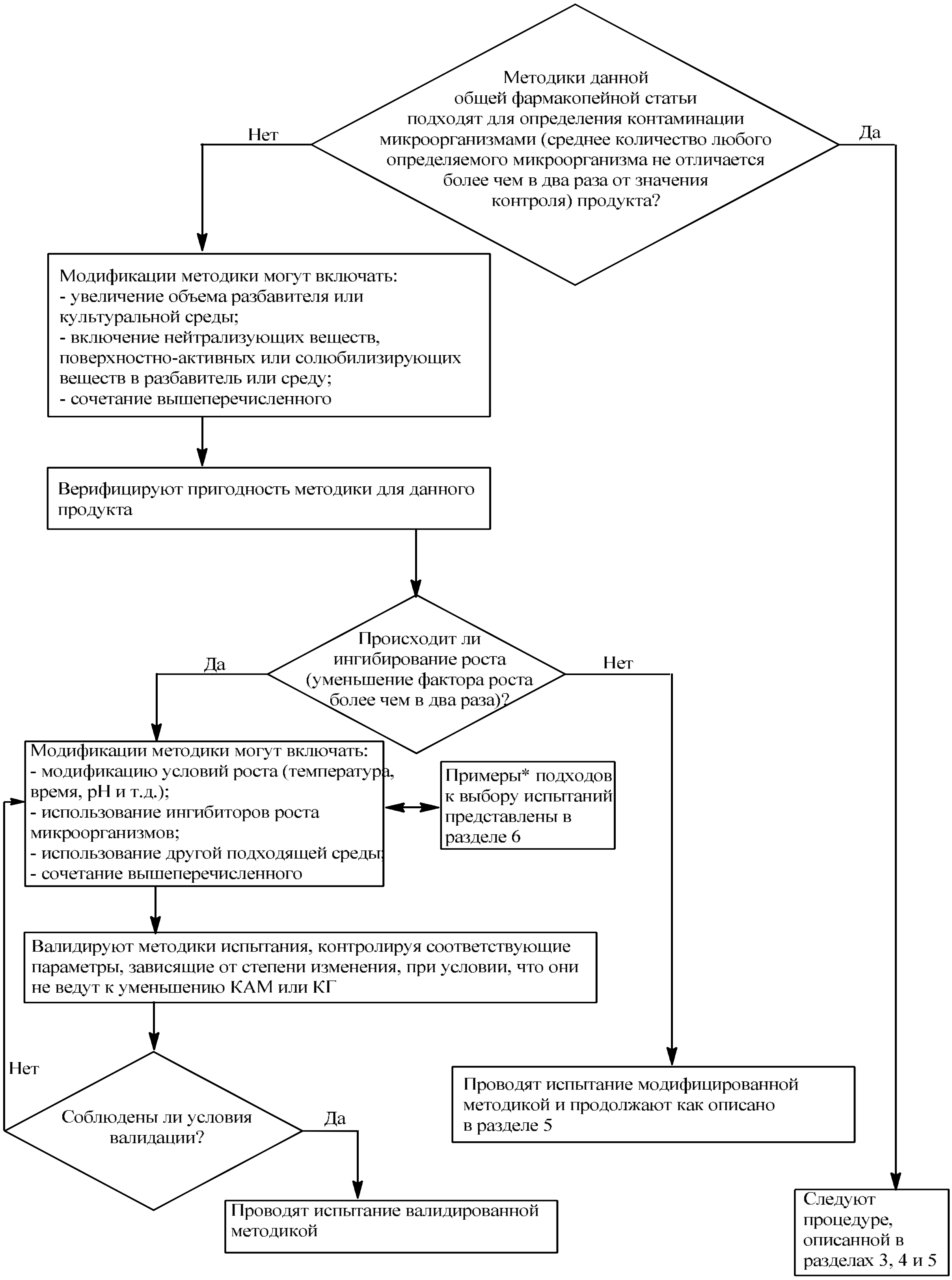
Если для этой цели используют инактиваторы, должны быть подтверждены их эффективность и отсутствие токсичности для определяемых контаминирующих микроорганизмов.

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

3.МЕТОДЫ ПОДСЧЕТА

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

Выбор метода зависит от таких факторов, как природа биологического лекарственного препарата, содержащего живые микроорганизмы, и установленный предел микробной контаминации. Выбранный метод должен обеспечивать проведение испытания на количестве образца, достаточном для оценки соответствия установленным критериям приемлемости микробиологического качества. Пригодность выбранного метода должна быть доказана.



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

Рисунок 2.1.6.22.-1. – *Схема принятия решений по методикам определения контаминации аэробными микроорганизмами*

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

4.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Возможность обнаружения контаминации микроорганизмами в присутствии продукта должна быть подтверждена.

Пригодность методики должна быть подтверждена, если в процедуру испытания или в продукт вносят изменения, которые могут повлиять на результат испытаний.

4.2. ПОДГОТОВКА ТЕСТ-ШТАММОВ

Используют стандартизованные стабильные суспензии тест-штаммов или готовят их, 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 2.1.6.22.-1.

Для приготовления суспензий тест-штаммов используют натрия хлорида и пептона забуференный раствор с pH 7,0 или фосфатный буферный раствор с pH 7,2; для суспендирования спор A. brasiliensis к буферному раствору можно добавить 0,05 % полисорбат 80. Используют суспензии в течение 2 ч или в течение 24 ч (в случае хранения при температуре от 2 °C до 8 °C). В качестве альтернативы приготовлению и последующему разведению свежеприготовленной суспензии вегетативных клеток *A. brasiliensis* и *B. subtilis* может быть приготовлена стабильная суспензия спор с последующим использованием подходящего объема суспензии спор для инокуляции. Стабильная суспензия спор может храниться при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего периода времени, установленного при валидации.

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.

4.4. ПРОВЕРКА РОСТОВЫХ СВОЙСТВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Проводят испытание ростовых свойств каждой серии готовой среды и каждой серии среды, приготовленной 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 2.1.6.22.-1), используя для каждого микроорганизма отдельную ёмкость и (или) чашку со средой. Чашки Петри с агаром Сабуро с декстрозой инокулируют небольшим количеством индикаторных микроорганизмов (не более 100 КОЕ), как указано в таблице 2.1.6.22.-1, используя отдельные чашки для каждого вида. Инкубируют в условиях, описанных в таблице 2.1.6.22.-1.

Для плотных питательных сред, полученный рост не должен отличаться более чем в два раза от расчётного значения для инокулята стандартизованной суспензии. Для свежеприготовленного инокулята, рост микроорганизмов должен быть сопоставим с ростом, 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.

4.5. ПРИГОДНОСТЬ МЕТОДА ПОДСЧЕТА В ПРИСУТСТВИИ ПРОДУКТА

4.5.1. Подготовка испытуемого образца.

Методика подготовки испытуемого образца зависит от физических характеристик испытуемого продукта. Если невозможно подтвердить пригодность ни одной из методик, описанных ниже, должна быть разработана альтернативная методика.

Готовят гомогенную суспензию (обычно в разведении 1 : 10) продукта в натрия хлорида и пептона забуференном растворе 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 pH до значения 6–8. Дальнейшие разведения, при необходимости, готовят с использованием этого же разбавителя.

Таблица 2.1.6.22.–1. – *Приготовление и использование тест-микроорганизмов*

Микроорганизм	**Подготовка тест-штамма**	**Ростовые свойства**	**Пригодность метода подсчета в присутствии продукта**

		КАМ	**КГ**	**КАМ**	**КГ**
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 НВЧ: 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 НВЧ: 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 НВЧ: 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 декстрозой или бульон Сабуро 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 Метод НВЧ: 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 декстрозой или картофельный агар с декстрозой 20–25 °С 5–7 сут, или до тех пор, пока не будет выявлено хорошего спороношения	Соево-казеиновый агар ≤ 100 КОЕ 30–35 °С ≤ 5 сут	Агар Сабуро с декстрозой ≤ 100 КОЕ 20–25 °С ≤ 5 сут	Соево-казеиновый агар ≤ 100 КОЕ 30–35 °С ≤ 5 сут Метод НВЧ: не применимо	Агар Сабуро с глюкозой ≤ 100 КОЕ 20–25 °С ≤ 5 сут

4.5.2. Инокуляция и разведение

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

Для подтверждения приемлемого роста тест-микроорганизмов в присутствии продукта в испытании используют наименьшее разведение для подготовки образца. Если это невозможно в связи с ингибирующей активностью продукта должен быть разработан подходящий протокол (см. схему принятия решений, рис. 2.1.6.22.-1). Если ингибирование роста микроорганизмов невозможно избежать другим способом, аликвота суспензии тест-штаммов микроорганизмов может быть добавлена после нейтрализации антимикробного действия или разбавления.

Ингибирующая активность. Количество микроорганизмов, восстановивших жизнеспособность из подготовленного образца, разведенного как описано в разделе 4.5.2 данной общей фармакопейной статьи и инкубированного согласно методике, описанной в разделе 4.5.3 данной общей фармакопейной статьи, сравнивают с количеством микроорганизмов, восстановивших жизнеспособность в контроле.

Если рост ингибируется более чем в два раза, следуют схеме принятия решения на рисунке 2.1.6.22.-1 и модифицируют методику для обеспечения достоверных результатов. Модификация методики может включать, например, (1) увеличение объема разбавителя (растворителя) или культуральной среды, (2) введение специфических или общих нейтрализующих веществ в разбавитель (растворитель), (3) мембранную фильтрация, или (4) сочетание вышеперечисленных способов.

Если рост по-прежнему ингибируется более чем в два раза, то продолжают следовать схеме принятия решений на рисунке 2.1.6.22.-1.

Новый подход необходимо обосновать, используя соответствующие параметры, зависящие от степени модификации, при условии, что она не ведет к уменьшению КАМ или КГ.

4.5.3. Восстановление жизнеспособности тест-микроорганизмов в присутствии продукта

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

4.5.3.1. Чашечные методы. При использовании чашечных методов испытание проводят минимум в двух повторностях для каждой среды и затем рассчитывают среднее значение.

4.5.3.1.1. Метод глубинного посева. В чашку Петри диаметром 9 см добавляют 1 мл испытуемого образца, приготовленного как описано в разделах 4.5.1 и 4.5.2 данной общей фармакопейной статьи, и от 15 мл до 20 мл соево-казеинового агара или агара Сабуро с декстрозой, температура обеих сред должна быть не более 45 °C. Если используют чашки Петри большего размера, то количество агаризованной среды должно быть соответственно увеличено. Для каждого микроорганизма, перечисленного в таблице 2.1.6.22.-1, используют не менее двух чашек Петри. Инкубируют чашки как указано в таблице 2.1.6.22.-1. Учитывают среднее арифметическое значение количества колоний на каждой среде и рассчитывают количество КОЕ в исходном инокуляте.

4.5.3.1.2. Метод поверхностного посева. В чашку Петри диаметром 9 см, добавляют от 15 мл до 20 мл соево-казеинового агара или агара Сабуро с декстрозой температурой около 45 °C и выдерживают до затвердевания. Если используют чашки Петри большего размера, количество агаризованной среды должно быть соответственно увеличено. Сушат чашки, например, в ламинарном шкафу или инкубаторе. Для каждого микроорганизма, перечисленного в таблице 2.1.6.22.-1 используют не менее двух чашек Петри. На поверхность среды инокулируют не менее 0,1 мл испытуемого образца, подготовленного как описано в разделах 4.5.1 и 4.5.2 данной общей фармакопейной статьи. Инкубируют и рассчитывают количество КОЕ в исходном инокуляте как описано в разделе 4.5.3.1.1 данной общей фармакопейной статьи.

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

Готовят серию из не менее трёх последовательных десятикратных разведений образца, содержащего живые микроорганизмы, как описано в разделах 4.5.1 и 4.5.2 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. В среду, при необходимости, может быть добавлено поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80). Таким образом, при использовании трёх степеней разведения, посев (инокуляцию) проводят в девять пробирок.

Инкубируют все пробирки при температуре от 30 °C до 35 °C в течение не более трёх суток. Если интерпретация результатов осложнена или они неточные из-за природы испытуемого продукта, проводят инокуляцию в соево-казеиновый бульон или соево-казеиновый агар, инкубируют в течение одних или двух суток при той же температуре и используют эти результаты. Определяют наиболее вероятное число микроорганизмов на грамм или миллилитр испытуемого продукта согласно таблице 2.1.6.22.-2.

4.6. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Чашечные методы считают пригодными, если среднее количество тест-микроорганизмов не отличается более чем в два раза от контрольного значения (в отсутствии продукта), определённого как указано в разделе 4.5.2 данной общей фармакопейной статьи. Метод наиболее вероятных чисел считают пригодным, если рассчитанное значение для инокулята находиться в пределах 95 % доверительного интервала результатов, полученных в контроле.

Если перечисленные критерии не могут быть выполнены, то следуют схеме принятия решений на рисунке 2.1.6.22.-1, и модифицируют методику для обеспечения достоверных результатов.

5. ИСПЫТАНИЕ ПРОДУКТА, СОДЕРЖАЩЕГО ЖИВЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

5.1. КОЛИЧЕСТВО ПРОДУКТА ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ

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

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. Чтобы получить требуемое количество образца смешивают содержимое из достаточного числа упаковок.

Таблица 2.1.6.22.-2. – *Наиболее вероятное число микроорганизмов*

Комбинации количества пробирок в каждом ряду, в которых наблюдают рост			**НВЧ на грамм или на миллилитр биологического лекарственного препарата, содержащего живые микроорганизмы**	**95 % доверительный интервал**
Количество грамм или миллилитров продукта в пробирке				
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	

5.2. ИСПЫТАНИЕ

5.2.1. Чашечные методы

5.2.1.1. Метод глубинного посева. Готовят испытуемый образец, используя подходящую методику, как описано в разделе 3. Для каждой среды используют не менее двух чашек Петри для каждого из разведений. Инкубируют чашки с соево-казеиновым агаром при температуре от 30 °C до 35 °C в течение от трех суток до пяти суток и чашки с агаром Сабуро с глюкозой при температуре от 20 °C до 25 °C в течение от пяти суток до семи суток. Отбирают 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. Из результатов среднего арифметического количества на культуральную среду рассчитывают количество КОЕ на грамм или на миллилитр продукта.

5.2.1.2. 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 две чашки Петри. Инкубацию и расчет количества КОЕ контаминант проводят, как описано для метода глубинного посева.

5.2.2. Метод наиболее вероятных чисел.

Проводят подготовку и разводят испытуемый образец, используя подходящую методику, как описано в разделе 3 данной общей фармакопейной статьи. Инкубируют все пробирки при температуре от 30 °C до 35 °C в течение от трех суток до пяти суток. Если необходимо, используют подходящую процедуру пересева. Для каждого из разведений считают число пробирок, в которых обнаруживается рост микроорганизмов. Определение наиболее вероятного числа контаминирующих микроорганизмов на грамм или миллилитр продукта проводят согласно таблице 2.1.6.22.-2.

5.3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Количество контаминирующих аэробных микроорганизмов (КАМ) 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 КАМ. Суммарное количество дрожжевых и плесневых грибов считают равным количеству КОЕ, выявленному с использованием агара Сабуро с декстрозой; если в этой среде обнаруживают колонии бактерий-контаминантов, они могут быть исключены из КГ. В случае, если предполагают превышение критериев приемлемости КГ ввиду бактериального роста, может быть использован агар Сабуро с декстрозой, содержащий антибиотики (смотри рис 2.1.6.22.-1, схема принятия решений). Если подсчет осуществляют методом наиболее вероятных чисел, то рассчитанное значение учитывают, как КАМ.

Критерий 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 так далее.

Рекомендуемые растворы и среды описаны в общей фармакопейной статье *2.1.6.7. Микробиологические испытания нестерильных продуктов: отдельные виды микроорганизмов*.

6. ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ КОНТАМИНАЦИИ ПРИ НАЛИЧИИ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРОДУКТА, СОДЕРЖАЩЕГО ЖИВЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

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

Каждый подход к выбору методики необходимо обосновать, используя соответствующие параметры, зависящие от степени модификации, при условии, что оно не ведет к уменьшению КАМ или КГ.

Используют тест-штаммы, указанные в таблице 2.1.6.22.-1. Подготовку 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 инокуляции небольшого количества (не более 100 КОЕ) микроорганизмов на каждую серию среды. Полученный рост, определенный с использованием соево-казеинового агара (КАМ) или агара Сабуро с декстрозой (КГ), не должен отличаться более чем в два раза от значения, рассчитанного для используемого инокулята.

6.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНТАМИНИРУЮЩИХ АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Если лекарственный препарат, содержащий живые микроорганизмы, содержит молочнокислые бактерии, то испытание на контаминацию аэробными микроорганизмами проводят на чашках Петри с агаром, не содержащим сахаров, инкубируя при температуре от 30 °C до 35 °C в течение 72 ч. Молочнокислые бактерии растут медленно, в виде точечных колоний, в то время как контаминирующие микроорганизмы можно легко обнаружить в виде больших и быстрорастущих колоний.

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 от 30 °C до 35 °C в течение от 44 ч до 48 ч. Добавление крови усиливает рост контаминирующих микроорганизмов и формирование морфологически отличимых колоний, что облегчает возможность их дифференцирования от присутствующих молочнокислых бактерий.

Если лекарственный препарат, содержащий живые микроорганизмы, содержит споры *Bacillus clausii,* то испытания на контаминацию аэробными микроорганизмами могут быть проведены на спорообразующем агаре. Среда, способствующая споруляции *Bacillus clausii*, подавляет вегетативный рост микроорганизмов продукта, что делает возможным обнаружение микроорганизмов-контаминантов. Чашки Петри инкубируют при температуре от 33 °C до 37 °C в течение 48 ч.

Если лекарственный препарат, содержащий живые микроорганизмы, 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 от 30 °C до 35 °C в течение от трех до пяти суток.

Если для лекарственного препарата, содержащего живые микроорганизмы, для определения общего количества аэробных контаминирующих микроорганизмов отсутствуют подходящие среды и условия роста, то проверяют 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 *2.1.6.23 Микробиологические испытания лекарственных средств, содержащих живые микроорганизмы: испытания на отдельные виды микроорганизмов*, но и, основываясь на оценке рисков, проводят испытания на другие контаминирующие микроорганизмы (например, отдельные контаминанты из окружающей среды).

6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЭРОБНЫХ КОНТАМИНИРУЮЩИХ ДРОЖЖЕВЫХ И ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

Если продукт содержит бактерии, то испытание на контаминацию аэробными дрожжевыми и плесневыми грибами может быть выполнено с использованием агара Сабуро с декстрозой, содержащего антимикробное средство (например, хлорамфеникол), инкубируя при температуре от 20 °C до 25 °C в течение от пяти суток до семи суток.

Если продукт содержит *Saccharomyces cerevisiae*, тип *boulardii*, содержание дрожжевых и плесневых грибов может быть определено с использованием нескольких сред (агар Сабуро с декстрозой дополненный хлорамфениколом и циклогексимидом, агар Чапека-Докса, картофельный агар с декстрозой).