ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 72512— 2026

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Методы микробиологического анализа

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2026

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 января 2026 г. № 52-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2026

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Условия выполнения испытаний и требования безопасности 2
4 Сущность метода 3
5 Средства измерений, аппаратура, материалы, реактивы и питательные среды 3
6 Отбор и подготовка проб к проведению испытаний. 5
7 Подготовка к испытанию 5
8 Проведение испытания 13
9 Проведение испытания на стерильность методом мембранной фильтрации. 15
10 Учет и оценка результатов 16
Библиография 18

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Методы микробиологического анализа

Medicine remedies biological for veterinary use. Methods of microbiology analysis

Дата введения — 2026—04—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на биологические лекарственные средства для ветеринарного применения (далее — биологические препараты), содержащие инактивированные и живые микроорганизмы, и устанавливает методы микробиологического анализа.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 177 Водорода перекись. Технические условия

ГОСТ 2493 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3164 Масло вазелиновое медицинское. Технические условия

ГОСТ 3760 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

ГОСТ 4159 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4172 Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный. Технические условия

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4209 Реактивы. Магний хлористый 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4232 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4234 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4523 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 5100 Сода кальцинированная техническая. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 9871 Термометры стеклянные ртутные электроконтактные и терморегуляторы. Технические условия

ГОСТ 10444.1 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 11773 Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 20730 Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных целей). Технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29112 Среды питательные плотные (для ветеринарных целей). Общие технические условия

ГОСТ 29230 (ИСО 835—4—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

ГОСТ Р 55064 Натр едкий технический. Технические условия

ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ Р 70295 Глюкоза кристаллическая. Технические условия

ГОСТ OIML R76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которые дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Условия выполнения испытаний и требования безопасности

3.1 Условия проведения испытаний

3.1.1 Общие требования проведения микробиологических исследований и работы с микроорганизмами I—IV групп патогенности — по ГОСТ ISO 7218.

3.1.2 Микробиологические анализы проводят в асептических условиях, чтобы избежать микробной контаминации во время посева, используя ламинар-бокс, бокс или помещение соответствующего класса чистоты. Меры, предотвращающие контаминацию, не должны оказывать губительного влияния на микроорганизмы, которые могут содержаться в испытуемых образцах биологических препаратов. Условия проведения испытаний должны регулярно контролироваться в соответствии с правилами надлежащей производственной и лабораторной практик.

Примечание — Допустимо использование вместо ламинар бокса и бокса иных интегрированных инженерных решений по обеспечению асептических условий (например, ШББ 2 класса и т. д).

3.1.3 Требования к персоналу для лабораторий, аккредитованных в национальной системе аккредитации, — по ГОСТ ISO 7218 и [1], для организаций, работающих в соответствии с правилами надлежащего производства, — по [1].

К проведению испытаний допускаются квалифицированные сотрудники, имеющие допуск к работе с микроорганизмами в соответствии с документами, определяющими требования к безопасности при работе с микроорганизмами.

3.2 Требования безопасности

Требования безопасности при работе с химическими реактивами — по ГОСТ 12.1.007, с электрооборудованием — по ГОСТ 12.1.019. Требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.004.

Примечание — При нарушении целостности ампул (флаконов) и загрязнении препаратом поверхности стола, на котором проводят испытание, допускается провести обработку загрязненной поверхности 70 %-ным раствором этилового спирта по ГОСТ 5962, раствором хлорамина Б (содержание активного хлора — АХ не менее 26 %), 6 %-ным раствором перекиси водорода по ГОСТ 177 или другими дезинфицирующими средствами.

4 Сущность метода

Сущность метода микробиологического анализа заключается в определении полного отсутствия микрофлоры для биологических препаратов, содержащих инактивированные микроорганизмы (стерильности), или отсутствия посторонней микрофлоры в биологических препаратах, содержащих живые микроорганизмы (микробиологической чистоты) при высеве их на селективные питательные среды.

5 Средства измерений, аппаратура, материалы, реактивы и питательные среды

5.1 Для проведения испытания применяют:

- весы высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с поверочным интервалом *e* не более 0,1 г и действительной ценой деления *d* не более 0,01 г;
- шкаф сушильный лабораторный с диапазоном автоматически поддерживаемой температуры нагрева от 50 °С до 200 °С; погрешность стабилизации температуры в рабочей камере при установившемся режиме ± 3 °С;
- термометры ртутные стеклянные электроконтактные с диапазоном измерения температуры от 50 °С до 200 °С и ценой деления 1 °С по ГОСТ 9871;
- термометры максимальные типа СП — 83 М с диапазоном измерения температуры от 50 °С до 250 °С и ценой деления 1 °С по ГОСТ 9871;
- шкаф ламинарный II класса биологической безопасности;
- термостат электрический с автоматическим терморегулятором, обеспечивающий поддержание температуры нагрева от 20 °С до 55 °С, а также инкубацию посевов в аэробных и микроаэрофильных условиях (в атмосфере азота, содержащего 5 % — 10 % диоксида углерода) по ГОСТ ISO 7218;
- pH-метр с точностью калибровки ± 0,1 pH при температуре от 20 °С до 25 °С по ГОСТ ISO 7218;
- дистиллятор;
- штативы для пробирок металлические или из полимерных материалов;
- холодильник по ГОСТ ISO 7218;
- пипетки мерные вместимостью 1 и 2 $см^3$ по ГОСТ 29230;
- флаконы стеклянные вместимостью 100 и 200 $см^3$;
- пробирки стеклянные по ГОСТ 25336;
- воронки стеклянные по ГОСТ 25336;
- груши резиновые;
- фильтры для мембранной фильтрации;
- аппарат Кротова или аналогичный;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- воду водопроводную;
- воду дистиллированную по ГОСТ Р 58144 или воду очищенную;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный по ГОСТ 4172;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- натрия гидроокись по ГОСТ Р 55064;
- натрия тиогликолят;
- резазурина натриевая соль, массовая доля основного вещества не менее 85 %, ч.д.а или ч;
- натрия гидрофосфат по ГОСТ 11773;
- калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198;
- калий хлористый по ГОСТ 4234;
- кальция хлорид безводный;
- калия дигидрофосфат по ГОСТ 2493;
- магний сернокислый по ГОСТ 4523;
- магний хлористый по ГОСТ 4209;

- калий йодистый по ГОСТ 4232;
- аммиак водный по ГОСТ 3760, раствор с массовой долей 10 %;
- кислоту соляную по ГОСТ 3118, раствор с массовой долей 1 % — 2 %;
- кислоту тиогликолевую плотностью 1,325;
- водорода перекись по ГОСТ 177, раствор с массовой долей 3 % и 6 %.
- йод кристаллический по ГОСТ 4159;
- D-глюкозу по ГОСТ Р 70295;
- глюкозы моногидрат;
- масло вазелиновое по ГОСТ 3164;
- хлорамин раствор с массовой долей 26 %;
- фенол, раствор с массовой долей 3 %;
- известь хлорную массовой долей активного хлора не менее 32 %;
- соду кальцинированную по ГОСТ 5100;
- порошок стиральный;
- фуксин основной;
- среду тиогликолевую;
- агар мясо-пептонный с массовой долей глюкозы 0,5 % (МПА) по ГОСТ 29112;
- бульон мясо-пептонный с массовой долей глюкозы 0,5 % (МПБ) по ГОСТ 20730;
- бульон мясо-пептонный печеночный под вазелиновым маслом с массовой долей глюкозы 0,5 %, агара 0,2 % (Среда Китта — Тароцци);
- воду мясную по ГОСТ 10444.1;
- воду печеночную по ГОСТ 10444.1;
- среду Сабуро;
- среды для обнаружения микоплазм:
  - среду Хейфлика;
  - среду Фрея;
  - среду Фриса;
  - среду Каган;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206;
- пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805;
- казеина гидролизат панкреатический или пептон Мартена;
- экстракт дрожжевой;
- раствор цистеина гидрохлорида концентрацией 10 г/дм^3;
- кислоту дезоксирибонуклеиновую, стерильный раствор концентрацией 2 г/дм^3;
- натриевую или калиевую соль пенициллина концентрацией 20000 МЕ/см^3;
- раствор β-никотинамидадениндинуклеотида концентрацией 10 г/см^3;
- раствор натрия хлорида изотонический с массовой долей натрия хлорида 0,9 %;
- фосфатно-буферный раствор с пептоном;
- *DEAE*-декстран;
- сердце говяжье;
- экстракт мозга теленка;
- экстракт мясной;
- сыворотку лошадиную стерильную;
- сыворотку свиную стерильную;
- гидролизат муки соевой;
- биотин;
- кальция пантотенат;
- холина хлорид;
- кислоту фолиевую;
- *i*-инозит;
- никотинамид;
- пиридоксина гидрохлорид;
- рибофлавин;
- тиамина гидрохлорид;
- цистин;
- твин-80.

5.2 Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не ниже указанных.

5.3 Допускается использование готовых и сухих питательных сред, приготовленных по прописи производителя, или альтернативных питательных сред при условии подтверждения их соответствия требованиям по ростовым свойствам в отношении соответствующих штаммов микроорганизмов.

5.4 Вместо оборудования и материалов многократного использования (чашек Петри, пипеток, пробирок, флаконов, бутылок) может использоваться одноразовое оборудование и материалы, если они аналогичны по техническим характеристикам, подходят для использования в микробиологии и не содержат веществ, подавляющих рост микроорганизмов.

6 Отбор и подготовка проб к проведению испытаний

6.1 Для испытания отбирают образцы биологических препаратов в количестве достаточном для проведения испытаний по выбранной методике (но не менее четырех единиц ампул/флаконов) независимо от объема серии, если нет других указаний в нормативном документе на конкретный биологический препарат.

Примечание — Если объем препарата в ампуле/флаконе недостаточен для посева, содержимое ампул/флаконов допускается объединять (объединенная проба), при этом количество отобранных ампул/флаконов увеличивают.

Вскрытие первичной упаковки с биологическим препаратом осуществляют с соблюдением требований для асептического посева. Ампулы и пробки флаконов протирают антисептиком и фламбируют.

6.2 Пробы сухих биологических препаратов предварительно разводят до первоначального объема стерильным растворителем (изотонический раствор хлорида натрия 0,9 %-ный, дистиллированная вода, вода очищенная), если не указано другое в нормативном документе на конкретный биологический препарат.

6.3 Высев из жидких биологических препаратов производят непосредственно из каждого флакона или ампулы (объединенной пробы из ампул/флаконов, доведенной до требуемого объема). Перед высевом содержимое ампул или флаконов перемешивают до получения гомогенной взвеси.

6.4 На каждую питательную среду высевают по 1 $см^3$, если нет других указаний в нормативном документе на конкретный биологический препарат.

Примечание — Объем питательной среды для посева должен, по меньшей мере, превышать объем образца в 10 раз.

7 Подготовка к испытанию

7.1 Подготовка лабораторной посуды

7.1.1 Новую лабораторную посуду кипятят в течение 15 мин в 1—2 %-ном растворе соляной кислоты, затем промывают водопроводной водой и моют ершом в растворе, содержащем на 1000 $см^3$ дистиллированной воды 30 г стирального порошка и 50 $см^3$ водного аммиака. После этого посуду тщательно промывают сначала водопроводной водой, а затем три раза дистиллированной или очищенной водой, высушивают и стерилизуют.

7.1.2 Стерилизуют посуду в автоклаве при температуре (121 ± 3) °С в течение не менее 15 мин или в сушильном шкафу при температуре (170 ± 10) °С в течение не менее 1 ч.

7.2 Подготовка бокса

7.2.1 Накануне работы, а также сразу после ее окончания бокс и предбоксник подвергают тщательной уборке и дезинфекции, например, 3 %-ным раствором перекиси водорода с добавлением горячего (50 °С — 60 °С) мыльно-содового раствора. Можно применять антисептики, содержащие хлорактивные соединения (антисептол и др.), а также другие дезинфицирующие средства аналогичного действия, обеспечивающие качество обработки. При работе с дезинфектантами необходимо соблюдение требований техники безопасности.

Норма расхода дезинфицирующего раствора 70—100 $см^3/м^2$ при влажной уборке. Раствор готовят непосредственно перед применением.

7.2.2 По окончании микробиологических работ все рабочие поверхности подвергают тщательной дезинфекции по режиму обеззараживания соответствующего патогена в соответствии с общими требованиями работ с микроорганизмами.

7.2.3 В каждом боксе должны быть установлены бактерицидные лампы из расчета 2,0—2,5 В на 1 $м^3$. Лампы размещают на потолке и на стенах. Бокс облучают до начала проведения испытания в течение времени, необходимого для проведения дезинфекции в зависимости от мощности используемых лам, но не менее 30 мин. Во время работы в боксе лампы должны быть выключены. Возможно использование передвижных ламп, рециркуляторов, обеззараживающих воздух в присутствии людей.

7.2.4 Чистоту воздуха в боксе проверяют один раз в неделю, используя аппараты, предназначенные для этих целей (аппарат Кротова и др.), или методом экспозиции чашек Петри с плотными питательными средами (МПА, среда Сабуро) в течение 15 мин с последующим культивированием в термостате чашек Петри с МПА при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч и чашек Петри со средой Сабуро при температуре (22,5 ± 2,5) °С в течение 7 сут соответственно и определением количества выросших колоний и видовой принадлежности микроорганизмов (седиментационный метод).

7.2.5 Допускается применять другие методы проверки обсемененности воздуха микроорганизмами, например аспирационный метод, представляющий собой исследование проб воздуха объемом до 100 $м^3$ посредством пропускания воздуха пробоотборником через фильтры в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора, предназначенного для этого метода, и последующим выделением и высевом микроорганизмов по 7.2.4 с последующим перерасчетом на 1 $м^3$ воздуха. При наличии роста колоний дрожжевых и плесневых грибов их также подсчитывают и делают перерасчет на 1 $м^3$. В протоколе количество дрожжевых и плесневых грибов указывают отдельно.

Примечание — При переносе аппаратов и устройств для отбора проб воздуха из одного помещения в другое их поверхность обрабатывают дезинфицирующим средством.

7.2.6 Допускается наличие не более трех колоний на чашке Петри при исследовании седиментационным методом и не более 500 КОЕ/$м^3$ при исследовании аспирационным методом. При превышении указанных значений обсемененности воздуха в боксе работу прекращают и проводят комплекс санитарно-гигиенических мероприятий с последующим контролем микробной обсемененности воздуха.

7.2.7 При превышении указанных в 7.2.6 значений обсемененности воздуха в боксе результаты контроля биологического препарата на стерильность считают недостоверными и исследования повторяют.

7.3 Приготовление антисептических растворов

7.3.1 Приготовление раствора антисептола

Для приготовления раствора антисептола берут раствор хлорной извести массовой долей 50 % и раствор кальцинированной соды массовой долей 5 %, сливают в равных объемах и перед применением разбавляют водопроводной водой в соотношении 1:50.

7.3.2 Приготовление мыльно-содового раствора

Для приготовления мыльно-содового раствора берут 10 г соды, 10 г стирального порошка и 5 $см^3$ нашатырного спирта, растворяют в 1 $дм^3$ водопроводной воды.

7.4 Общие требования, предъявляемые к приготовлению и хранению питательных сред

7.4.1 Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления, а также испытанию микробиологических критериев качества, ростовых и селективных свойств питательных сред — по ГОСТ ISO 11133.

7.4.2 Готовить питательные среды следует, строго придерживаясь приведенной рецептуры, а сухие питательные среды — согласно инструкции по применению организации-производителя. Необходимый pH питательных сред устанавливают при температуре (25 ± 2) °С. Среды стерилизуют в автоклаве в течение 15 мин при температуре (121 ± 3) °С, если нет других указаний в нормативном документе на конкретный биологический препарат.

7.4.3 После стерилизации не менее 5 % пробирок или чашек от каждой партии питательной среды помещают в термостат и инкубируют в течение 14 сут параллельно с посевом на стерильность и определением ростовых свойств.

7.5 Приготовление питательных сред

7.5.1 Приготовление смеси витаминов

Для приготовления смеси витаминов берут 100 мг биотина, 100 мг пантотената кальция, 100 мг хлорида холина, 100 мг фолиевой кислоты, 200 мг *i*-инозита, 100 мг никотинамида, 100 мг гидрохлорида пиридоксина, 10 мг рибофлавина, 100 мг гидрохлорида тиамина, смешивают в стерильных условиях и доводят объем раствора стерильной дистиллированной водой до 1000 см^3. Готовую смесь стерилизуют автоклавированием в течение 10—15 мин при 110 °С. Используется как компонент для приготовления среды Фрея.

Срок хранения смеси витаминов в защищенном от света месте при комнатной температуре — не более 1 мес.

7.5.2 Приготовление бульона экстракта говяжьего сердца

Для приготовления бульона экстракта говяжьего сердца смешивают 500 г говяжьего сердца, 10 г ферментативного пептона, 5 г хлорида натрия, доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 см^3, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют автоклавированием по 7.4.2. Используют как компонент для приготовления среды Хейфлика.

7.5.3 Приготовление сбалансированного солевого раствора Хэнкса (модифицированного)

Для приготовления сбалансированного модифицированного солевого раствора Хэнкса берут 6,4 г хлорида натрия, 0,32 г хлорида калия, 0,08 г сульфата магния, 0,08 г хлорида магния, 0,112 г безводного хлорида кальция, 0,0596 г гидрофосфата дигидрата натрия, 0,0048 г безводного дигидрофосфата калия и доводят объем раствора дистиллированной водой до 800 см^3. Стерилизуют методом мембранной фильтрации, изложенным в разделе 9.

Используют как компонент для приготовления среды Фриса.

7.5.4 Приготовление бульона из экстракта сердца и мозгов

Для приготовления бульона из экстракта сердца и мозгов берут 200 г экстракта мозга теленка, 250 г экстракта говяжьего сердца, 10 г ферментативного пептона, 2 г моногидрата глюкозы, 5 г хлорида натрия, 3,5 г безводного гидрофосфата натрия и доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 см3, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют автоклавированием по 7.4.2.

Используют для приготовления среды Фриса.

7.5.5 Приготовление бульона *PPLO*

Для приготовления бульона *PPLO* берут 50 г экстракта говяжьего сердца, 10 г ферментативного пептона, 5 г хлорида натрия и доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 см^3, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют автоклавированием по 7.4.2.

Используют для приготовления среды Фриса.

7.5.6 Приготовление жидкой тиогликолевой среды

Для приготовления жидкой тиогликолевой среды берут 0,50—0,75 г *L*-цистеина, 0,75 г гранулированного агар-агара массовой долей влаги не более 15 %, 2,5 г хлористого натрия, 5,5 г моногидрата глюкозы, 5,0 г водорастворимого дрожжевого экстракта, 15,0 г панкреатического гидролизата казеина, 0,3 г тиогликолевой кислоты или 0,5 г тиогликолята натрия, доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 см^3 и нагревают до полного растворения компонентов. Затем добавляют 1,0 см^3 свежеприготовленного раствора резазурина натрия (1:1000), перемешивают и разливают в пробирки соответствующего объема. Среду стерилизуют автоклавированием по 7.4.2. pH среды после стерилизации 7,1 ± 0,2.

7.5.7 Приготовление жидкой соево-казеиновой среды

Для приготовления жидкой соево-казеиновой среды берут 17,0 г панкреатического гидролизата казеина, 3,0 г гидролизата соевой муки, 5,0 хлорида натрия, 2,5 г калия фосфата двузамещенного, 2,5 г глюкозы, доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 см^3 и нагревают до полного растворения компонентов. Охлаждают до комнатной температуры. Если требуется, добавляют 1 моль/дм^3 раствор едкого натра, чтобы pH после стерилизации был 7,3±0,2. Далее раствор фильтруют для получения прозрачной среды, разливают по пробиркам и стерилизуют автоклавированием по 7.4.2.

Для получения плотной питательной среды к готовой жидкой соево-казеиновой среде добавляют 10—20 г агара.

7.5.8 Приготовление жидкой среды Сабуро

Для приготовления жидкой среды Сабуро в 1000 см^3 дистиллированной воды добавляют 10 г сухого ферментативного пептона, кипятят в течение 10 мин, фильтруют и добавляют 40,0 г глюкозы,

устанавливают соляной кислотой массовой долей 1 % — 2 % pH (5,6 ± 0,2), разливают в стерильные пробирки и стерилизуют автоклавированием по 7.4.2.

Для получения плотной питательной среды к готовой жидкой среде Сабуро добавляют 10—20 г агара.

7.5.9 Приготовление среды Хейфлика

7.5.9.1 Для приготовления жидкой среды Хейфлика готовят основу среды: берут 90,0 $см^3$ бульона из экстракта говяжьего сердца, 10,0 $см^3$ дрожжевого экстракта концентрацией 250 $г/дм^3$, 5,0 $см^3$ раствора фенолового красного концентрацией 0,6 $г/дм^3$, доводят до кипения и кипятят в течение 10 мин. Среду стерилизуют автоклавированием по 7.4.2.

7.5.9.2 Основу среды охлаждают до температуры 40 °С — 45 °С и добавляют 20,0 $см^3$ стерильной лошадиной сыворотки, не подвергнутой нагреву и проверенной на контаминацию микоплазмами, 1,20 $см^3$ стерильного раствора дезоксирибонуклеиновой кислоты концентрацией 2,0 $г/дм^3$ и 0,25 $см^3$ пенициллина с содержанием пенициллина 20000 МЕ/$см^3$. Значение pH доводят до 7,8 раствором едкого натра массовой концентрацией 10 %. Среду не стерилизуют.

7.5.9.3 Для приготовления плотной среды к основе жидкой среды Хейфлика по 7.5.9.1 добавляют агар в концентрации 15 $г/дм^3$, стерилизуют автоклавированием по 7.4.2, охлаждают до температуры 40 °С — 45 °С и добавляют компоненты по 7.5.9.2.

Среда рекомендуется для обнаружения микоплазм.

7.5.10 Приготовление среды Фрея

Среда рекомендуется для обнаружения *Mycoplasma synovviae*

Для приготовления жидкой среды Фрея смешивают 90,0 $см^3$ бульона из экстракта говяжьего сердца, 2,0 $см^3$ раствора моногидрата глюкозы концентрацией 500 $г/дм^3$, 5,0 $см^3$ раствора фенолового красного концентрацией 0,6 $г/дм^3$. Стерилизуют автоклавированием по 7.4.2, охлаждают до температуры 40 °С—45 °С и добавляют 12,0 $см^3$ стерильной свиной сыворотки, инактивированной при температуре 56 °С в течение 30 мин, 0,25 $см^3$ пенициллина с содержанием пенициллина 20000 МЕ/$см^3$, 0,025 $см^3$ смеси витаминов по 7.5.1, 1,0 $см^3$ раствора β-никотинамидадениндинуклеотида концентрацией 10 $г/см^3$ и 1,0 $см^3$ раствора цистеина гидрохлорида концентрацией 10 $г/дм^3$.

7.5.11 Приготовление среды Фриса

Среда рекомендуется для обнаружения микоплазм, кроме птичьих.

Для приготовления жидкой среды Фриса берут 800 $см^3$ сбалансированного модифицированного солевого раствора Хенкса, 67,0 $см^3$ дистиллированной воды, 135 $см^3$ бульона из экстракта из сердца и мозгов, 248 $см^3$ бульона *PPLO*, 60 $см^3$ дрожжевого экстракта концентрацией 170 $г/дм^3$, 4,5 $см^3$ фенолового красного концентрацией 5 $г/дм^3$. Среду стерилизуют автоклавированием по 7.4.2, охлаждают до температуры 40 °С—45 °С, значение pH доводят до 7,40—7,45 и добавляют стерильно 165 $см^3$ стерильной лошадиной сыворотки, 165 $см^3$ стерильной свиной сыворотки, проверенных на контаминацию микоплазмами, 250 мг бацитрацина и 250 мг бензинпенициллина.

Для приготовления плотной среды Фриса смешивают 800 $см^3$ сбалансированного модифицированного солевого раствора Хенкса, 200 мг DEAE — декстрана и 15,65 мг очищенного агара. Полученную смесь стерилизуют автоклавированием по 7.4.2 и добавляют к 1740 $см^3$ жидкой среды Фриса.

7.5.12 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 $см^3$ (сухой — 20 г);
- мясная вода — 400 $см^3$ или мясной экстракт — 13 г (3,0 % — 3,5 % сухих веществ на 1 $дм^3$ среды);
- дрожжевой экстракт (экстракт хлебопекарских дрожжей) — 5,0 г (1,5 г сухих веществ на 1 $дм^3$ среды);
- натрия хлорид — 5,0 г;
- вода дистиллированная или вода очищенная — до 1 $дм^3$.

Значение pH готовой среды после стерилизации 7,8 ± 0,1.

Для приготовления жидкой питательной среды в дистиллированную или очищенную воду добавляют гидролизат бычьего сердца, мясной экстракт (или мясную воду), экстракт хлебопекарских дрожжей, хлорид натрия и перемешивают. Доводят pH среды до (8,1 ± 0,1) ед, используя для этого 10 %-ный раствор NaOH. Среду нагревают до кипения, кипятят 2—3 мин и фильтруют. pH готовой среды должен быть (7,8 ± 0,1) ед.pH, если значение pH выше, то для доведения его до нормы используют 5 %-ный раствор соляной кислоты.

Для приготовления полужидкой среды Каган, содержащей 0,3 % агара, вносят 3,0 г агара микробиологического на 1 $дм^3$ жидкой среды. Для приготовления плотной среды Каган, содержащей 1,3 % агара, вносят 13 г агара на 1 $дм^3$ жидкой среды.

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

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

Примечания

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

2 Во все готовые питательные среды вносят стерильный раствор аргинина до конечной концентрации 1 % и стерильный раствор глюкозы до конечной концентрации 1 %. В жидкую среду Каган вносят 5,0 $см^3$ (0,6 г/$дм^3$) стерильного раствора фенолового красного в качестве индикатора роста микоплазм.

3 Полужидкую среду разливают в пробирки по 10 $см^3$ и хранят при температуре от 2 °С до 10 °С в течение 7 сут.

7.5.13 Приготовление стерильного масла вазелинового

Вазелиновое масло разливают во флаконы или колбы вместимостью 100 $см^3$ и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

Масло используют для приготовления среды Китта — Тароцци.

7.5.14 Приготовление среды Китта — Тароцци

250 $см^3$ печеночной воды, 750 $см^3$ мясо-пептонного бульона с pH 7,0 и 1,25 г натрия хлорида смешивают, устанавливают pH 7,6—7,8 и кипятят в течении 15 мин. Среду фильтруют через бумажный фильтр. 100 г печени крупного рогатого скота режут на кусочки массой 1,5—2 г и помещают в пробирки по 2—3 кусочка. Заливают по 8—9 $см^3$ бульона и добавляют по 0,5 $см^3$ вазелинового масла по 7.5.13. Стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 30 мин.

Коммерческую сухую среду готовят согласно указаниям на этикетке.

7.5.15 Приготовление фосфатно-буферного раствора с пептоном

В 1000 см3 очищенной или дистиллированной воды вносят 3,56 г калия фосфорно-кислого однозамещенного, 7,23 г натрия фосфорно-кислого 12-водного, 4,3 г натрия хлористого, 1,0 г пептона. 10 %-ным раствором гидроокиси натрия доводят pH раствора до 7,0—7,1, нагревают до температуры 80 °С — 90 °С и вносят 20 $см^3$ твина-80. Раствор доводят до кипения, кипятят 2—3 мин при постоянном помешивании и фильтруют через бумажный фильтр. Раствор разливают во флаконы по 100 $см^3$. В каждый флакон раскладывают по 2—3 стеклянные бусины. Разлитый во флаконы фосфатно-буферный раствор стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 30 мин.

7.6 Условия хранения питательных сред

7.6.1 Сроки и условия хранения питательных сред — по ГОСТ ISO 11133.

7.6.2 Жидкие питательные среды промышленного производства, готовые к употреблению, хранят в плотно укупоренных сосудах при условии сохранения их стерильности и ростовых свойств в течение срока годности, указанного производителем.

7.6.3 Сухие питательные среды промышленного производства хранят в защищенном от света месте в соответствии с инструкцией производителя. После вскрытия упаковки необходимо записать дату вскрытия и далее хранить при комнатной температуре до окончания срока годности. По истечении срока годности, указанного производителем, среды утилизируют.

7.6.4 Приготовленные из сухих смесей и разлитые во флаконы питательные среды хранят в течение 1 мес при температуре от 2 °С до 25 °С или 3 мес при температуре от 2 °С до 8 °С. Срок годности питательных сред, разлитых в чашки Петри, составляет 7 сут при температуре от 2 °С до 8 °С. Срок годности питательных сред, подтвержденных в ходе валидационных испытаний, может быть иным.

7.6.5 Если при хранении тиогликолевой среды, содержащей резазурин, верхний слой среды (более 1/3 объема) окрасится в розовый цвет, то среду можно регенерировать нагреванием на кипящей водяной бане в течение 10—15 мин до исчезновения розовой окраски, с последующим быстрым охлаждением. Если окраска не исчезает после нагревания, то среду считают непригодной к употреблению. Регенерацию среды можно проводить только один раз.

7.7 Определение ростовых свойств питательных сред

7.7.1 Определение ростовых свойств проводят для каждой партии коммерческой среды (сухой и готовой к использованию), а также для каждой партии среды, приготовленной в лаборатории.

7.7.2 При испытании ростовых свойств питательных сред, используемых для определения бактерий и грибов, в две пробирки со средой вносят культуру тест-штамма, каждого отдельно, согласно таблице 1 в количестве 10—100 КОЕ.

7.7.2.1 При подготовке тест-штаммов микроорганизмов используют тест-штаммы бактерий, грибов и микоплазм из специализированных коллекций, которые должны быть типичными по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам. Число пассажей рабочих культур не должно превышать пяти.

7.7.2.2 Перед испытанием культуры аэробных бактерий высевают на скошенный соево-казеиновый агар или другую адекватную плотную питательную среду; культуры грибов *Candida albicans* и *Aspergillus brasiliensis* — на скошенный агар Сабуро; культуры анаэробов *Clostridium sporogenes* и *Clostridium novyi* — на среды для анаэробных микроорганизмов (например, жидкую тиогликолевую) и инкубируют при соответствующей температуре, указанной в таблице 1. Далее выросшие культуры тест-штаммов бактерий и грибов *Candida albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным 0,9 %-ным раствором хлорида натрия. Готовят взвесь каждого тест-штамма с конечной концентрацией от 10 до 100 КОЕ/см^3.

Таблица 1 — Тест-штаммы микроорганизмов для проверки ростовых свойств питательных сред, используемых для определения бактерий, грибов и микоплазм

Питательная среда	Вид тест-штамма микроорганизмов	Условия инкубации	
		Температура,°С	Время,сут
Жидкая тиогликолевая среда	Аэробные бактерии: Bacillus subtilis ГКПМ 010011, ATCC 6633 или Bacillus cereus ГКПМ 010014, ATCC10702 Staphylcoccus aureus ГКПМ 201108, ATCC 6538-P Pseudomonas aeruginosa ГКПМ 190155, ATCC 9027 Alkaligenes faecalis 415 ГКПМ 300205	32,5 ± 2,5	3 2
	Анаэробные бактерии: Clostridium sporogenes 272, ГКПМ 300524, ATCC 19404 Clostridium novyi 198 ГКПМ 242484*	32,5 ± 2,5	3 2
	Грибы*: Candida albicans NCTC 885-653 ATCC 10231	22,5±2,5	5
Жидкая соево-казеиновая среда	Аэробные бактерии: Bacillus subtilis ГКПМ 010011, ATCC 6633 или Bacillus cereus ГКПМ 010014, ATCC 10702	22,5±2,5	3

Окончание таблицы 1

Питательная среда	Вид тест-штамма микроорганизмов	Условия инкубации	
		Температура,°С	Время,сут
Жидкая соево-казеиновая среда	Грибы: Candida albicans NCTC 885-653 ATCC 10231 Aspergillus brasiliensis ATCC 9642, ATCC 16404	22,5 ± 2,5	5
Жидкая среда Сабуро	Грибы: Candida albicans NCTC 885-653 ATCC 10231 Aspergillus brasiliensis ATCC 9642, ATCC 16404	22,5 ± 2,5	5
Питательные среды для выявления микоплазм	Микоплазмы: Acholeplasma laidlawii NCTC 10116, ATCC 23206 Mycoplasma gallisepticum NCTC 10115, ATCC 19610 Mycoplasma hyorhinis NCTC 23714,10130, ATCC 17981 Mycoplasma orale NCTC 10112, ATCC 23714 Mycoplasma synoviae NCTC 10124, ATCC 25204; Mycoplasma arginine G230 ГКПМ	37,0 ± 1,0	21

* Обозначены тест-штаммы при использовании тиогликолевой среды в качестве универсальной при использовании ИЛП. Культивирование производят при двух температурных режимах (32,5 ± 2,5) °С и (22,5 ± 2,5) °С.

Примечания

1 Могут быть использованы и другие тест-штаммы из различных коллекций, типичные по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Набор тест-штаммов может быть изменен в зависимости от способа применения или состава испытуемого препарата.

2 ATCC — Американская коллекция типовых культур, США.

3 ГКПМ — Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия.

4 NCTC — Национальная коллекция типовых культур.

7.7.2.3 Инкубируют посевы в соответствии с условиями, описанными в таблице 1. Если в течение времени инкубации в средах визуально отмечают рост тест-штамма микроорганизма, среду считают пригодной для использования.

7.7.3 При проведении испытаний на ростовые свойства питательных сред для определения микоплазм в биологических препаратах используют по крайней мере один из видов микоплазм, указанных в таблице 1. При этом учитывают целевое назначение тест-штаммов:

- *Acholeplasma laidlawii* NCTC 10116, ATCC 23206 (вакцины для ветеринарного применения, в производстве которых используются антибиотики);
- *Mycoplasma gallisepticum* NCTC 10115, ATCC 19610 (в случаях, когда при производстве вакцин используются материалы, имеющие птичье происхождение или для вакцин, применяемых в птицеводстве);
- *Mycoplasma hyorhinis* NCTC 10130, ATCC 17981 (вакцины для ветеринарного применения, кроме птичьих);
- *Mycoplasma orale* NCTC 10112, ATCC 23714 (вакцины для ветеринарного применения);
- *Mycoplasma synoviae* NCTC 10124, ATCC 25204 (в случаях, когда для производства вакцин используются материалы, имеющие птичье происхождение, или для вакцин, применяемых в птицеводстве);

- *Mycoplasma arginine* G230 (используется для определения ростовых свойств питательных сред для культивирования микоплазм, контроля ингибирующего действия образца биопрепарата).

7.7.4 Выбранные среды засевают соответствующими тест-штаммами микроорганизмов. На чашку Петри с плотной питательной средой или флакон вместимостью 100 $см^3$, содержащий жидкую питательную среду, вносят не более 100 КОЕ тест-штамма микроорганизма. Для каждого вида микроорганизма используют отдельные чашки и флаконы. Посевы на жидких питательных средах и плотных питательных средах инкубируют согласно режимам, указанным в таблице 1, при этом посевы на плотных средах инкубируют в микроаэрофильных условиях (в атмосфере азота, содержащего 5 % — 10 % диоксида углерода). После инкубации проводят пересевы по 0,2 $см^3$ жидкой среды на плотную среду на седьмой, четырнадцатый и двадцатый день. Плотная среда выдерживает испытание, если наблюдается адекватный рост каждого тест-штамма микроорганизма. Жидкая среда выдерживает испытание, если наблюдается адекватный рост пересеянного с нее тест-штамма микроорганизма на чашках Петри с плотной питательной средой.

7.7.5 Питательные среды должны обеспечивать рост микроорганизмов-контаминантов биологических препаратов.

7.7.6 Готовые питательные среды, проверенные на ростовые свойства, разливают по 6—8 $см^3$ (для определения анаэробных микроорганизмов — по 10—12 $см^3$) в пробирки и по 50—60 $см^3$ во флаконы вместимостью 100 $см^3$.

7.8 Испытание на наличие ингибирующих веществ (антимикробного действия) в биологическом препарате

7.8.1 До проведения испытания биологического препарата на стерильность следует определить наличие в нем антимикробного действия.

7.8.2 Для проверки антимикробного действия испытуемого образца готовят взвеси культур тест-штаммов микроорганизмов в соответствии с таблицей 1 с конечной концентрацией не более 100 КОЕ/$см^3$. Испытание проводят в двух повторностях с каждым микроорганизмом в отдельности.

7.8.3 В шесть пробирок, содержащих по 10 $см^3$ питательной среды, рекомендованной для испытания, вносят по 1 $см^3$ приготовленной взвеси тест-штамма микроорганизма. Далее в две пробирки вносят по 1 $см^3$ исследуемого образца биологического препарата, а в две другие — по 1 $см^3$ соответствующего растворителя (положительный контроль). Посевы инкубируют в соответствии с условиями, указанными в таблице. 1.

7.8.4 Сравнивают рост тест-штаммов микроорганизмов в контрольных и опытных посевах при визуальном просмотре. Если в контроле наблюдают рост тест-штамма микроорганизма, а в опыте рост отсутствует или наблюдается слабый рост, считают, что исследуемый образец обладает бактериостатическим или фунгицидным действием.

7.9 Устранение антимикробного действия

7.9.1 При установлении наличия антимикробного действия в испытуемой пробе препарата используют специфические инактиваторы, указанные в нормативном документе на конкретный биологический препарат.

7.9.2 Неспецифические инактиваторы (твин-20, твин-80, яичный лецитин, натрия тиосульфат и другие) добавляют в буферный раствор и (или) питательные среды, как правило, до стерилизации.

7.9.3 Для разведения исследуемой пробы биологического препарата перед испытанием на стерильность можно использовать нейтрализующую жидкость, приготовленную в лаборатории, или промышленного производства, следующего состава:

- полисорбат-80 (твин-80)..... 30 г;
- лецитин яичный или соевый..... 3 г;
- *L*-гистидин гидрохлорида..... 1 г;
- пептон (мясной или казеиновый) ..... 1 г;
- натрия хлорид..... 4,3 г;
- калия фосфат однозамещенный..... 3,6 г;
- натрия фосфат двузамещенный ..... 7,2 г;
- вода дистиллированная или очищенная ..... до 1000 $см^3$.

Компоненты смешивают и раствор стерилизуют автоклавированием по 7.4.2, pH среды после стерилизации 7,0 ± 0,2.

7.9.4 Для устранения антимикробного действия допускается разбавление биологического препарата только питательной средой объемом не более 200 $см^3$ на 1 $см^3$ препарата.

7.9.5 Эффективность нейтрализации или другого способа проверяется путем повторного испытания на наличие ингибирующих веществ после применения нейтрализации.

8 Проведение испытания

8.1 Проведение испытания на стерильность с использованием тиогликолевой среды

8.1.1 Из каждого флакона (ампулы, объединенной пробы из ампул/флаконов) биологического препарата производят посев в дозе 1 $см^3$ в одну пробирку с тиогликолевой средой, одну пробирку с соево-казеиновой средой или две пробирки с жидкой средой Сабуро.

Посевы на тиогликолевой среде инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С, а на жидкой среде Сабуро и жидкой соево-казеиновой среде (независимо от метода посева) — при температуре (22,5 ± 2,5) °С. Срок инкубации — 14 сут. Посевы периодически просматривают.

Примечание — При испытании иммунобиологических препаратов возможно использование только тиогликолевой среды с инкубированием посевов при двух температурных режимах (32,5 ± 2,5) °С и (22,5 ± 2,5) °С.

Лиофилизированные биологические препараты предварительно ресуспензируют соответствующим растворителем/разбавителем и высев производят из полученной суспензии или объединенной пробы.

8.1.2 Наличие роста микроорганизмов определяют визуально. Если в процессе инкубирования посевов исследуемая проба вызывает помутнение питательной среды, через 5—7 сут после начала испытания не менее 1 $см^3$ помутневшей среды переносят в две пробирки с той же стерильной средой. Инкубируют исходные посевы (пересевы). Общее время инкубации должно составлять (14 ± 4) сут от начала испытания.

8.1.3 При испытании проб на стерильность проводят контроль стерильности сред: три пробирки с тиогликолевой средой выдерживают в термостате в течение 14 сут 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.

8.2 Проведение испытания на стерильность биологических препаратов, содержащих инактивированные микроорганизмы, или микробную и грибную контаминацию биологических препаратов, содержащих живые микроорганизмы, без тиогликолевой среды

8.2.1 Из каждой пробы биологического препарата производят посев на жидкие питательные среды: Сабуро, МПБ и МППБ (среда Китта-Тароцци) и плотные питательные среды: Сабуро и МПА. На посев используют по одной пробирке с жидкими питательными средами и две чашки Петри или пробирки со скошенной плотной питательной средой. На среду Китта-Тароцци делают высевы по две пробирки или два флакона. При испытании биологических препаратов на стерильность проводят контроль стерильности питательных сред: по три пробирки с жидкими питательными средами (МПБ, МППБ, Сабуро), три флакона с МППБ и по три чашки Петри с плотными питательными средами Сабуро и МПА. Посевы инкубируют: на среде Сабуро по 8.1.3, на средах МПА, МПБ, МППБ при температуре (37,0 ± 1,0) °С в течение 14 сут.

Примечание — В качестве альтернативного метода контроля микробиологической чистоты биологических препаратов, 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.

8.2.2 Для выявления аэробных микроорганизмов и факультативно-анаэробных микроорганизмов высевают 1 $см^3$ посевного материала в одну пробирку и 1—2 $см^3$ в один флакон, а для выявления анаэробных микроорганизмов — соответственно по 1 и 5 $см^3$.

8.2.3 Пробирки и флаконы с посевами на всех средах, кроме среды Сабуро, выдерживают в термостате при температуре (37,0 ± 1,0) °С, на среде Сабуро — при температуре (22,5 ± 2,5) °С в течение 7 сут (для препаратов против анаэробных инфекций — 14 сут).

8.2.4 По истечении указанного срока делают пересев, за исключением посевов на МПА и среде Сабуро. Пересевают пробы на те же питательные среды и в тех же объемах, что и при первичном посеве. Вторичные посевы выдерживают 7 сут (для препаратов против анаэробных инфекций — 14 сут).

8.3 Испытание жидких биологических препаратов, не смешивающихся с водой

Испытание проводят так же, как и для водных растворов биологических препаратов.

8.4 Испытание на стерильность биологических препаратов, обладающих повышенной вязкостью

Готовят разведение препарата в соотношении 1:10, помещая в стерильный флакон с соответствующим стерильным разбавителем: например, 0,9 %-ным раствором натрия хлорида, жидкостью № 1 по 9.3.1, жидкостью № 3 по 9.3.1, фосфатно-буферным раствором с пептоном по 7.5.15 или твином-80 в количестве 50 % от объема биологического препарата. Туда же помещают стерильные стеклянные бусы диаметром 5—6 мм. Смесь нагревают на водяной бане при температуре 40 °С в течение 5—15 мин (максимально 30 мин) до получения гомогенной эмульсии, которую затем высевают в жидкие питательные среды — тиогликолевую, соево-казеиновую или среду Сабуро. Посевы инкубируют 14 сут при соответствующей температуре: для тиогликолевой среды — (32,5 ± 2,5) °С, соево-казеиновой среды и среды Сабуро — (22,5 ± 2,5) °С. Посевы периодически просматривают.

При испытании проб биологических препаратов повышенной вязкости на стерильность проводят контроль стерильности питательных сред.

8.5 Проведение испытания на наличие микоплазм

8.5.1 Для проведения испытания на наличие микоплазм от серии биологического препарата отбирают необходимое количество флаконов (ампул), обеспечивающих проведение испытания в двух повторностях.

8.5.2 Для определения наличия микоплазм в биологических препаратах проводят посев на выбранные питательные среды (см. 7.5.9—7.5.12) в количестве 10 $см^3$ биологического препарата на 100 $см^3$ каждой жидкой среды, а также по 0,2 $см^3$ на четыре чашки Петри с аналогичной плотной питательной средой.

Посевы инкубируют при температуре (37,0 ± 1,0) °С в аэробных и микроаэрофильных условиях (в атмосфере азота, содержащего 5 % — 10 % диоксида углерода). Жидкие питательные среды инкубируют в течение 20—21 сут. Плотные среды инкубируют в течение не менее 14 сут, за исключением посевов, соответствующих 20—21 сут пересеву, которые инкубируют в течение 7 сут. Одновременно в тех же условиях инкубируют по одному флакону, содержащему 100 $см^3$ питательной среды, и по две чашки Петри со средами для контроля их стерильности.

На 2—4 сут после посева проводят пересев материала от каждой жидкой среды в количестве не менее 0,2 $см^3$ на одну чашку с каждой плотной средой. Пересевы повторяют на 7, 14 и 20 сут испытания. Пересевы инкубируют при температуре (37,0 ± 1,0) °С в аэробных и микроаэрофильных условиях (в атмосфере азота, содержащего 5 % — 10 % диоксида углерода) в течение 21 сут.

8.5.3 Состояние жидких сред контролируют каждые двое или трое сут и, в случае изменения окраски среды, выполняют пересев. Если в жидких средах обнаруживают рост бактерий или грибов, испытание считают недействительным и повторяют.

8.5.4 Допускается для целей экспресс-метода выявления микоплазм и/или подтверждения принадлежности выделенных культур к микоплазмам использование метода полимеразной цепной реакции с применением соответствующих тест-систем. Работу проводят по инструкции производителя.

8.5.5 Испытание на присутствие микоплазм с применением среды Каган

8.5.5.1 Испытания проводят по следующим схемам:

Схема 1 — посев пробы на среду Каган полужидкую. Пробу биологического препарата объемом 0,5 $см^3$ вносят 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 (37,0 ± 1,0) °С в течение 14 сут.

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

8.5.5.2 Обнаружение микоплазм с предварительным накоплением состоит из следующих этапов:

- внесение 10 $см^3$ пробы в 100 $см^3$ питательной среды;

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

8.5.6 При проведении испытаний в качестве положительного контроля может быть использован тест-штамм *Micoplasma 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.

8.5.7 Учет результатов при проведении испытаний по обеим схемам проводят путем визуального просмотра засеянных пробирок в проходящем свете на 3,7,10 и 14 сут. На 14 сут проводят окончательный учет результатов. Наличие роста микоплазм оценивают визуально по обнаружению легкой мутности или зернистости в зоне посева.

8.5.8 На плотных селективных питательных средах микоплазмы образуют мелкие, округлые колонии похожие на яичницу-глазунью диаметром 0,1—0,3 мм, как правило, с плотным приподнятым центром и ажурной периферией.

8.5.9 Если при определении микоплазм обнаружен рост нетипичных колоний, проводят их идентификацию. Культуры окрашивают флуоресцентным красителем, обладающим способностью связываться с ДНК. Микоплазмы должны представлять собой однородно окрашенные тела сферической формы, расположенные попарно или цепочками с характерным ярко-зеленоватым свечением (флуоресценцией).

9 Проведение испытания на стерильность методом мембранной фильтрации

9.1 При определении стерильности биологических препаратов, обладающих выраженным антимикробным действием, а также в расфасовке более чем 100 $см^3$ предпочтительно использовать метод мембранной фильтрации, основанный на пропускании растворов через стерильные мембранные фильтры, которые улавливают основное количество микроорганизмов с последующим культивированием их в жидкой тиогликолевой среде и среде Сабуро.

9.2 Испытание на стерильность методом мембранной фильтрации состоит из следующих основных стадий:

- смачивание мембран;
- подготовка образцов;
- фильтрация содержимого емкостей с биологическим препаратом через мембранные фильтры;
- отмывка мембранных фильтров соответствующим стерильным раствором;
- добавление питательной среды и инкубирование посевов.

9.3 Жидкости для промывки мембранных фильтров при испытании образцов, обладающих антимикробным действием

9.3.1 Для промывки фильтров можно использовать любую стерильную жидкость не подавляющую рост микроорганизмов:

- 0,9 %-ный раствор натрия хлорида (pH после стерилизации 7,0 ± 0,2);
- жидкость № 1. В 1000 $см^3$ дистиллированной воды растворяют 1 г ферментированного пептона, фильтруют через ватно-марлевый фильтр для осветления, стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин (pH после стерилизации 7,0 ± 0,2);
- жидкость № 2. К 1000 $см^3$ жидкости № 1 добавляют 1 $см^3$ твина-80, разливают в емкости и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин (pH после стерилизации 7,0 ± 0,2);
- жидкость № 3. В 1000 $см^3$ дистиллированной воды растворяют 5 г ферментированного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твина-80. Разливают во флаконы и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин (pH после стерилизации 7,0 ± 0,2).

При испытании биологических препаратов промывку мембранных фильтров можно проводить любым стерильным раствором, не подавляющим рост микроорганизмов, используемым при определении антимикробного действия препарата, например 0,9 %-ным раствором натрия хлорида или жидкостью № 1.

9.3.2 Испытание проводят с использованием фильтрационных установок открытого или закрытого типа, позволяющих в асептических условиях переносить и фильтровать испытуемый образец через

мембранные фильтры (внешний диаметр 47 мм, диаметр пор 0,45 мкм), способные улавливать микроорганизмы. Фильтрационная установка открытого типа состоит из фильтровальной воронки с крышкой, фильтродержателя, который представляет собой фильтровальный столик с помещенным на него мембранным фильтром. Фильтродержатель соединяется с колбой-приемником и насосом. После окончания фильтрации мембрану асептически переносят в питательную среду.

9.3.3 При использовании закрытой стерильной системы с мембраной, вмонтированной в канистру, после фильтрации питательную среду вносят непосредственно в канистру на мембрану.

Установки монтируют таким образом, чтобы исследуемую пробу жидкого препарата можно было ввести и профильтровать в условиях асептики. Используют мембранные фильтры с размером пор (0,45 ± 0,02) мкм и внешним диаметром 47 мм с установленной способностью к удерживанию микроорганизмов. Материал фильтров — нитрат или ацетат целлюлозы. Гидрофобный край фильтра и низкая сорбционная способность обеспечивают эффективную отмывку мембраны и сводят к минимуму адсорбцию препарата, обладающего антимикробным действием.

Для препаратов, не обладающих антимикробным действием, можно использовать фильтры без гидрофобного края, смачивая их перед фильтрацией используемым разбавителем. Если испытуемый образец не обладает антимикробным действием, в ходе испытания возможно исключить процедуру промывания фильтров.

9.3.4 От биологического препарата отбирают пробу в необходимом для испытания количестве, и асептически переносят на один или несколько фильтров.

При использовании замкнутой системы, емкость заполняют равным объемом сред. При этом следует избегать аэрации тиогликолевой среды.

Испытания проводят под вакуумом при давлении 93,3 кПа и скорости прохождения жидкости 55—57 $см^3$/мин. Фильтрование завершают в момент исчезновения влаги на поверхности фильтра.

9.3.5 После окончания фильтрации воронку с мембраной при включенном вакууме промывают тремя-пятью порциями (по 100 $см^3$) стерильного 0,9 %-ного раствора хлорида натрия или дистиллированной воды. После чего вакуум отключают и мембрану асептически извлекают, разрезают стерильными ножницами пополам. Одну половину помещают в колбу, содержащую 100 $см^3$ тиогликолевой среды, а вторую — в колбу, содержащую 100 $см^3$ среды Сабуро. Тиогликолевую среду с помещенными в нее фильтрами выдерживают при температуре (32,5 ± 2,5) °С, а среду Сабуро при температуре (22,5 ± 2,5) °С в течение 7 сут при ежедневном просмотре.

10 Учет и оценка результатов

10.1 Учет результатов проводят после окончания периода инкубации посевов на питательных средах.

10.1.1 Биологические препараты, содержащие инактивированные микроорганизмы и грибы, считают стерильными, если в посевах на питательные среды отсутствует рост бактерий, грибов и микоплазм.

10.1.2 Биологические препараты, содержащие живые микроорганизмы и грибы, считают свободными от контаминации посторонними бактериями, грибами и микоплазмам, если в посевах на питательные среды не обнаруживается рост посторонней микрофлоры, в том числе микоплазм.

10.1.3 Биологические препараты считают свободными от микоплазм, если отсутствует видимый рост микоплазм на питательных средах или при их идентификации (в случае обнаружения нетипичных колоний) отсутствует типичная для микоплазм флуоресценция.

10.2 Результаты испытания на стерильность (микробиологическую чистоту) могут быть признаны недостоверными в случае, если выполняется одно или несколько условий:

- получены неудовлетворительные результаты микробиологического контроля окружающей среды (воздуха, поверхностей, рук персонала и др.) при испытании на стерильность;
- выявлены ошибки, допущенные в ходе испытания;
- обнаружен рост микроорганизмов, в том числе микоплазм в отрицательном контроле (контроль стерильного растворителя/разбавителя или питательной среды);
- обнаружены неудовлетворительные ростовые свойства питательных сред и /или питательная среда нестерильна;
- обнаружен нетипичный рост микоплазм на селективных питательных средах;
- отсутствует рост микроорганизмов, в том числе микоплазм в положительном контроле;
- выявлены ошибки при стерилизации материалов;

- выявлены ошибки, допущенные в ходе испытания.

10.3 Если результаты испытания признаны недостоверными (в случае обнаружения ошибок в ходе анализа), испытание повторяют на таком же количестве проб биологического препарата.

10.4 Если в результате повторного испытания не обнаружен рост микроорганизмов, в том числе микоплазм, считают, что препарат соответствует требованиям испытания на стерильность. Если в результате повторного испытания обнаружен рост микроорганизмов (для биологических препаратов, содержащих живые микроорганизмы,— рост посторонней микрофлоры, в том числе микоплазм), считают, что биологический препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность.

Библиография

[1] Руководство Евразийского экономического союза по надлежащей производственной практике для лекарственных средств медицинского и ветеринарного назначения

УДК 615.37:619.001.006.354 ОКС 11.220

Ключевые слова: средства лекарственные биологические, стерильность, микробиологическая чистота, контаминация, питательные среды, микрофлора, микоплазмы, прямой посев, мембранная фильтрация

Редактор *Е.Ю. Митрофанова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *С.И. Фирсова*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 30.01.2026. Подписано в печать 09.02.2026. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,37.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru