

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

---

**Испытание на присутствие**

**ОФС.1.7.2.0031.15**

**микоплазм**

**Вводится впервые**

---

Настоящая общая фармакопейная статья описывает испытание на присутствие микоплазм посевных (исходных) клеток, мастер банка, рабочих банков, производственных и контрольных клеточных культур, посевного и рабочего вирусных банков, вирусных сборов, готового лекарственного препарата до розлива, готовой лекарственной формы препарата, которые согласно нормативной документации не должны содержать микоплазм. Кроме этого, испытанию на присутствие микоплазм подлежат клеточные культуры, используемые в лечебной практике, а также добавки к питательным средам (трипсин, сыворотка крови животных и пр.).

**Условия проведения испытания**

Испытание на присутствие микоплазм проводят при строгом соблюдении всех правил асептики в условиях, не оказывающих влияние на выявляемые микроорганизмы, исключая контаминацию испытуемого образца, и обязательном мониторинге условий испытания.

**Методы испытания**

Испытание на присутствие микоплазм проводят следующими методами: микробиологическим (культуральным) – посев на питательные среды для выделения и культивирования микоплазм, и методом индикаторной клеточной культуры (цитохимическим) с использованием флюоресцирующего красителя ДНК.

Испытание посевных (исходных) клеток, мастер банка, рабочих банков, производственных и контрольных клеточных культур проводят 2 методами – микробиологическим и методом индикаторной клеточной культуры.

Испытание посевного и рабочего вирусного банков, вирусного сбора, готового препарата до розлива и готовой формы препарата на присутствие микоплазм проводят только микробиологическим методом.

Могут быть также использованы альтернативные методы испытания при условии проведения соответствующей валидации.

### **Микробиологический метод**

Микробиологический метод испытания на присутствие микоплазм может быть выполнен по следующим схемам:

Схема 1 – посев испытуемого образца на полужидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм, содержащую 0,3% агара (среда Каган полужидкая), и последующее инкубирование посевов во влажной атмосфере при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 14 сут.

Схема 2 – посев испытуемого образца в жидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм (среда Каган жидкая), инкубирование в течение 7 сут во влажной атмосфере при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  с последующим пересевом на полужидкую питательную среду, содержащую 0,3 % агара, и инкубированием в течение 14 сут во влажной атмосфере при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

Учет результатов при проведении испытаний по обеим схемам проводят путем визуального просмотра засеянных пробирок в проходящем свете на 3, 7, 10 и 14 сут. В качестве отрицательного контроля одновременно инкубируют образцы стерильных (незасеянных) питательных сред.

### ***Питательные среды***

Для проведения испытания на присутствие микоплазм используют полужидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм, содержащую 0,3 % агара (среда Каган полужидкая).

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

Жидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм (среда Каган жидкая) используют как вспомогательную для накопления микоплазм.

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

- Гидролизат бычьего сердца жидкий – 200 мл (сухой – 20 г);
- Мясная вода – 400 мл или
- Мясной экстракт – 13 г (3,0–3,5 % сухих веществ на 1 л среды);
- Дрожжевой экстракт (экстракт хлебопекарных дрожжей)– 5,0 г (1,5 г сухих веществ на 1 л среды);
- Натрия хлорид – 5,0 г;
- Вода очищенная – до 1 л.

Значение рН готовой среды после стерилизации ( $7,8 \pm 0,1$ ).

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

Приготовление питательных сред. В воду очищенную по прописи добавляют гидролизат бычьего сердца, мясной экстракт (или мясную воду), экстракт хлебопекарных дрожжей, натрия хлорид и перемешивают. Для приготовления полужидкой или плотной среды дополнительно вносят 3,0 г или 13,0 г агара соответственно. Доводят рН среды до ( $8,1 \pm 0,1$ ) 10 % раствором натрия гидроксида. Среду нагревают до кипения, кипятят 2–3 мин и фильтруют. С помощью 5 % раствора хлористоводородной кислоты устанавливают рН ( $7,8 \pm 0,1$ ).

Среды разливают во флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре 110°C в течение 30 мин. Готовые среды хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 4 мес.

Стерильность питательных сред. После стерилизации не менее 5 % емкостей от каждой партии питательной среды инкубируют параллельно с посевом испытуемого образца. Рост микроорганизмов должен отсутствовать.

Подготовка сред для проведения испытания. Перед применением полужидкую среду, содержащую 0,3 % агара, нагревают на водяной бане до полного расплавления агара и охлаждают до температуры 40–45 °С. Добавляют 15–20 % нормальной сыворотки крови лошади без консерванта, предварительно прошедшей контроль на стерильность и отсутствие контаминации микоплазмами.

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

Готовую полужидкую среду разливают по 10 мл в пробирки и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

При проведении испытания на присутствие микоплазм допустимо использование альтернативных питательных сред при условии подтверждения их соответствия требованиям по ростовым свойствам в отношении соответствующих штаммов.

### **Определение ростовых свойств среды**

Каждую партию приготовленной полужидкой питательной среды, предназначенной для проведения испытания на присутствие микоплазм, проверяют на ростовые свойства, используя «Стандартный образец тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230», в соответствии с инструкцией по применению. Для проверки ростовых свойств, в зависимости от типа испытуемого препарата, также можно использовать другие виды микоплазм, полученные из музейных коллекций: *M. orale*, *M. fermentans*, *M. gallisepticum*, *M. hyorhinis*, *M. synoviae*, *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*.

При проведении испытания по определению ростовых свойств среды тест-штамм *M. arginini* G230 в количестве 10–100 КОЕ вносят в 3–4 пробирки с испытуемой полужидкой питательной средой. Инкубируют во влажной атмосфере в течение 7 сут при температуре (37±1)°С. Если в течение

времени инкубации в инокулированной среде визуально отмечают рост микоплазм, среду считают пригодной для использования.

### **Определение ингибирующего действия испытуемого образца**

Для правильной оценки проводимого испытания на присутствие микоплазм однократно определяют наличие ингибирующего действия для каждого наименования испытуемого образца. Определение ингибирующего действия может быть проведено одновременно с определением ростовых свойств питательной среды.

При проведении испытания по схеме 1 в 3–4 пробирки с 10 мл полужидкой питательной среды, содержащей 0,3 % агара, вносят 0,5 мл испытуемого образца и 10–100 КОЕ тест-штамма *M. arginini* G230. Инкубируют во влажной атмосфере в течение 7 сут при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

При проведении испытания по схеме 2 в 100 мл жидкой питательной среды вносят 10 мл испытуемого образца и 10 – 100 КОЕ тест-штамма *M. arginini* G230, инкубируют во влажной атмосфере в течение 7 сут и далее высевают по 0,5–1 мл на полужидкую среду, содержащую 0,3 % агара. Инкубируют во влажной атмосфере в течение 7 сут при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

В качестве положительного контроля, в зависимости от применяемой схемы, используют аналогичное объему испытуемого образца количество стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и 10–100 КОЕ тест-штамма *M. arginini* G230.

В качестве отрицательного контроля одновременно инкубируют стерильные образцы питательных сред.

Учет результатов проводят визуально в проходящем свете. Если в контроле наблюдают рост тест-штамма, а в опыте рост отсутствует, считают, что испытуемый препарат обладает ингибирующим действием, которое следует устранить разведением или другим способом.

### **Схема 1. Испытание на присутствие микоплазм методом прямого посева**

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

При проведении испытания на присутствие микоплазм в качестве положительного контроля может быть использован тест-штамм *M. arginini* G230 в количестве 10–100 КОЕ или один из тест-штаммов, использованных при оценке ростовых свойств.

### **Схема 2. Испытание на присутствие микоплазм методом посева с предварительным накоплением**

Испытанию подлежат препараты, вызывающие помутнение питательной среды или обладающие ингибирующим действием. Методика посева включает предварительный высев испытуемого образца в жидкую питательную среду (среда Каган жидкая) для накопления и инкубирование в течение 7 сут с последующим пересевом на полужидкую питательную среду, содержащую 0,3 % агара, и инкубированием в течение 14 сут.

Микробиологический метод испытания позволяет обнаруживать одну и более колоний микоплазм в объеме не более 100 мл.

Обнаружение микоплазм микробиологическим методом с предварительным накоплением состоит из следующих этапов:

1. Внесение 10 мл испытуемого образца в 100 мл жидкой питательной среды, инкубирование во влажной атмосфере в течение 7 сут при температуре  $(37 \pm 1)$  °С.

2. Пересев на 7 сут от начала исследования по 0,5–1,0 мл бульонной культуры в каждую из 10 пробирок с полужидкой средой,

содержащей 0,3 % агара. Инкубирование во влажной атмосфере в течение 14 сут при температуре  $(37 \pm 1)$  °С.

При проведении испытания в качестве положительного контроля может быть использован тест-штамм *M. arginini* G230 в количестве 10–100 КОЕ или один из тест-штаммов, использованных при оценке ростовых свойств среды. В качестве отрицательного контроля одновременно инкубируют образцы стерильных питательных сред.

### **Учет и интерпретация результатов**

Учет результатов испытания по обеим схемам проводят путем визуального просмотра засеянных пробирок в проходящем свете на 3, 7, 10 и 14 сут, сравнивая результат с контрольными пробирками. На 14 сут проводят окончательный учет результатов. Наличие роста микоплазм оценивают визуально по обнаружению легкой мутности или зернистости в зоне посева. При отсутствии видимого роста микоплазм испытуемый образец считают прошедшим испытание. В случае роста микоплазм испытуемый образец считают не удовлетворяющим требованиям испытания.

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

### **Метод индикаторной клеточной культуры (цитохимический метод)**

Метод обнаружения микоплазм с использованием индикаторной клеточной культуры *Vero* (или другой клеточной культуры, чувствительной к микоплазмам) основан на внесении испытуемого образца в клеточную

культуру и последующей обработке клеток культуры тканей специфическим флюоресцирующим красителем Hoechst-33258 (Bisbenzimidide).

### ***Методика испытания***

Испытания на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры проводят в асептических условиях, выполняя следующие операции.

1. В стерильную чашку Петри помещают стерильное предметное стекло и вносят 20–23 мл суспензии клеточной культуры *Vero* в питательной среде Игла MEM или ДМЕМ в концентрации не более  $10^5$  кл/мл и добавляют не более 5 % сыворотки эмбриональной, предварительно прошедшей контроль на стерильность и отсутствие контаминации микоплазмами.

2. Вносят 1 мл испытуемого образца в чашку Петри и инкубируют в течение 3–5 сут при температуре  $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в атмосфере с  $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$  до формирования 50—70 % монослоя. Образование монослоя наблюдают в световом микроскопе при увеличении ок.  $10\times$ , об.  $20\times$ .

3. Культуральную жидкость сливают, промывают препарат фосфатным буферным раствором (рН 7,2–7,4).

4. Помещают предметное стекло на 30–35 мин в  $96^\circ$  этиловый спирт.

5. Спирт сливают и сушат препарат на воздухе.

6. Окрашивают рабочим раствором красителя Hoechst-33258 в защищенном от света месте при температуре  $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 30–35 мин.

7. Краситель сливают, препарат промывают стерильной водой очищенной, подсушивают на воздухе и микроскопируют в люминесцентном микроскопе.

### **Примечания.**

1. Приготовление красителя Hoechst-33258 (Bisbenzimidide)  
*А. Приготовление концентрированного раствора.* В 100 мл стерильной воды очищенной растворяют 5 мг красителя. Раствор хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до  $8 ^\circ\text{C}$  не более 1 года.

*Б. Приготовление основного раствора.* К 100 мл стерильной воды очищенной добавляют 0,5 мл концентрированного раствора красителя и перемешивают. Раствор готовят перед использованием.

*В. Приготовление рабочего раствора.* Основной раствор красителя смешивают с раствором Хенкса без индикатора в соотношении 1:9 и используют для окраски испытуемых образцов немедленно.

2. Подготовка люминесцентного микроскопа. Устанавливают и используют для анализа препаратов фильтры: ФС1-4, СС15-2, БС8-2. Просматривают препараты в люминесцентном микроскопе при увеличении ок.10×, об.90× (масляная иммерсия) или об.70×/85× (водная иммерсия).

3. Подготовка предметных стекол. Предметные стекла промывают в проточной водопроводной воде в течение 10–15 мин, затем кипятят 5–7 мин в воде очищенной, протирают стерильной салфеткой и помещают на 1 сут в смесь Никифорова (смесь равных объемов 96° этилового спирта и эфира для наркоза). Стекла извлекают из смеси Никифорова с помощью пинцета, протирают стерильной салфеткой и стерилизуют в течение (30 ± 2) мин при температуре (120 ± 2) °С.

### **Учет и интерпретация результатов**

Учет результатов испытания на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры (цитохимическим методом) проводят, просматривая препараты в люминесцентном микроскопе. Микоплазмы преимущественно выявляются по границам клеток и в межклеточном пространстве как однородно окрашенные тела сферической формы расположенные попарно или цепочками клеток с ярким зеленоватым свечением.

Положительными контрольными образцами служат контаминированные микоплазмами культуры клеток, а отрицательными – клеточные культуры, в которых микоплазмы не выявлены.

При отсутствии характерного для микоплазм свечения испытуемый образец считают удовлетворяющим требованиям испытания.

Обнаружение микоплазм свидетельствует о контаминации испытуемого образца микоплазмами, и образец считается не соответствующим требованиям испытания.