**Испытание на присутствие ОФС**

**микоплазм Взамен ОФС.1.7.2.0031.15**

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. Испытанию на присутствие микоплазм подлежат также клеточные культуры, используемые в лечебной практике и добавки к питательным средам (трипсин, сыворотка крови животных и пр.).

**Условия проведения испытания**

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

**Методы испытания**

Испытание на присутствие микоплазм осуществляют 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 выполняют двумя 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 осуществляют 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 двум схемам:

Схема 1. Испытание на присутствие микоплазм методом прямого посева.

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

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

Жидкая питательная среда для выделения и культивирования микоплазм (среда Каган жидкая), может использоваться как вспомогательная для накопления микоплазм.

Плотную питательную среду, для выделения и культивирования микоплазм, содержащую 1,3 % агара (среда Каган плотная) используют для подтверждения роста, на которой микоплазмы формируют характерные колонии в форме яичницы-глазуньи.

Все питательные среды, используемые в испытаниях должны быть стерильными.

Приготовление питательных сред. 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 1л.

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

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

Доводят рН среды до (8,1 ± 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 ± 0,1).

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

Подготовка сред для проведения испытания. Перед применением полужидкую и плотную питательные среды (содержащие 0,3 % агара или 1,3% агара), нагревают на водяной бане до полного расплавления агара и охлаждают до температуры 40–45 оС, и затем добавляют 15–20 % нормальной сыворотки крови лошади без консерванта, прошедшей контроль на стерильность и отсутствие контаминации микоплазмами.

Возможно внесение во все готовые питательные среды стерильного раствора аргинина до конечной концентрации 1 %, стерильного раствора глюкозы до конечной концентрации 1 % и 100ед/мл бензилпенициллина натриевой соли. 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, плотную среду разливают по чашкам Петри (диаметр 90мм) по 15-20 мл и хранят при температуре от 2 до 8 оС 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 *Мycoplasma* *arginini* G230», в соответствии с инструкцией по применению.

При проведении испытания по определению ростовых свойств среды тест-штамм *М. arginini* G230 в количестве 10–100 КОЕ вносят в 3–4 пробирки с испытуемой полужидкой питательной средой. Инкубируют в течение 7 сут при температуре (37±1)оС. Если в течение времени инкубации в инокулированной среде визуально отмечают рост микоплазм, среду считают пригодной для использования.

В зависимости от типа испытуемого препарата, для проверки ростовых свойств питательной среды, также можно использовать другие виды микоплазм, полученные из музейных коллекций: *M. orale, M. fermentans, M. gallisepticum, M. hyorhinis,М. synoviae,M. pneumoniaе, Acholeplasma  laidlawii*.

**Определение ингибирующего действия испытуемого образца**

Для правильной оценки проводимого испытания на присутствие микоплазм, однократно определяют наличие ингибирующего действия 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, вносят 0,5 мл испытуемого образца и 10–100 КОЕ тест-штамма *М. arginini* G230. Инкубируют в течение 7 сут при температуре (37 ± 1) оС.

При проведении испытания по схеме 2 в 100 мл жидкой питательной среды вносят 10 мл испытуемого образца и 10 – 100 КОЕ тест-штамма *М. arginini* G230, инкубируют в течение 7 сут и далее высевают по 0,5–1,0 мл на полужидкую среду, Инкубируют в течение 7 сут при температуре (37 ± 1) оС.

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 *М. arginini* G230.

В качестве отрицательного контроля одновременно инкубируют стерильные образцы питательных сред.

Учет результатов проводят визуально в проходящем свете. Если в положительном 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, (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 в течение 14 сут при температуре (37 ± 1) оС.

В качестве положительного контроля может быть использован  тест-штамм *М. arginini* G230 в количестве 10–100 КОЕ, либо 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 и инкубированием в течение 14 сут для выявления микоплазм.

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, с последующим инкубированием в течение 7 сут при температуре (37 ± 1) оС.

При испытании сыворотки крови животных вносят 100 мл испытуемого образца в 300 мл жидкой питательной среды, инкубируют в течение 7 сут при температуре (37 ± 1) оС.

2.Пересев на 6-7 сут от начала испытания по 0,5–1,0 мл в каждую из 10 пробирок с полужидкой средой. Инкубирование в течение 14 сут при температуре (37 ± 1) оС.

При проведении испытания в качестве положительного контроля может быть использован тест-штамм *М. 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.

Для подтверждения наличия микоплазм используют плотную питательную среду, содержащую 1,3 % агара (среда Каган плотная). Посев производят на чашки Петри по 0,2-0,5 мл из жидкой среды или зоны роста на полужидкой среде и инкубируют в течение не более 10 сут при температуре (37 ± 1)  оС. Формирование характерных колонии микоплазм в форме яичницы-глазуньи наблюдают в световом микроскопе при увеличении ок.10×, об.20× или ок.10×, об.40× начиная с 5-7 суток.

Испытание считается недействительным, если обнаружен нетипичный, вызывающий сомнения рост микоплазм или 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 обнаружении роста микоплазм 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 специфическим флюоресцирующим красителем ДНК Hoechst-33258 (Bisbenzimide).

***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 МЕМ или ДМЕМ в концентрации не более 105 кл/мл и добавляют не более 5 % сыворотки эмбриональной, 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 ± 1) оС в атмосфере с (5,0±0,5) % СО 2 до формирования 50-70 % монослоя. Образование монослоя наблюдают в световом микроскопе при увеличении ок.10×, об.20×.
3. Культуральную жидкость сливают, промывают препарат фосфатным буферным раствором (рН 7,2–7,4).
4. Помещают предметное стекло на 30–35 мин в 96о 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 ± 1) оС 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 (Bisbenzimide)
2. *А. Приготовление концентрированного раствора Hoechst-33258*.  В 100 мл стерильной воды очищенной растворяют 5 мг красителя Hoechst-33258.

Раствор хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 оС не более 1 года.

*Б. Приготовление основного раствора Hoechst-33258*. К 100 мл стерильной воды очищенной добавляют 0,5 мл концентрированного раствора красителя Hoechst-33258 и перемешивают. Раствор готовят перед использованием.

*В. Приготовление рабочего раствора Hoechst-33258.* Основной раствор красителя Hoechst-33258 смешивают с раствором Хенкса без индикатора или фосфатным буферным раствором (рН 7,2–7,4) в соотношении 1:9 и используют для окраски испытуемых образцов немедленно.

2. Подготовка люминесцентного микроскопа.

Проводят подготовку люминесцентного микроскопа к работе согласно Руководству по эксплуатации. 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 10–15мин, затем кипятят 5–7 мин в воде очищенной, протирают стерильной салфеткой и помещают на 1 сут в смесь Никифорова (смесь равных объемов 96о 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) оС.

**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 в виде парных, цепочечных, нитевидных образований с ярким зеленоватым свечением.

Положительными контрольными образцами могут служить готовые контрольные препараты или контаминированные микоплазмами культуры клеток, а отрицательными - клеточные культуры, в которых микоплазмы не выявлены или готовые контрольные препараты.

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.