

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

«2.6.13. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НЕСТЕРИЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ: ИСПЫТАНИЯ НА НАЛИЧИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ»

11/2017:20613

*Введена в действие с 1 ноября 2017 года
приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь
от 20.11.2017 № 1319*

*вводится взамен статьи
«2.6.13. Микробиологические испытания
нестерильной продукции: испытание на
наличие специфических микроорганизмов»
ГФ РБ II, том 1, утвержденной приказом МЗ
РБ от 25.04.2012 года № 453*

11/2017:20613

2.6.13. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НЕСТЕРИЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ: ИСПЫТАНИЯ НА НАЛИЧИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. ВВЕДЕНИЕ

Испытания, описанные далее в статье, позволяют определять отсутствие или предельное содержание специфических микроорганизмов, которые могут быть обнаружены в приведенных условиях.

Испытания предназначены в первую очередь для определения соответствия требованиям спецификации по микробиологической чистоте, как субстанций, так и лекарственных средств. В случае использования методик для таких целей следуют инструкциям, приведенным ниже, включая количество образцов, которое следует взять, и интерпретацию результатов, в соответствии с тем, как изложено далее.

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

2. ОСНОВНЫЕ ОПЕРАЦИИ

Подготовка образцов проводится так, как описано в общей статье 2.6.12.

В случае если продукт обладает антимикробным действием, то его подавляют до такой степени, насколько это возможно, или нейтрализуют, как описано в общей статье 2.6.12.

В случае если поверхностно-активные вещества используются при подготовке образцов, должно быть продемонстрировано, как это указано в общей статье 2.6.12, отсутствие их токсичности для микроорганизмов и их совместимость с используемыми инактиваторами.

3. РОСТОВЫЕ И ИНГИБИРУЮЩИЕ РОСТ СВОЙСТВА СРЕД, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ И ОТРИЦАТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ

Способность методики определять микроорганизмы в присутствии испытуемого образца должна быть установлена предварительно. Пригодность методики должна быть подтверждена, в случае, если в выполнение испытаний или в образец вводятся изменения, которые могут повлиять на результат испытаний.

3-1. ПОЛУЧЕНИЕ ТЕСТ-ШТАММОВ

Используют стабильные стандартизованные суспензии тест-штаммов или готовят их как указано ниже. Используется техника сохранения эталонного банка культур микроорганизмов таким образом, чтобы живые микроорганизмы, использованные для инокуляции, были удалены не более чем на 5 пересевов от оригинального контрольного банка культур микроорганизмов.

3-1-1. Аэробные микроорганизмы. Бактериальные тест-штаммы выращивают отдельно на бульоне или агаре на основе гидролизата казеина и соевых бобов при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч. Тест-штаммы *Candida albicans* выращивают отдельно на декстрозном бульоне Сабуро или декстрозном агаре Сабуро при температуре 20—25 °С в течение 2—3 дней.

– *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 или NBRC 13276;

– *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 или NBRC 13275;

– *Escherichia coli* ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 или NBRC 3972;

– *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар Typhimurium ATCC 14028 или, как альтернативный, *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар Abony NBRC 100797, NCTC 6017 или CIP 80.39;

– *Candida albicans* ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 или NBRC 1594.

Для приготовления суспензий используют забуференный раствор натрия хлорида и пептона pH 7,0 или фосфатный буферный раствор pH 7,2. Используют суспензию в течение 2 ч или 24 ч при хранении при температуре 2—8 °С.

3-1-2. Клостридии. Используют штаммы *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651) или ATCC 19404 (NCTC 532 или CIP 79.03) или NBRC 14293. Тест-штаммы клостридий выращивают в анаэробных условиях на обогащенной среде для клостридий при температуре 30—35 °С в течение 24—48 ч. В качестве альтернативы приготовлению и последующему разведению свежей суспензии вегетативных клеток *Cl. sporogenes*, для инокуляции используют стабильную суспензию спор. Стабильная суспензия спор может сохраняться при температуре 2—8 °С в течение установленного периода.

3-2. ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

Для проверки условий испытания проводят отрицательный контроль с использованием выбранного разбавителя вместо испытуемого образца. Не должно наблюдаться роста микроорганизмов. Отрицательный контроль проводят также при испытании продуктов как указано в разделе 4. Неудавшийся отрицательный контроль требует проведения расследования.

3-3. РОСТОВЫЕ И ИНГИБИРУЮЩИЕ РОСТ СВОЙСТВА СРЕД

Испытания проводят на каждой серии готовой среды и на каждой серии среды, приготовленной из дегидратированной среды или из указанных ингредиентов.

Подтверждают приемлемость свойств подходящих сред как это указано в таблице 2.6.13.-1.

Испытания ростовых свойств жидких сред: инокулируют порцию соответствующей среды небольшим количеством подходящих микроорганизмов (не более 100 КОЕ). Инкубируют при определенной температуре в течение периода времени, не большего, чем самый короткий период, указанный в испытании. Наблюдается отчетливый рост микроорганизмов сравнимый с тем, что наблюдался для ранее протестированной и одобренной серии среды.

Испытания ростовых свойств твердых сред: выполняют методом поверхностного посева, инокулируя каждую чашку небольшим количеством (не более 100 КОЕ) подходящих микроорганизмов. Инкубируют при определенной температуре в течение периода времени, не большего, чем самый короткий период, указанный в испытании. Наблюдается отчетливый рост микроорганизмов сравнимый с тем, что наблюдался для ранее протестированной и одобренной серии среды.

Испытания на ингибирующие рост свойства жидких и твердых сред: инокулируют порцию соответствующей среды не менее чем 100 КОЕ подходящих микроорганизмов. Инкубируют при определенной температуре в течение периода времени, не меньшего, чем самый длинный период, указанный в испытании. Не должен наблюдаться рост микроорганизмов.

Испытания на индикаторные свойства: выполняют методом поверхностного посева, инокулируя каждую чашку небольшим количеством (не более 100 КОЕ) подходящих микроорганизмов. Инкубируют при определенной температуре в течение периода времени, находящегося в специфицированных для испытания рамках. Колонии сравнимы по проявлению и индикаторным реакциям с теми, что наблюдались для ранее протестированной и одобренной серии среды.

3-4. ИСПЫТАНИЯ НА ПРИГОДНОСТЬ МЕТОДА

Для каждого испытуемого продукта, выполняют подготовку образцов как описано в соответствующем подразделе раздела 4. Прибавляют тест-штаммы при перемешивании в указанную питательную среду. Инокулируют тест-штаммы по отдельности. Используют количество микроорганизмов не более чем 100 КОЕ при проведении испытания.

Выполняют испытание как описано в соответствующем подразделе раздела 4, используя наименьший период времени из предписанных.

Специфицированные микроорганизмы должны быть определены реакциями индикации, как описано в разделе 4.

Проявление любой антимикробной активности продукта неизбежно влечет за собой модификации методики проведения испытаний (см. 4-5-3 в общей статье 2.6.12).

В случае если для данного продукта антимикробная активность не может быть нейтрализована без влияния на тестируемые микроорганизмы, то предполагается, что ингибированные микроорганизмы не будут присутствовать в продукте.

Таблица 2.6.13.-1

Ростовые, ингибирующие рост и индикаторные свойства питательных сред

	Среда	Свойство	Тест-штамм
Испытания на грамотрицательные бактерии, толерантные к желчи	Обогащительный питательный бульон Мосселя для энтеробактерий	Ростовое	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
		Ингибирующее	<i>S. aureus</i>
	Агаризованная среда с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью	Ростовое и индикаторное	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
Испытания на <i>Escherichia coli</i>	Бульон Макконки	Ростовое	<i>E. coli</i>
		Ингибирующее	<i>S. aureus</i>
	Агар Макконки	Ростовое и индикаторное	<i>E. coli</i>
Испытания на <i>Salmonella</i>	Обогащительный питательный бульон Раппапорта Вассилиадиса для <i>Salmonella</i>	Ростовое	<i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар Typhimurium или <i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар Abony
		Ингибирующее	<i>S. aureus</i>
	Агар на основе ксилозы, лизина, дезоксихолата	Ростовое и индикаторное	<i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар Typhimurium или <i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар Abony
Испытания на <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Агар на основе цетримида	Ростовое	<i>P. aeruginosa</i>
		Ингибирующее	<i>E. coli</i>
Испытания на <i>Staphylococcus aureus</i>	Агар на основе маннита и соли	Ростовое и индикаторное	<i>S. aureus</i>
		Ингибирующее	<i>E. coli</i>
Испытания на клостридии	Обогащенная среда для клостридий	Ростовое	<i>Cl. sporogenes</i>
	Колумбийский агар	Ростовое	<i>Cl. sporogenes</i>
Испытания на <i>Candida albicans</i>	Декстрозный бульон Сабуро	Ростовое	<i>C. albicans</i>
	Декстрозный агар Сабуро	Ростовое и индикаторное	<i>C. albicans</i>

4. ИСПЫТАНИЕ ПРОДУКТОВ

4-1. ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ, ТОЛЕРАНТНЫЕ К ЖЕЛЧИ

4-1-1. Приготовление образца и предварительное инкубирование.

Готовят образец разведением 1 к 10 не менее чем из 1 г испытуемого продукта как описано в общей статье 2.6.12, но используя бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов в качестве разбавителя, перемешивают и инкубируют при температуре 20—25 °С в течение времени, достаточного для оживления бактерий, но недостаточного для увеличения числа организмов (обычно 2 ч, но не более 5 ч).

4-1-2. **Испытание на отсутствие бактерий.** Если иное не указано в частной статье, используют объем, соответствующий 1 г продукта приготовленного как указано в пункте 4-1-1, для инокуляции обогатительного питательного бульона Мосселя для энтеробактерий. Инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 24—48 ч. Пересевают на чашку с агаризованной средой с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью. Инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч. Продукт выдерживает испытание, если рост колоний не наблюдается.

4-1-3. Количественная оценка

4-1-3-1. *Селекция и пересев.* Инокулируют подходящие количества обогатительного питательного бульона Мосселя для энтеробактерий образцом приготовленным, как указано в пункте 4-1-1, и/или его разбавлениями, содержащими, соответственно, 0,1 г, 0,01 г и 0,001 г (или 0,1 мл, 0,01 мл и 0,001 мл) испытуемого продукта. Инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 24—48 ч. Каждую из культур пересевают на чашку с агаризованной средой с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью. Инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч.

4-1-3-2. *Интерпретация результатов.* Рост колоний свидетельствует о положительном результате. Отмечают наименьшее количество продукта, которое дает положительный результат и наибольшее количество, которое дает отрицательный результат. Вероятное количество бактерий определяют по таблице 2.6.13.-2.

Таблица 2.6.13.-2

Интерпретация результатов

Результаты для каждого количества продукта			Вероятное количество бактерий в грамме или миллилитре продукта
0,1 г или 0,1 мл	0,01 г или 0,01 мл	0,001 г или 0,001 мл	
+	+	+	Более 10 ³
+	+	-	Менее 10 ³ , но более 10 ²
+	-	-	Менее 10 ² , но более 10
-	-	-	Менее 10

#В качестве альтернативного испытания допускается определение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и других микроорганизмов (например, *Aeromonas*, *Pseudomonas*) как указано ниже.

10 мл испытуемого образца, подготовленного, как описано в общей статье 2.6.12, но с использованием среды № 11 вместо буферного раствора с натрия хлоридом и пептоном рН 7,0, инкубируют в течение 2—5 ч при температуре 30—35 °С, вносят в 100 мл питательной среды № 3, перемешивают и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 24—48 ч. При наличии роста делают пересев на среду № 4 в чашке Петри. Посевы инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 24—48 ч. Наличие роста малиновых с металлическим блеском или без него; розовых, бесцветных, блестящих, выпуклых колоний грамотрицательных палочек указывает на возможную контаминацию лекарственного средства бактериями сем. *Enterobacteriaceae* и некоторыми другими грамотрицательными бактериями. Выросшие колонии пересевают, каждую отдельно, со среды № 4 на скошенную в пробирках среду № 1 и выращивают при температуре 30—35 °С течение 18—20 ч. Из каждой пробирки с чистой культурой делают пересевы на среду № 6 (в двух повторностях) и среду № 7.

После посева в половину пробирок со средой № 6 вносят по 0,5 мл стерильного вазелинового масла. Все посевы инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—20 ч. Ферментацию глюкозы устанавливают по изменению цвета среды № 6 из красного в желтый в пробирках с маслом и без него. О наличии нитритов в среде № 7 судят по появлению красного окрашивания при внесении в среду реактива Грисса. Параллельно исследуют чистые культуры на наличие фермента цитохромоксидазы. Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают отрицательную оксидазную реакцию, ферментируют глюкозу с образованием кислоты (или кислоты и газа) и восстанавливают нитраты в нитриты, испытуемый продукт контаминирован бактериями семейства *Enterobacteriaceae*.

Тест на цитохромоксидазу. Полоску фильтровальной бумаги смачивают реактивом и наносят стеклянной палочкой суточную чистую культуру исследуемых бактерий со среды № 1. Синее окрашивание, появляющееся через 2—5 мин, свидетельствует о положительной оксидазной реакции.

Количественная оценка. Инокулируют подходящие количества среды № 3 гомогенатом и/или его разбавлениями, содержащими, соответственно, 0,1 г, 0,01 г и 0,001 г (или 0,1 мл, 0,01 мл и 0,001 мл) испытуемого продукта. Инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 24—48 ч. При наличии роста делают пересев на плотную среду № 4 (агар Эндо) и инкубируют при той же температуре в течение 18—24 ч. В случае появления характерных для *Enterobacteriaceae* колоний грамотрицательных палочек определяют количество энтеробактерий в 1 г или в 1 мл образца по таблице 2.6.13.-2.#

4-2. *ESCHERICHIA COLI*

4-2-1. Приготовление образца и предварительное инкубирование.

Готовят образец разведением 1 к 10 не менее чем из 1 г испытуемого продукта как описано в общей статье 2.6.12 и используют 10 мл или количество, соответствующее 1 г или 1 мл, для инокуляции подходящего количества (определенного как указано в пункте 3-4) бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч.

4-2-2. **Селекция и пересев.** Встряхивают контейнер, переносят 1 мл бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов в 100 мл бульона Макконки и инкубируют при температуре 42—44 °С в течение 24—48 ч. Пересевают на чашки с агаром Макконки и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—72 ч.

4-2-3. **Интерпретация результатов.** Рост колоний свидетельствует о возможном присутствии *E. coli*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

#В качестве альтернативного испытания допускается определение *Escherichia coli* как указано ниже.

10 мл образца в питательной среде № 11 или количество, представляющее 1 г или 1 мл продукта, подготовленное и инкубированное как описано для определения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, помещают в 100 мл питательной среды № 3 и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч. Пересевают на среду № 4 и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч. На среде № 4 *Escherichia coli* образуют, как правило, характерные малиновые колонии с металлическим блеском или без него, диаметром 2—4 мм. Подозрительные на принадлежность к *Escherichia coli* колонии микроскопируют. При обнаружении грамотрицательных палочек отсевают на скошенную в пробирках плотную среду № 1 и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч. Из каждой пробирки с чистой культурой делают пересевы на среды № 14 и № 15, а также используют для теста на цитохромоксидазу. Через 18—24 ч. инкубации при температуре 30—35 °С отмечают бактериальный рост или его отсутствие на средах № 14 и № 15. Утилизацию цитрата устанавливают по изменению цвета среды № 14 из зеленого в синий. Наличие индола определяют по появлению красного кольца на поверхности среды № 15 при добавлении реактива Ковача или Эрлиха.

Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидазой, не утилизирующие цитрат натрия и образующие индол, считают, что испытуемый продукт загрязнен *Escherichia coli*.#

4-3. SALMONELLA

4-3-1. **Приготовление образца и предварительное инкубирование.** Готовят образец испытуемого продукта как описано в общей статье 2.6.12 и используют количество, соответствующее не менее 10 г или 10 мл для инокуляции подходящего количества (определенного как указано в пункте 3-4) бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч.

4-3-2. **Селекция и пересев.** Переносят 0,1 мл бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов в 10 мл обогатительного питательного бульона Раппапорта Вассилиадиса для *Salmonella* и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч. Пересевают на чашки с агаром на основе ксилоры, лизина, дезоксихолата. Инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—48 ч.

4-3-3. Интерпретация результатов. На возможное присутствие *Salmonella* указывает рост хорошо развитых, красных колоний или красных колоний с черным центром. Присутствие *Salmonella* подтверждается в идентификационных испытаниях.

Продукт выдерживает испытание, если колонии, описанного типа не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

#В качестве альтернативного испытания допускается определение бактерий семейства *Salmonella* как указано ниже.

1 мл обогащенной культуры на среде № 3 вносят в пробирку с 10 мл среды № 12 и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 16—18 ч. Делают пересев петлей на среду № 5 и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 24—48 ч. На среде № 5 *Salmonella* образует, как правило, типичные черные колонии с характерным металлическим блеском, при этом участок среды под колонией прокрашивается в черный цвет. Подозрительные на принадлежность к *Salmonella* колонии микроскопируют и при обнаружении в мазках грамотрицательных палочек отсеивают на среду № 13 (трехсахарный агар с солями железа), нанося небольшое количество культуры петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик. Параллельно ставят тест на цитохромоксидазу, используя чистую культуру с плотной среды № 1. Через 18—24 ч. инкубации при 30—35 °С отмечают изменение цвета среды из красного в желтый только в столбике питательной среды. Почернение среды свидетельствует об образовании сероводорода.

Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидаза, не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород, считают, что испытуемый продукт контаминирован *Salmonella*.#

4-4. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

4-4-1. Приготовление образца и предварительное инкубирование.

Готовят образец разведением 1 к 10 не менее чем из 1 г испытуемого продукта как описано в общей статье 2.6.12 и используют 10 мл или количество соответствующее 1 г или 1 мл для инокуляции подходящего количества (определенного как указано в пункте 3-4) бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают. В случае, если испытанию подвергаются трансдермальные пластыри, фильтруют через стерильный мембранный фильтр объем образца соответствующий 1 пластырю, обработанному как указано в разделе 4-5-1 общей статьи 2.6.12 и переносят фильтр в 100 мл бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов. Инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч.

4-4-2. Селекция и пересев. Пересевают на чашки с агаризованной средой на основе цетримиды и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—72 ч.

4-4-3. Интерпретация результатов. На возможное присутствие *P. aeruginosa* указывает рост колоний. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

#В качестве альтернативного испытания допускается определение *Pseudomonas aeruginosa* как указано ниже.

Образец в количестве 10 г (мл) вносят в 100 мл питательной среды № 8, перемешивают и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 24—48 ч. Делают пересев на чашку с плотной питательной средой № 9 и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—48 ч. Рост зеленоватых, как правило, флуоресцирующих колоний, голубых в ультрафиолетовом свете (что свидетельствует о наличии пигмента пиоцианина) указывает на возможность загрязнения лекарственного средства *Pseudomonas aeruginosa*. В этом случае подозрительные колонии пересевают на скошенную плотную среду № 1, инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч. Выросшие колонии микроскопируют и, при выявлении грамотрицательных палочек, проводят тест на наличие фермента цитохромоксидаза. Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают положительную оксидазную реакцию и образуют сине-зеленый пигмент, испытуемый продукт контаминирован *Pseudomonas aeruginosa*.#

4-5. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

4-5-1. Приготовление образцов и предварительное инкубирование. Готовят образец, разведением 1 к 10 не менее чем из 1 г испытуемого продукта как описано в общей статье 2.6.12 и используют 10 мл или количество соответствующее 1 г или 1 мл для инокуляции подходящего количества (определенного как указано в пункте 3-4) бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают. В случае, если испытанию подвергаются трансдермальные пластыри, фильтруют через стерильный мембранный фильтр объем образца соответствующий 1 пластырю, обработанному как указано в разделе 4-5-1 общей статьи 2.6.12 и переносят фильтр в 100 мл бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов. Инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч.

4-5-2. Селекция и пересев. Пересевают на чашки с агаризованной средой на основе маннита и соли и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—72 ч.

4-5-3. Интерпретация результатов. На возможное присутствие *S. aureus* указывает рост желтых/белых колоний, окруженных желтыми зонами. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

#В качестве альтернативного испытания допускается определение *Staphylococcus aureus* как указано ниже.

Образец в количестве 10 г (мл) вносят в 100 мл питательной среды № 8, перемешивают и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 24—48 ч. Делают пересев на чашку с плотной питательной средой № 10 и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—48 ч. Рост золотисто-желтых колоний, окруженных желтыми зонами (что свидетельствует о ферментации маннита), указывает на возможность загрязнения лекарственного средства *Staphylococcus aureus*. В этом случае колонии пересевают на скошенную плотную среду № 1, инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 18—24 ч. Выросшие колонии микроскопируют и, при выявлении грамположительных кокков, расположенных гроздьями, проводят тест на наличие фермента плазмокоагулаза.

Тест на наличие плазмокоагулазы (реакция плазмокоагуляции). Используют сухую кроличью цитратную плазму промышленного производства, в соответствии с инструкцией по ее применению.

Если в образце обнаружены грамположительные кокки, которые ферментируют маннит и дают положительную реакцию плазмокоагуляции, испытуемый продукт контаминирован *Staphylococcus aureus*.[#]

4-6. CLOSTRIDIA

4-6-1. Приготовление образцов и тепловая обработка. Готовят образец разведением 1 к 10 (минимальный общий объем 20 мл) не менее чем из 2 г или 2 мл испытуемого продукта, как описано в общей статье 2.6.12. Делят образец на две части, каждая из которых не менее 10 мл. Нагревают одну порцию при температуре 80 °С в течение 10 мин и быстро охлаждают. Вторую порцию не нагревают.

4-6-2. Селекция и пересев. Используют 10 мл или количество соответствующее 1 г или 1 мл испытуемого продукта из обеих порций образца для инокуляции подходящего количества (определенного как указано в 3-4) обогащенной среды для клостридий. Инкубируют в анаэробных условиях при температуре 30—35 °С в течение 48 ч. После инкубации делают пересев из каждого контейнера на колумбийский агар и инкубируют в анаэробных условиях при температуре 30—35 °С в течение 48—72 ч.

4-6-3. Интерпретация результатов. Анаэробный рост палочек (с эндоспорами и без них), дающих отрицательную реакцию на каталазу свидетельствует о присутствии клостридий. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

4-7. CANDIDA ALBICANS

4-7-1. Приготовление образцов и предварительное инкубирование. Готовят образец, как описано в общей статье 2.6.12 и используют 10 мл или количество соответствующее 1 г или 1 мл для инокуляции 100 мл декстрозного бульона Сабуро, перемешивают. Инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 3—5 дней.

4-5-2. Селекция и пересев. Пересевают на чашки с декстрозным агаром Сабуро и инкубируют при температуре 30—35 °С в течение 24—48 ч.

4-7-3. Интерпретация результатов. Рост белых колоний может свидетельствовать о присутствии *C. albicans*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

Следующий раздел приводится для информации.

5. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ РАСТВОРЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Нижеописанные растворы и питательные среды удовлетворяют целям, для которых они предназначены в фармакопейном испытании на микробную

контаминацию. Могут быть использованы и другие среды при условии, что их пригодность может быть доказана.

Основной буферный раствор. 34 г калия дигидрофосфата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят значение pH раствора до $7,2 \pm 0,2$ натрия гидроксидом, доводят водой очищенной до объема 1000,0 мл и перемешивают. Разливают в контейнеры и стерилизуют. Хранят при температуре 2—8 °С.

Фосфатный буферный раствор pH 7,2. Смешивают основной буферный раствор и очищенную воду (1:800, об/об) и стерилизуют.

Забуференный раствор натрия хлорида и пептона pH 7,0

Калия дигидрофосфат	3,6 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	7,2 г, что эквивалентно 0,067 М фосфата
Натрия хлорид	4,3 г
Пептон (мясной или казеиновый)	1,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов

Панкреатический гидролизат казеина	17,0 г
Папаиновый гидролизат соевых бобов	3,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дикалия гидрофосфат	2,5 г
Глюкоза моногидрат	2,5 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов

Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Папаиновый гидролизат соевых бобов	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответ

Декстрозный агар Сабуро

Декстроза	40,0 г
Смесь пептического гидролизата животных тканей и панкреатического гидролизата казеина (1:1)	10,0 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $5,6 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Агаризованная среда на основе картофельной декстрозы

Вытяжка из картофеля	200 г
Декстроза	20,0 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $5,6 \pm 0,2$ при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Декстрозный бульон Сабуро

Декстроза	20,0 г
Смесь пептического гидролизата животных тканей и панкреатического гидролизата казеина (1:1)	10,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $5,6 \pm 0,2$ при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Обогатительный бульон Мосселя для энтеробактерий

Панкреатический гидролизат желатина	10,0 г
Глюкоза моногидрат	5,0 г
Дегидратированная бычья желчь	20,0 г
Калия дигидрофосфат	2,0 г
Динатрия гидрофосфата дигидрат	8,0 г
Бриллиантовый зеленый	15 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение рН доводят таким образом, чтобы после нагревания оно составляло $7,2 \pm 0,2$ при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Нагревают при температуре $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин и немедленно охлаждают.

Агаризованная среда с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью

Дрожжевой экстракт	3,0 г
Панкреатический гидролизат желатина	7,0 г
Соли желчных кислот	1,5 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза моногидрат	10,0 г
Агар	15,0 г
Нейтральный красный	30 мг
Кристаллический фиолетовый	2 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение рН доводят таким образом, чтобы после нагревания оно составляло $7,4 \pm 0,2$ при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Нагревают до кипения. Не автоклавируют.

Бульон Макконки

Панкреатический гидролизат желатина	20,0 г
Лактоза моногидрат	10,0 г
Дегидратированная бычья желчь	5,0 г

Бромкрезоловый пурпурный	10 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$ при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Агаризованная среда Макконки

Панкреатический гидролизат желатина	17,0 г
Пептоны (мясной и казеиновый)	3,0 г
Лактоза моногидрат	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Соли желчных кислот	1,5 г
Агар	13,5 г
Нейтральный красный	30,0 мг
Кристаллический фиолетовый	1 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,1 \pm 0,2$ при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Кипятят в течение одной минуты при постоянном встряхивании, затем стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Обогащительный питательный бульон Рапппорта Вассилиадиса для *Salmonella*

Соевый пептон	4,5 г
Магния хлорид гексагидрат	29,0 г
Натрия хлорид	8,0 г
Дикалия гидрофосфат	0,4 г
Калия дигидрофосфат	0,6 г
Малахитовый зеленый	0,036 г
Вода очищенная	1000 мл

Растворяют при осторожном нагревании. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой, при температуре, не превышающей $115\text{ }^{\circ}\text{C}$. Значение рН доводят таким образом, чтобы после нагревания и автоклавирования оно составляло $5,2 \pm 0,2$ при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Агаризованная среда на основе ксилозы, лизина, дезоксихолата

Ксилоза	3,5 г
L-Лизин	5,0 г
Лактоза моногидрат	7,5 г
Сахароза	7,5 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Феноловый красный	80 мг
Агар	13,5 г
Натрия дезоксихолат	2,5 г
Натрия тиосульфат	6,8 г
Железа (III) аммония цитрат	0,8 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение рН доводят таким образом, чтобы после нагревания оно составляло $7,4 \pm 0,2$ при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Нагревают до кипения, охлаждают до температуры $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ и разливают по чашкам Петри. Не автоклавировать.

Агаризованная среда на основе цетримид

Панкреатический гидролизат желатина	20,0 г
Магния хлорид	1,4 г
Калия сульфат	10,0 г
Цетримид	0,3 г
Агар	13,6 г
Вода очищенная	1000 мл
Глицерин	10,0 мл

Нагревают до кипения и кипятят в течение 1 мин при встряхивании. Значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,2 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Агаризованная среда на основе маннита и соли

Панкреатический гидролизат казеина	5,0 г
Пептический гидролизат животных тканей	5,0 г
Говяжий экстракт	1,0 г
D-Маннит	10,0 г
Натрия хлорид	75,0 г
Агар	15,0 г
Феноловый красный	0,025 г
Вода очищенная	1000 мл

Нагревают до кипения и кипятят в течение 1 мин при встряхивании. Значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,4 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Обогащенная питательная среда для клостридий

Говяжий экстракт	10,0 г
Пептон	10,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Растворимый крахмал	1,0 г
Глюкоза моногидрат	5,0 г
Цистеина гидрохлорид	0,5 г
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия ацетат	3,0 г
Агар	0,5 г
Вода очищенная	1000 мл

Агар замачивают, растворяют при нагревании до кипения при постоянном перемешивании. При необходимости, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $6,8 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Колумбийский агар

Панкреатический гидролизат казеина	10,0 г
Пептический гидролизат мяса	5,0 г
Панкреатический гидролизат сердца	3,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Кукурузный крахмал	1,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар, в зависимости от	10,0—15,0 г

гелеобразующей способности
Вода очищенная

1000 мл

Агар замачивают, растворяют при нагревании до кипения при постоянном перемешивании. При необходимости, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$ при $25\text{ }^\circ\text{C}$. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой. Охлаждают до температуры $45\text{--}50\text{ }^\circ\text{C}$, и, при необходимости, прибавляют гентамицина сульфат в количестве, соответствующем 20 мг основания гентамицина; разливают по чашкам Петри.

#Кроме описанных выше сред в некоторых испытаниях могут использоваться следующие альтернативные питательные среды и реактивы:

Фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном

(1/15 моль)

Калия дигидрофосфат	3,56 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	7,23 г
Натрия хлорид	4,3 г
Пептон ферментативный сухой	1,0 г
Вода очищенная	1000 мл
рН	$7,0 \pm 0,2$

Компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 15 мин.

Нейтрализующая жидкость

Полисорбат 80	30 г
Лецитин (яичный)	3 г
Гистидина гидрохлорид	1 г
Пептон (мясной или казеиновый)	1 г
Натрия хлорид	4,3 г
Калия дигидрофосфат	3,6 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	7,2 г
Вода очищенная	1000 мл

Раствор стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 15 мин.

Если нейтрализующая способность раствора недостаточна, концентрация полисорбата 80 или лецитина может быть увеличена. Кроме того, могут быть добавлены нейтрализаторы, перечисленные в статье 2.6.12 в таблице 2.6.12.-2.

Среда № 1 (для выращивания бактерий)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза моногидрат	1,0 г
Агар	13,0 г
Мясная вода	1000 мл

Все компоненты растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 15 мин.

Жидкая среда № 1 (мясо-пептонный бульон)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза моногидрат	1,0 г
Мясная вода	1000 мл

К мясной воде прибавляют пептон и натрия хлорид, растворяют при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 15 мин.

Среда № 2 (для выращивания грибов, Сабуро-агар)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Глюкоза моногидрат	40,0 г
Агар	13,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $5,6 \pm 0,2$. Прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Для подавления роста бактерий после стерилизации прибавляют 100 мг бензилпенициллина натрия и 100 мг тетрациклина (либо перед стерилизацией — 50 мг хлорамфеникола) на 100 мл среды. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 15 мин.

Жидкая среда № 2 (среда Сабуро)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Глюкоза моногидрат	40,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $5,6 \pm 0,2$. Фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 15 мин.

Среда № 3 (среда обогащения для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Калия дигидрофосфат	2,5 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	7,5 г
Глюкоза моногидрат	10,0 г
Феноловый красный	0,08 г
Малахитовый зеленый	0,015 г
Мясная вода	1000 мл

Пептон и соли растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, прибавляют 8 мл 1% раствора фенолового красного и 3 мл 0,5% раствора малахитового зеленого, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 15 мин.

Среда № 4 (для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, агар Эндо)

Панкреатический гидролизат рыбной муки	12,0 г
Экстракт пекарных дрожжей	1,0 г
Натрия хлорид	3,4 г
Натрия сульфит безводный	0,8 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	0,5 г
Лактоза моногидрат	10,0 г
Фуксин основной	0,2 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты размешивают в воде очищенной, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,4 \pm 0,2$. Нагревают до полного расплавления агара и кипятят в течение 2—3 мин. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, снова нагревают до момента закипания. Охлаждают до температуры от 45 °С до 50 °С и разливают в чашки Петри.

Среда № 5 (для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, висмутсульфит агар)

Панкреатический гидролизат мяса	10,1 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	3,68 г
Натрия хлорид	2,6 г
Натрия карбонат	0,65 г
Висмута цитрат	2,38 г
Железа (II) аммония сульфат	0,97 г
Глюкоза моногидрат	3,9 г
Бриллиантовый зеленый	0,028 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты размешивают в воде очищенной, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,6 \pm 0,2$. Нагревают до полного расплавления агара и кипятят в течение 3—5 мин. Охлаждают до температуры от 45 °С до 50 °С и разливают в чашки Петри.

Среда № 6 (для определения ферментации глюкозы)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза моногидрат	40,0 г
Феноловый красный	0,08 г
Мясная вода	1000 мл

Пептон и натрия хлорид растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, прибавляют 8 мл 1 % раствора фенолового красного, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,2 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр и разливают в пробирки с поплавками по 4—5 мл. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. По окончании стерилизации быстро охлаждают.

Среда № 7 (для определения восстановления нитратов в нитриты)

Пептон ферментативный сухой	5,0 г
-----------------------------	-------

Натрия хлорид	5,0 г
Калия нитрат	1,5 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,2 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по 4—5 мл. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

Среда № 8 (среда обогащения для *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дикалия гидрофосфат	2,5 г
Глюкоза моногидрат	2,5 г
Вода очищенная	1000 мл

Пептон и соли растворяют в воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

Среда № 9 (для выявления пигмента пиоцианина)

Пептон ферментативный сухой	20,0 г
Магния хлорид безводный	1,4 г
Калия сульфат безводный	10,0 г
Глицерин	10,0 мл
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Пептон и соли растворяют в воде очищенной. Затем вносят глицерин, растворяют при нагревании, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,2 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

Среда № 10 (для идентификации *Staphylococcus aureus*)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	75,0 г
D-Маннит	10,0 г
Феноловый красный	0,025 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде очищенной, прибавляют 2,5 мл 1 % раствора фенолового красного, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,4 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

Среда № 11 (для предварительного обогащения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*)

Пептон ферментативный сухой	8,0 г
-----------------------------	-------

Лактоза моногидрат	5,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $6,9 \pm 0,1$. Фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121°C в течение 15 мин.

Среда № 12 (для накопления и выделения бактерий рода *Salmonella*, селенитовая среда)

Панкреатический гидролизат казеина	5,26 г
Лактоза моногидрат	4,21 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	6,23 г
Натрия гидроселенит (без теллура)	4,21 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты тщательно размешивают в 1000 мл воды очищенной. Колбу закрывают ватной пробкой, быстро доводят до кипения (до образования пузырьков) и сразу прекращают нагрев. Значение рН после стерилизации $7,5 \pm 0,2$.

Среда № 13 (для выявления сероводорода и определения ферментации лактозы, глюкозы и сахарозы; трехсахарный агар с солями железа)

Мясной экстракт	3,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Пептон	20,0 г
Лактоза моногидрат	10,0 г
Сахароза	10,0 г
Глюкоза моногидрат	1,0 г
Железа (II) сульфат	0,2 г
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия тиосульфат	0,3 г
Феноловый красный	0,024 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Среду разливают в пробирки по 7 мл. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121°C в течение 15 мин. При охлаждении скашивают, оставляя столбик высотой 2,5—3,0 см.

Среда № 14 (для определения утилизации натрия цитрата, цитратный агар Симмонса)

Натрия хлорид	5,0 г
Магния сульфат	0,2 г
Аммония дигидрофосфат	1,0 г
Дикалия гидрофосфат	1,0 г
Натрия цитрат	3,0 г
Бромтимоловый синий	0,08 г
Агар	20,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Соли растворяют в воде очищенной, вносят агар и нагревают до полного его расплавления, значение рН доводят таким образом, чтобы после

стерилизации оно составляло $7,2 \pm 0,1$. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, прибавляют 40 мл 0,2 % водного раствора бромтимолового синего. Среду разливают в пробирку по 5—7 мл. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. При охлаждении скашивают, оставляя столбик высотой 2,0—2,5 см.

Среда № 15 (для определения индола, бульон Хоттингера)

Натрия хлорид	5,0 г
Дикалия гидрофосфат	1,0 г
Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 1200— 1400 мг/л	1000 мл

Гидролизат Хоттингера разводят водой до содержания в среде 1200—1400 мг/л аминного азота, прибавляют соли, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,5 \pm 0,1$. Кипятят в течение 15 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

0,9 % раствор натрия хлорида

9,0 г *натрия хлорида Р* растворяют в 1000,0 мл *воды очищенной Р*. Раствор фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

Раствор № 1 (для промывания мембраны)

Пептон ферментативный	1,0 г
Вода очищенная	1000 мл
рН после стерилизации	$7,1 \pm 0,2$

Раствор № 2 (для промывания мембраны)

Пептон ферментативный	5,0 г
Полисорбат 80	10,0 г
Вода очищенная	1000 мл
рН после стерилизации	$7,1 \pm 0,2$

Растворы № 1 и № 2 стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

1 % раствор фенолового красного

1,0 г *фенолового красного Р* растирают в ступке, прибавляя небольшими порциями 0,1 М раствор *натрия гидроксида Р*. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до метки *водой очищенной Р*. Хранят во флаконе нейтрального стекла при температуре от $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в защищенном от света месте.

0,5 % раствор малахитового зеленого

0,5 г *малахитового зеленого Р* растворяют в горячей стерильной *воде очищенной Р* и доводят до объема 100,0 мл этим же растворителем. Раствор выдерживают в термостате в течение 1 сут, периодически перемешивая.

Реактив Грисса

Раствор № 1: 0,5 г *кислоты сульфаниловой Р* растворяют в 30 мл *кислоты уксусной ледяной Р*, прибавляют 100 мл *воды очищенной Р*, фильтруют.

Раствор № 2: 0,1 г нафтиламина Р растворяют в 100 мл кипящей воды очищенной Р, охлаждают, прибавляют 30 мл кислоты уксусной ледяной Р, фильтруют.

Перед употреблением смешивают равные объемы растворов № 1 и № 2.

Реактив на цитохромоксидазу

Раствор № 1: 1 % раствор α-нафтола Р в 96 % спирте Р.

Раствор № 2: 1 % раствор N,N-диметил-п-фенилендиамина дигидрохлорида.

Перед употреблением смешивают раствор № 1 и № 2 в соотношении 2:3.

Реактив Ковача

5,0 г п-диметиламинобензальдегида Р растворяют в 75,0 г пентанола Р или изоамилового спирта Р при легком нагревании до 50—55 °С (на водяной бане), охлаждают и медленно прибавляют 20,0 мл кислоты хлористоводородной Р.

Раствор должен быть желтого цвета.

Реактив Эрлиха

1,0 г п-диметиламинобензальдегида Р растворяют в 95 мл 96 % спирта Р и медленно прибавляют 20 мл кислоты хлористоводородной Р.[#]