

**НЕКОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «ЗАПАДНО-  
КАЗАХСТАНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
МАРАТА ОСПАНОВА»**

---

**М.А. Ажмуратова**

**Основы фармацевтической  
микробиологии**

**Учебное пособие**

Актобе 2022

НЕКОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «ЗАПАДНО-  
КАЗАХСТАНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ МАРАТА  
ОСПАНОВА»

---

---

М.А. Ажмуратова

# **Основы фармацевтической микробиологии**

Учебное пособие

Актобе 2022

УДК 579.61:615(075.8)

ББК 52 я73

А34

М

Учебное пособие разработала:

Ажмуратова М.А. – старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ЗКМУ имени Марата Оспанова, к.м.н.

### **Основы фармацевтической микробиологии**

Учебное пособие, Актобе, 2022г. – 80стр.

ISBN 978-601-80722-0-8

Рецензенты:

Уразгалиев К.Ш. – доцент кафедры фармацевтических дисциплин ЗКМУ имени Марата Оспанова, к.б.н.

Изимова Р.И. – доцент кафедры биологии АРГУ имени К. Жубанова, к.м.н.

Учебное пособие будет способствовать систематизации знаний, углубленному изучению предмета в целом, связи теоретических знаний и практических навыков, воспитанию гигиенического мышления.

Расчитано для студентов фармацевтического факультета и врачей практического профиля – провизоров и аптечных работников.

ББК 52я73

Методическое пособие выполнено:  
Западно-Казахстанским медицинским  
университетом имени Марата Оспанова

Утверждено на заседании АС от 27.06.2022. протокол № 6  
ЗКМУ имени Марата Оспанова  
в качестве учебного пособия для студентов и преподавателей  
фармацевтического факультета

**Содержание**

Введение .....	4
Список сокращений .....	5
1. Микрофлора лекарственных растений .....	6
1.1. Нормальная микрофлора растений .....	6
1.2. Фитопатогенные микроорганизмы .....	9
2. Микрофлора растительного лекарственного сырья .....	12
2.1. Определение микробной обсемененности растительного лекарственного сырья .....	13
2.2. Микрофлора воздуха как фактор загрязнения лекарственного сырья .....	14
2.3. Микрофлора почвы как фактор загрязнения лекарственного сырья .....	18
2.4. Приготовление смывов в асептических условиях .....	19
3. Санитарно-микробиологическое исследование аптек .....	20
3.1. Микрофлора готовых лекарственных форм .....	21
3.1.1. Источники загрязнения лекарственных средств .....	22
3.1.2. Исследование воздуха аптечных помещений .....	23
3.1.3. Микрофлора лекарственных средств и ее влияние на свойства препаратов .....	24
3.1.4. Влияние микроорганизмов-контаминантов на здоровье человека .....	26
3.1.5. Некоторые методы деконтаминации .....	27
3.2. Санитарно-микробиологический контроль лекарственных средств .....	29
3.2.1. Испытание на стерильность .....	33
3.2.2. Определение микробиологической чистоты .....	41
3.2.3. Состав питательных сред, используемых для испытания лекарственных средств на стерильность и микробиологическую чистоту .....	57
3.2.4. Испытание на пирогенность .....	65
3.2.5. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств .....	68
3.2.6. Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств .....	69
3.2.7. Исследование на содержание бактериальных эндотоксинов .....	71
3.3. Санитарно-микробиологическое исследование оборудования, лабораторной посуды, рук и спецодежды персонала .....	72
Заключение .....	75

## Введение

Настоящее учебное пособие подготовлено для студентов и преподавателей фармацевтического факультета, также может быть использовано врачами практического профиля – провизорами и аптечными работниками.

Контроль качества лекарственных средств, поступающих на потребительский рынок, находится в тесной связи с безопасностью их применения. В фармацевтической отрасли внедряется система обеспечения качества лекарственных средств от их создания до реализации и применения потребителем. В связи с этим в практической деятельности провизорам необходимы знания в области санитарной и фармацевтической микробиологии. Провизор должен иметь четкое представление о распространении микроорганизмов в природе и об их влиянии на свойства лекарственных препаратов.

В данном пособии представлены вопросы, касающиеся микрофлоры растений, лекарственного сырья и готовых лекарственных средств, микробиологических показателей качества лекарственных препаратов, методов санитарно-микробиологического контроля аптек. Приведенные в пособии сведения позволят овладеть практическими навыками выполнения санитарно-микробиологического исследования лекарственных препаратов, сырья, воздуха аптечных помещений, аптечного оборудования и посуды.

Приобретенные в области микробиологии знания и умения необходимы при организации фармацевтического дела (создание асептических условий, защита от микробной порчи лекарственного сырья и т.д.).

Учебное пособие позволит облегчить работу студентов с учебниками, расширить кругозор врачей практического здравоохранения, будет способствовать систематизации знаний,

Данное пособие является дополнением к учебникам, и его использование студентами будет способствовать оптимизации учебного процесса, лучшему усвоению предмета и воспитанию гигиенического мышления.

## Перечень сокращений, условных обозначений, символов

БГКП - бактерии группы кишечной палочки

ИПМ - изопропилмирикат

КОЕ - колониобразующие единицы

ЛС – лекарственное средство

МПА – мясопептонный агар

МПБ – мясопептонный бульон

НВЧ - наиболее вероятное число

ОМЧ – общее микробное число

ПАБ – пробоотборник аэрозольный бактериологический

ПОВ – прибор для отбора проб воздуха

ЦПХ - цетилпиридиний хлорид

## 1. Микрофлора лекарственных растений

Микроорганизмы являются неизменными спутниками не только человека и животных, но и, в равной степени, высших растений, в том числе используемых в качестве лекарственного сырья. В Казахстане используется более 100 видов лекарственных растений.

Все микроорганизмы, населяющие лекарственные растения, можно поделить на две группы:

- представители нормальной микрофлоры растений;
- фитопатогенные микроорганизмы – возбудители заболеваний растений.

### 1.1. Нормальная растительная микрофлора

Нормальную микрофлору растений можно разделить на эпифитные микроорганизмы, ризосферные микроорганизмы и микоризные грибы. Эпифитная микрофлора (греч. *epi* — вверху, *phyton* — растение) — микроорганизмы, растущие на поверхности стеблей или листьев растений. Они растут за счет питательной среды, представленной выделениями из тканей растения и примесями (пылью) и не наносят вреда растению. Эпифитная микрофлора препятствует проникновению фитопатогенных микроорганизмов в ткани растений и, таким образом, является антагонистом некоторых фитопатогенных микроорганизмов.

Состав растительной микрофлоры зависит от вида, возраста растения, типа почвы и температуры окружающей среды. Общая численность эпифитных микроорганизмов резко возрастает с увеличением влажности и усилением выделения продуктов обмена из тканей растений.

Его качественный состав достаточно однороден, типичными его представителями являются *Pseudomonas furbicola aurum* - граммотрицательные, короткоподвижные, палочковидные бактерии, образующие на МПА золотистые колонии; *Pseudomonas fluorescens* — полиморфная граммотрицательная палочковидная бактерия с полярными жгутиками, которая флюоресцирует на МПА. Реже встречаются споровые бактерии *Bacillus mesentericus*, плесени и дрожжи.

Состав эпифитной микрофлоры весьма специфичен. Нередко 80% от общего числа эпифитов составляют бактерии *Erwinia herbicola*. Второе место по численности занимают различные грибы (пенициллиум, мукор, фузариоз и др.). На поверхности семян разнообразная и богатая микрофлора. Так, на 1 г зерна ржи приходится не менее 2500 000 микробных клеток, пшеницы - 1500 000, риса - 250 000 грибов *Penicilium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor* и других. Развитие микроорганизмов на поверхности зерна во многом зависит от влажности и

температуры. Установлено, что при температуре 15-20°C и влажности 14,5-15% начинается развитие грибов на зерне пшеницы, а при влажности 17,5-18% начинают развиваться бактерии.

Микрофлору прикорневой зоны принято делить на микрофлору ризоплана – микрофлору, колонизирующую непосредственно на поверхности корня, и микрофлору ризосферы – микрофлору, населяющую почву, прилегающую к корню.

Количество микроорганизмов в ризоплане и ризосфере в сотни и даже тысячи раз превышает их содержание в окружающей почве. Почвенные микробы могут положительно влиять на растения:

1. минерализация органического материала и растительных остатков;
2. образование различных факторов роста (витаминов, аминокислот, ферментов), способствующих обменным процессам в растениях и улучшающих питание корней;

*Антагонизм к фитопатогенным микроорганизмам.*

Микрофлора ризосферы, участвуя в процессах трансформации органического вещества в почве, обеспечивает растения необходимыми элементами минерального питания и некоторыми биологически активными веществами. Углерод и другие минеральные и органические кислоты, выделяемые бактериями, способствуют растворению и поглощению растениями труднодоступных соединений, таких как фосфаты кальция, силикаты калия и магния. Синтезируемые микроорганизмами витамины (тиамин, витамин В<sub>12</sub>, пиридоксин, рибофлавин, пантотеновая кислота и др.) и ростовые вещества (гиббереллин, гетероауксин) оказывают стимулирующее действие на ростовые процессы растений. Кроме того, микроорганизмы в ризосфере расщепляют многие токсичные для растений соединения и обеззараживают почву. Многие сапрофитные бактерии из ризосферы являются антагонистами фитопатогенных микробов и выполняют роль дезинфицирующих средств для почвы. В любой почве изменения среды, в том числе агротехнические мероприятия, меньше сказываются на микроорганизмах ризосферы, чем на почвенных обитателях. Ризосферная зона представляет собой своеобразную «буферную» систему, препятствующую воздействию окружающей среды на микрофлору.



На численность и групповой состав ризоплана и ризосферной микрофлоры влияют: тип почвы, климатические условия, тип растительного покрова и стадия развития растений.

Корни растений стимулируют или ингибируют микроорганизмы в разной степени. Бобовые чаще всего стимулируют развитие микробов. Например, в ризосфере клевера обнаружено значительно больше микроорганизмов, чем в корневой зоне злаков и деревьев.

Как правило, в динамике численности микроорганизмов ризопланы и ризосферы наблюдаются два максимума: первый приходится на фазу кущения растений, второй – на фазу цветения и начало плодоношения. В зоне молодого корня доминируют неспорообразующие бактерии рода *Pseudomonas* и некоторые микроскопические грибы. К фазе цветения растений их сменяют бациллы; актиномицеты, образующие активные вещества – антибиотики, угнетающие развитие патогенов на корнях; клетчаткоразрушающие бактерии, которые принимают участие в разложении органических веществ отмирающих корней. Корневые выделения растений, несомненно, служат селективным фактором в формировании микробной ассоциации ризосферы. Например, в ризосфере пшеницы ведущая роль принадлежит микобактериям, в то время как в ризосфере клевера преобладают флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*.

Состав микрофлоры ризосферы специфичен для различных растений. Основная масса прикорневой микрофлоры представлена грамотрицательными неспороносными бактериями рода *Pseudomonas*, микобактериями и грибами, главным образом, базидиомицетами. Грибы образуют симбиоз с корнями растений, в том числе и лекарственных, называемый **микоризой**. В зависимости от особенностей симбиоза грибов с растениями различают эктотрофные и эндотрофные микоризы. **Эктотрофные** – ассоциации, при которых гриб поселяется на их поверхности корней, образуя своего рода чехол из мицелия. При **эндотрофных** микоризах мицелий гриба располагается в клетках коры корней растений, где образует скопления в виде клубков.

Микориза благоприятна для развития растений:

- увеличивает поглощающую поверхность корней за счет разрастаний гиф гриба;
- грибы своими ферментами разлагают органические соединения, обеспечивая растения аминокислотами, минеральными веществами и водой;
- микоризные грибы снабжают растения ростовыми факторами.

Растения выделяют ряд веществ, стимулирующих развитие гриба. Грибы получают от растений углеводы, служащие источником энергии.

**К микроорганизмам-микоризообразователям** относятся грибы, осуществляющие симбиоз с корнем высшего растения. Микориза

благоприятна для развития растений, так как увеличивает поглощающую поверхность корней за счет разрастаний гиф гриба. Кроме того, грибы своими ферментами разлагают органические соединения, обеспечивая растения аминокислотами, минеральными веществами и водой, а также синтезируют ростовые факторы. Растения, в свою очередь, выделяют ряд веществ, стимулирующих развитие гриба, а также грибы получают от растений углеводы, служащие источником энергии.

Микоризу образует большинство растений (за исключением водных), как древесных, так и травянистых (особенно многолетних). Травянистые растения вступают в микоризный симбиоз с микроскопическими грибами в основном из класса несовершенных грибов (*Deuteromycetes*), отчасти из класса зигомицетов (*Zygomycetes*) с мицелием, лишенным перегородок (неклеточным) и отчасти из класса сумчатых грибов (*Ascomycetes*). Грибы родов элафомицес (*Elaphomyces*) и трюфель (*Tuber*) образуют микоризу с буком, дубом и другими деревьями. Но большинство древесных пород образуют микоризу с грибницей шляпочных грибов – макромицетов из класса базидиальных (*Basidiomycetes*) и группы порядков гименомицетов.

## 1.2. Фитопатогенные микроорганизмы

К фитопатогенным микроорганизмам относятся бактерии, вирусы и грибы, вызывающие инфекционные заболевания растений. Заражение растений происходит через инфицированные семена, почву, грунтовые и дождевые воды, насекомых. Основным источником является почва, т.к. содержит остатки неразложившихся растений.

Фитопатогенные микробы могут проникать в растения через естественные образования (чечевица, нектарины, железы, корневые волоски) и повреждения. Некоторые микроорганизмы вырабатывают ферменты, лизирующие кутикулу растений и облегчающие внедрение возбудителя. Попадая в растение и достигая критической концентрации, микроорганизмы вызывают заболевание. Различают общие поражения всего растения за счет распространения возбудителя в сосудистой системе и локальные или очаговые поражения на листьях, стеблях, ветвях, корнях и корневищах, возникающие при внутриклеточном распространении.

Заболевания, вызываемые бактериями, называются бактериозами. Различают общий и местный бактериоз. Обыкновенный бактериоз вызывает гибель всего растения или его частей вследствие распространения возбудителя в сосудистой системе. Местные бактериозы ограничиваются поражением отдельных частей растений и возникают при внутриклеточном распространении.

По сочетанию анатомо-физиологических нарушений можно выделить следующие виды болезней растений:

- Резина, смола, слизь.
- Сухая и мокрая гнили проявляются размягчением и разрушением отдельных участков растительных тканей вследствие деятельности микробов.
- Мучнистая роса. При этом на листьях и побегах появляется белый налет.
- Пожелтение, увядание, высыхание. Некоторые бактерии могут повреждать клеточные мембраны сосудов, что приводит к закупорке сосудов и гибели растения.
- Чернь. При этом на листьях и побегах появляется темный налет.
- Сжигание. Заболевание характеризуется почернением листьев, молодых побегов, цветков, плодов.
- Окрашивание – образование пятен на листьях, плодах, семенах разного цвета, формы, размера.
- Опухоли - локальное увеличение ствола, ветвей, корней, корневища в виде разрастаний, отека, утолщения за счет клеточной гиперплазии.
- Язвы представляют собой углубления, часто окруженные приливами.
- Листовая мозаика выглядит как бледные пятна на листьях.
- Ведьмины метлы - образование побегов из спящих почек.
- Деформация проявляется в изменении формы органов (искривление побегов, искривление листьев, карликовость).

Принципиальное значение имеет отклонение от нормы метаболических процессов к качественным изменениям клеточных структур у больных растений, что приводит к изменению химического состава тканей и снижению содержания активных веществ. Использование их в качестве сырья в аптечных условиях становится невозможным.

Передача возбудителей бактериоза происходит через зараженные семена, остатки больных растений, почву, воду, воздух, насекомых, моллюсков, нематод. Бактерии попадают в растения через устьица, нектарники и

другие части, а также через мелкие повреждения. При попадании бактерий внутрь растений растительные клетки повреждаются, мацерируются и отслаиваются друг от друга. Такой путь проникновения называют **интрацеллюлярным и межклеточным**, а заболевания - **паренхиматозными**. Если распространение и размножение бактерий происходит в сосудистых пучках, то такие заболевания называются сосудистыми. При этом может произойти закупорка просвета сосудов бактериальной массой, что приводит к засыханию растений. Увядание растений также объясняется действием токсинов, выделяемых микроорганизмами.

К возбудителям бактериоза относятся *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, *Pectobacterium* и *Rhizobium* (табл. 1).

Таблица 1

### Фитопатогенные бактерии

Виды	Заболевания растений
<i>Erwinia amylovora</i> , <i>E. carotovora</i>	Ожог, увядание Мокрая бактериальная гниль
<i>Pseudomonas syringae</i>	Пятнистость
<i>Xanthomonas heterocea</i> , <i>X. campestris</i> , <i>X. beticola</i> , <i>X. vesicatoria</i>	Пятнистость, увядание сосудистый бактериоз туберкулез черная бактериальная пятнистость
<i>Corynebacterium insidiosum</i> , <i>C. fasciens</i> , <i>C. nichidanense</i>	Увядание увядание бактериальный рак
<i>Pectobacterium phetophtorum</i> , <i>P. aroidae</i>	Гнили
<i>Rhizobium leguminosorum</i>	Язвы
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Опухоли

Вирусы вызывают более 20% болезней растений. Большинство фитопатогенных вирусов относятся к родам *Reoviridae*, *Phytoreovirus*, *Fijivirus*. Вирусы вызывают мозаику и деформацию листьев. Из фитопатогенных грибов следует отметить два класса - аскомицеты и несовершенные грибы. Грибы, поражающие растения, могут вызвать пищевое отравление - микотоксикоз, если приготовлено из пораженного зерна. Такие поражения могут быть вызваны грибами родов *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* и др., способными размножиться на вегетирующих или скошенных растениях в условиях повышенной влажности и пониженной температуры. Примером микотоксикоза является эрготизм — заболевание, возникающее при употреблении в пищу продуктов,

приготовленных из зерен, зараженных эргономикой (грибок *Claviceps purpurea*).

Продолжительность инкубационного периода (период от момента заражения до появления поражений) зависит от температуры, влажности, освещенности, питания, устойчивости или чувствительности растения.

Растительный организм имеет защитные механизмы, противодействующие внедрению и размножению фитопатогенных бактерий. К ним относятся особенности покровных тканей, высокая кислотность клеточного сока, образование биологически активных веществ - фитонцидов, угнетающих рост микроорганизмов.

Меры профилактики включают обеззараживание семян и рассады, почвы, обработку растений химическими препаратами, уничтожение растительных остатков, переносчиков возбудителей болезней.

## **2. Микрофлора растительного лекарственного сырья**

Лекарственное растительное сырье может инфицироваться патогенными микроорганизмами на всех этапах заготовки (сбор, первичная обработка, сушка, измельчение, упаковка) и хранения. Увеличение микробной обсемененности вызывают повышенная влажность, пыль, насекомые и другие факторы. Достаточно быстро портятся плоды, ягоды и корневища, так как они богаты углеводистыми соединениями. Более устойчивыми являются сухие листья, корешки, кора. Внешними проявлениями микробной порчи растительного сырья являются изменение цвета и консистенции, загнивание всего растения либо его частей. Инфицирование лекарственного сырья приводит не только к резкому снижению или полному исчезновению биологически активных веществ, но и накоплению веществ, ядовитых для организма человека. В связи с этим внедрение такого сырья становится бесполезным или даже вредным. Состав микрофлоры растительного сырья определяется составом нормальной микрофлоры растения (эпифитная и ризосферная микрофлора), а также зависит от вида лекарственного сырья, его структуры и фармакологических параметров. Преобладают грибы (*Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Candida*), актиномицеты и спорообразующие виды микробов (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*).

Для предупреждения порчи лекарственного сырья необходимо проводить следующие мероприятия:

- уничтожать больные растения;
- соблюдать технологию транспортировки, сушки, хранения и переработки растительного лекарственного сырья.

### ***Санитарно-микробиологическое исследование лекарственного растительного сырья***

Для оценки санитарного состояния лекарственного сырья определяют микробное число (количество микробов в 1 г сырья) и количество плесневых и дрожжевых грибов.

**Определение микробной обсемененности растительного лекарственного сырья.** В асептических условиях (в стерильной чашке Петри, обожженными ножницами и пинцетом) из листа или верхнего слоя корневища вырезают кусочек массой 1 г или площадью 1 см<sup>2</sup>, который помещают в пробирку с 10 мл стерильного физиологического раствора и взбалтывают в течение 5 мин. Из полученного смыва готовят десятикратные разведения, для посева используют разведения 1:1000 и 1:10000. В стерильную чашку Петри вносят 1 мл смыва, после чего в нее наливают 15 мл расплавленного и остуженного до 45°C МПА, перемешивают и после застывания агара посева инкубируют при 37°C 24–48 ч. Производят подсчет выросших колоний на поверхности и в глубине агара. Затем делают пересчет на 1 г растительного сырья.

**Определение количества дрожжевых и плесневых грибов в растительном лекарственном сырье.** По 0,5 мл смывов из растительного лекарственного сырья засевают газоном на две чашки со средой Сабуро. Посевы инкубируют при температуре 20–22°C в течение 4 сут. После инкубации подсчитывают число колоний плесневых и дрожжевых грибов на обеих чашках Петри и определяют среднее арифметическое из суммарного числа колоний. Делают пересчет на 1 г или 1 см<sup>2</sup> исходного сырья.

*Допускается содержание в 1 г или 1 см<sup>2</sup> лекарственного сырья не более 10000 микроорганизмов, из них до 1000 грибов.*

## **2.1. Определение микробной обсемененности растительного лекарственного сырья**

Лекарства с высокой микробной контаминацией, особенно патогенны, могут вызывать инфекционные заболевания у человека, кроме того, размножение микроорганизмов в лекарствах приводит к изменению их физических и органолептических свойств, а в ряде случаев и к превращению лекарств в токсические продукты. Лекарственные растения (растительное сырье), срезанные и сорванные во время сбора урожая, могут содержать большое количество микробов.

*Растительные материалы могут быть заражены:*

- 1) нормальная растительная микрофлора;
- 2) фитопатогенная микрофлора, то есть микробы самих растений;
- 3) микробы из окружающей среды.

Растительное лекарственное сырье может быть контаминировано микроорганизмами из окружающей среды на всех стадиях его подготовки

и хранения: сборе, первичной обработке, сушке, измельчении, расфасовке, производстве измельченного сырья, растительных порошков, а также при приготовлении брикетов, гранулы, таблетки.

Срезанные и отсоединенные растения являются хорошей средой для размножения микроорганизмов (грибов, гнилостных и целлюлозоразрушающих бактерий и др.). В результате происходит микробная порча сырья. Признаки порчи: изменение цвета, появление очагов плесени и др. Микробная порча приводит к изменению фармакологических свойств растений и продуктов растительного происхождения, а также может вызывать образование токсических продуктов. Патогенные микроорганизмы могут вызывать заболевания у человека. Одним из способов предотвращения роста микроорганизмов на растениях является их сушка. В высушенных растениях активность микробов значительно снижается, многие бактерии погибают. В связи с этим микробная порча сырья происходит преимущественно при повышенной влажности, что способствует размножению гнилостных микробов. Поэтому необходимо строго соблюдать условия хранения растительного сырья и проводить бактериологический контроль его микробной обсемененности. Микробная обсемененность лекарственных средств зависит от соблюдения санитарно-гигиенического режима в аптеке.

## **2.2. Микрофлора воздуха как фактор загрязнения лекарственного сырья**

Микроорганизмы в воздухе находятся постоянно, несмотря на то, что атмосфера является неблагоприятной средой для их размножения, что обусловлено отсутствием питательных веществ и недостатком влаги. Жизнедеятельность микроорганизмов в воздухе обеспечивают взвешенные частицы воды, слизи, пыли и т. д.

Атмосферный воздух и воздух закрытых помещений значительно различаются по количественному и качественному составу микрофлоры.

Состав микрофлоры атмосферного воздуха зависит от интенсивности солнечной радиации, ветра, метеосадков, покрова почвы, плотности населения и др. Меньше всего микробов в воздухе над лесами, морями, снегами. Больше приходится на слои воздуха, расположенные над промышленными городами. В атмосферном воздухе находятся споры грибов, актиномицетов, бацилл, дрожжи, микрококки, сарцины, стафилококки др.

Обсемененность микроорганизмами воздуха закрытых помещений превышает бактериальную загрязненность атмосферного воздуха. Особенно велико число микроорганизмов в многолюдных общественных помещениях. Воздух закрытых помещений содержит в основном

микрофлору дыхательных путей и кожи человека, многие представители которой способны переживать в воздухе в течение времени, достаточного для инфицирования людей.

Микроорганизмы, находящиеся в воздушной среде, могут явиться причиной различных инфекционных заболеваний - гриппа, ангины, кори, скарлатины и др.

### ***Санитарно-бактериологическое исследование воздуха***

Микробиологическое исследование атмосферного воздуха, а также воздуха жилых помещений, занимает важное место при осуществлении его очистки от бактериального загрязнения, как мера борьбы с аэрогенными инфекциями.

Объектами санитарно-бактериологического исследования являются: воздух лечебно-профилактических и детских учреждений, мест массового скопления людей, промышленных районов. Для оценки работы вентиляции проводят исследование воздуха на различных этажах жилых зданий.

Исследование воздуха включает определение общего числа сапрофитных бактерий, стафилококков, стрептококков, которые являются показателями биологической контаминации воздуха микрофлорой носоглотки человека. При исследовании воздуха родильных домов, хирургических клиник определяют УПМ, вызывающие внутрибольничные инфекции. Методы отбора проб воздуха можно разделить на седиментационные и аспирационные.

**Седиментационный метод.** Две чашки Петри с питательным агаром оставляют открытыми в течение 60 мин, после чего посеы инкубируют в термостате при 37°C. Результаты оценивают по суммарному числу колоний, выросших на обеих чашках: при наличии менее 250 колоний воздух считается чистым, 250-500 колоний - загрязненным в средней степени, при количестве колоний более 500 - загрязненным.

Для определения микробного числа подсчитывают колонии выросшие на чашках Петри (площадь поверхности агара в чашке равна 75 см<sup>2</sup>) и расчет ведут по правилу: на поверхность площадью 100 см<sup>2</sup> за 5 мин оседает такое количество микробов, которое содержится в 10 л. воздуха.

$$X = \frac{A \times 10 \times 100}{75 \text{ см}^2}$$

X - количество микробов в 1 м<sup>3</sup>; A - количество колоний на агаре в чашке Петри.



**Аспирационный метод.** Он основан на принудительном осаждении микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды или на улавливающую жидкость. Для этого применяют прибор Кротова, бактериоловушку Речменского, прибор ПОВ-1 и др.

Аппарат Кротова (рис. 1) устроен таким образом, что воздух с заданной скоростью всасывается через узкую щель в плексигласовой пластине, закрывающей чашку Петри с питательным агаром. При этом, поскольку стакан (под входной щелью) постоянно вращается, аэрозольные частицы, содержащие микроорганизмы, фиксируются равномерно по всей поверхности. После инкубации посева в термостате подсчитывают количество микроорганизмов по формуле:

$$x = \frac{A \times 1000}{V}$$

Где,  $a$  - количество выросших на чашке колоний;  $V$  - объем пропущенного через прибор воздуха, л; 1000 - искомый объем воздуха, л.

Для определения микробного числа воздуха используют питательный агар, для выделения гемолитических стрептококков - кровяной агар с добавлением генцианового фиолетового, с последующим контрольным микроскопированием и выборочным пересевом подозрительных колоний на кровяной агар. *Staphylococcus aureus* выявляют методом посевов воздуха на желточно-солевой агар.

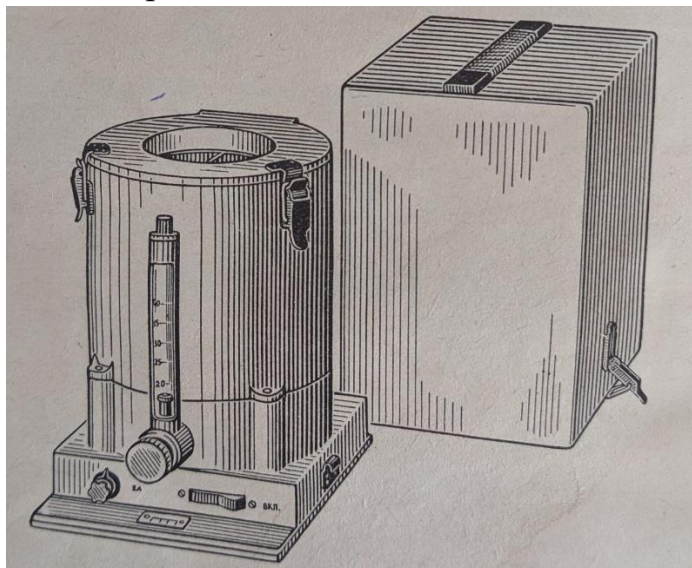


Рис. 1. Аппарат Кротова для бактериологического исследования воздуха

Для исследования воздуха можно использовать и другие устройства, когда объем воздуха пропускают через жидкость или фильтр, а затем измеряют на питательной среде. С помощью ПАБ-1 и ПОВ-1 можно

исследовать большие объемы воздуха и обнаруживать болезнетворные бактерии и вирусы. Прямое выявление патогенных и условно-патогенных бактерий - возбудителей внутрибольничных инфекций (стафилококков, синегнойной палочки и других грамотрицательных бактерий) в настоящее время проводится при исследованиях воздуха в стационарах: хирургических, акушерско-гинекологических и др.

При возникновении внутрибольничной инфекции стафилококковой этиологии проводят исследование для установления источника и пути передачи инфекции: на определение идентичности стафилококков, выделенных из объектов внешней среды и методом фагового типирования от больных и обслуживающего персонала. Нормативные показатели микробного обсеменения и содержания золотистого стафилококка. Золотистый стафилококк, выделенный для воздуха больничных палат, приведен в табл. 2.

*Таблица 2.*

Критерии оценки микробного обсеменения воздуха в больничных помещениях

Исследуемый объект	Микробное число	Staph. aureus (250 л.)
Воздух операционных:		
До начала работы	Не выше 500	Не должно быть
Во время ее	» » 1000	То же
Воздух родильных залов	» » 1000	» »

Для определения общего числа бактерий забирают две пробы по 100 л каждая. Посевы инкубируют в термостате 24 ч, а затем оставляют на 48 ч при комнатной температуре. Подсчитывают количество колоний на чашках, вычисляют среднее арифметическое и делают перерасчет на количество микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> воздуха.

Более точный количественный метод определения микробного числа воздуха.

### **2.3. Микрофлора почвы как фактор загрязнения лекарственного сырья**

Почва является основным резервуаром и естественной средой обитания микроорганизмов, которые участвуют в процессах формирования и очистки почвы, а также в цикле веществ в природе.

Жизнедеятельность микроорганизмов в почве, они качественного и количественного состава определяются почвенными условиями: наличием питательных веществ, влагой, аэрацией, реакцией, температурой.

Тип почвы оказывает большое влияние как на общее количество, так и на соотношение отдельных систематических групп микроорганизмов. Отличаясь физическими и химическими свойствами, почва представляет собой различную среду для жизнедеятельности микроорганизмов. Их больше во влажной и обработанной почве (4,2-5,2 млрд/г), меньше в лесной почве, в песках (0,9-1,2 млрд/г). Самая обильная микрофлора в верхнем горизонте почвы глубиной 2,5-15 см. В этом слое происходят основные биохимические процессы трансформации органических веществ, обусловленные жизнедеятельностью микроорганизмов. На глубине 4-5 м количество микроорганизмов значительно уменьшается, так как уменьшается количество питательных веществ и ухудшаются условия аэрации.

В состав почвенной микрофлоры входят следующие группы микроорганизмов: бактерии аммонификаторы, вызывающие гниение трупов животных, остатков растений, разложение мочевины с образованием аммиака и других продуктов: аэробные бактерии - *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *Serratia marcescens*; бактерии рода *Proteus*; грибы рода *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*; анаэробы - *C. sporogenes*, *C. putrificum*; уробактерии - *Urobacillus pasteurii*, *Sarcina urea*, расщепляющие мочевину; нитрифицирующие бактерии: *Nitrobacter* и *Nitrosomonas* (*Nitrosomonas* окисляют аммиак до азотистой кислоты, образуются нитриты, *Nitrobacter* превращают азотистую кислоту, оксида и нитратов); азотфиксирующие бактерии: усваивают из воздуха без кислорода и в процессе своей жизненной деятельности из молекулярного азота синтезируют белки и другие органические соединения азота, используются растения, бактерии, участвующие в круговороте серы, железа, фосфора и других элементов - серобактерии, железобактерии (серобактерии окисляют сероводород до серной кислоты, железобактерии окисляют соединения железа в гидрат окиси железа, фосфора бактерии способствуют образованию легко растворимых соединений и фосфора); бактерии, расщепляющие клетчатку, вызывающие брожение (лактобактерий, алкоголь, маслянокислые, уксусные, пропионовые).

С выделениями человека и животных, с фекально-бытовыми сточными водами в почву могут попасть патогенные и условно-патогенные микроорганизмы (возбудители грибных заболеваний, ботулизма,

столбняка, газовой гангрены, сибирской язвы, бруцеллеза, лептоспироз, кишечные инфекции).

#### *Санитарно-бактериологическое исследование почвы*

При осмотре почвы может быть проведен полный или короткий анализ. Полный санитарно-бактериологический анализ почвы проводится: для более глубокой характеристики санитарного состояния почвы; для определения пригодности почвы, при использовании жилищ, мест отдыха, детских учреждений и сантехнических сооружений; для проведения эпидемиологических исследований.

Краткий анализ рекомендуется при осуществлении текущего санитарного контроля и включает в себя определение общего числа сапрофитных бактерий, БГКП (коли-титр и коли-индекс), клостридий (перфрингенс-титр), термофильных бактерий, нитрифицирующих.

Полный санитарно-бактериологический анализ включает дополнительно: определение актиномицетов, грибов, сальмонеллы, шигеллы, возбудителей столбняка, ботулизма, бруцеллеза, сибирской язвы.

Схема санитарного состояния почвы по микробиологическим показателям:

Категория почвы	Титры	Число термофильных бактерий на 1г.
Коли-титр	Перфрингенс-титр	
Чистая	1 и выше	0,01 и выше
Загрязненная	0,9-0,01	0,009-0,0001
Сильно загрязненная	0,09 и ниже	0,00009 и ниже

#### **2.4. Подготовка моющих средств в асептических условиях**

Для исследования используют 3 флакона. 10 мл стерильного физиологического раствора заливают одним из флаконов, внутреннюю поверхность емкости промывают, заливают во второй и третий флаконы, последовательно промывая.

Пробки (корковые, полиэтиленовые, резиновые) в количестве 5 штук стерильными пинцетами помещают в стерильную колбу с широким горлом, закрывают ватной марлей, заливают 10 мл стерильного физиологического раствора и тщательно промывают. Воронки, пробирки, пипетки промывают 10 мл стерильного физиологического раствора.

Промывка со стола выполняется с поверхностью 100 см<sup>2</sup>, для чего используются специальные трафареты из проволоки или олова, стерилизованные кальцинированием, прежде чем принимать моющие средства. Промывание проводят стерильным ватным тампоном, помещают

в пробирку с 2 мл стерильного физиологического раствора (тампон не должен касаться поверхности раствора). Непосредственно перед взятием туалетного тампона, смоченного физиологическим раствором, тщательно втираемым в поверхность стола, ограниченную трафаретом, помещают в пробирку, в которую добавляют 8 мл стерильного физиологического раствора и тщательно промывают.

Промывание рук берется влажным тампоном (тампон находится в пробирке с 2 мл стерильного физиологического раствора), протирая ладони, межпальцевые пространства обеих рук. Тампон помещают в пробирку, добавляют 8 мл стерильного физиологического раствора и тщательно промывают.

Промывка исследуется на предмет общего бактериального загрязнения (ОМЧ), на наличие *E.coli* и *Staphylococcus aureus*; обнаружение которых свидетельствует о грубых нарушениях санитарного режима в аптеках.

*Определение микробного числа.* 1 мл промывки добавляют в стерильную чашку Петри, заливают 12-15 мл расплавленного и охлажденного до 45<sup>0</sup>С МПА, содержимое стакана тщательно перемешивают и после закали агары помещают в термостат на 24-48 часов. Количество выращиваемых колоний рассчитывается, умножается на 10 и определяется общее микробное загрязнение участка.

### **3. Санитарно-микробиологическое исследование аптек**

Приказ министра здравоохранения Республики Казахстан от 7 июля 2021г. №ҚР ДСМ-58. Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 9 июля 2021 года. № 23416 Об утверждении Санитарных правил "Санитарно-эпидемиологические требования к объектам распространения лекарственных средств и медицинских изделий".

В аптеках по инструкции, утвержденной приказом Минздрава, не менее двух раз в квартал проводится бактериологический контроль, объектами которого являются:

- дистиллированная вода;
- растворы для инъекций до и после стерилизации;
- глазные мази после стерилизации;
- глазные капли, приготовленные асептически на стерильной основе;
- нестерильные лекарственные формы;
- аптечная посуда, пробки, прокладки, другие материалы;
- инвентарь, оборудование, руки, санитарная одежда персонала;
- воздух в аптечных помещениях.

### 3.1. Микрофлора готовых лекарственных форм

Готовые лекарственные формы подвергаются микробной порче: сухие (порошки, сборы), жидкие (отвары, настои, отвары, капли), мягкие (мази, пасты, шарики, свечи) и стерильные инъекционные препараты. Препараты с высоким загрязнением, микробами, особенно патогенными, могут вызывать инфекционные заболевания у человека. Фитозоонозные - инфекции от болезнетворных микроорганизмов, общие для теплокровных (в том числе и люди), и растения, наиболее часто встречающиеся в кишечнике возбудители йерсиниоза, листериоза, псевдотуберкулоза, микотоксикоза. Размножение микроорганизмов в готовых препаратах приводит к изменению их физических и органолептических свойств, появлению токсичности.

Микробная обсемененность лекарственных препаратов зависит от соблюдения аптеки санитарно-эпидемиологического режима, регламентируемого в настоящее время в приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 7 июля 2021 года №ҚР ДСМ-58 для утверждения санитарных правил "Санитарно-эпидемиологические требования к объектам в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий". Причиной микробного загрязнения готовых препаратов может быть микробное загрязнение растительного лекарственного сырья, воздуха промышленных помещений, оборудования, посуды, дистиллированной воды и рук персонала.

Инъекционные препараты, глазные капли и мази, препараты для новорожденных должны быть стерильными. В некоторых случаях инъекционные средства, оставаясь стерильными, обладают пирогенными свойствами. Пирогенная реакция организма человека, возникающая вследствие применения лекарственных препаратов, характеризуется повышением температуры, вазомоторными нарушениями, в тяжелых случаях – шоковым состоянием. Пирогенные вещества (пирогены), являющиеся эндотоксинами (преимущественно грамотрицательными бактериями), не инактивируются при кипячении, для их уничтожения требуется автоклавирование в течение 3 часов.

Причиной пирогенности препаратов (появление эндотоксинов и пирогенности) являются микробное загрязнение дистиллированной воды, нарушения асептики производственного процесса, увеличение времени между подготовкой раствора и стерилизацией.

Сухие порошкообразные вещества, особенно тальк и крахмал, мягкие лекарственные формы также восприимчивы к микробному загрязнению. Их микробное поражение имеет очаговый характер и проявляется изменением цвета и консистенции вещества.

Микробный состав готовых препаратов может быть представлен следующими группами:

- плесень и дрожжевые грибы - *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*;
- кокки-сарцины, стафилококки;
- спороносные палочковидные бактерии-*B. subtilis*, *B. mesentericus*.

Предупреждение микробной порчи готовых лекарственных веществ возможно при определенных условиях, которые уменьшают их микробное загрязнение: соблюдение правил личной гигиены, качественная дезинфекция воздуха, аптечные сифоны, манипулирование приборами, оборудование при необходимости (стерильные препараты) - асептическое производство.

Все лекарственные формы из-за несоблюдения метода их приготовления могут подвергаться микробному загрязнению, в том числе и патогенным микроорганизмам. Применение таких препаратов может привести к развитию инфекционных заболеваний у человека.

### **3.1.1. Источники загрязнения лекарственных средств**

Основными источниками загрязнения лекарственными препаратами (лекарствами) микроорганизмами являются:

- технологическое оборудование;
- сырье и вспомогательные вещества на всех этапах производства, хранения и транспортировки продукции;
- вода, используемая в производстве;
- воздух промышленных помещений;
- персонал.

Вспомогательные вещества, в частности картофельный крахмал, часто содержат грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium*, среди которых были обнаружены производители микотоксинов. Помимо вспомогательных материалов, основное сырье, чаще природного происхождения, и упаковочные материалы обнаруживаются в качестве источников загрязнения лекарственными средствами.

Вода является частью лекарств или используется в их производстве. Системы подачи воды в производственных помещениях достаточно обширны. Многие виды бактерий могут выжить в воде в течение определенного времени. Время их выживания в воде в основном зависит от типа бактерий и концентрации микробной суспензии, температуры и состава воды.

Микроорганизмы могут быть введены в препараты с воздухом. Жизнеспособность микроорганизмов в воздухе обеспечивают взвешенные

частицы воды, слизи, пыли, почвы. Загрязнение воздуха в жилых и некоторых промышленных помещениях всегда выше атмосферного. Причинами попадания микроорганизмов в лекарственные средства через воздух могут быть высокая первичная загрязненность атмосферного воздуха или неэффективная работа систем подготовки воздуха.

Среди источников загрязнения лекарствами наиболее значимым является персонал.

Микроорганизмы могут попасть в продукт:

- воздушно-капельный путь с выделениями полости рта и носа;
- воздушно-пылевые и контактные пути с участками кожи, незащищенной одеждой и даже индивидуальной технологической одеждой.

Значительное количество микроорганизмов выделяется из верхних дыхательных путей человека в окружающее пространство. При чихании на расстоянии 10 м и более распространяется от 100 до 1000 жизнеспособных клеток бактерий и вирусов, со слюной-102-106 шт./мл слюны, с секретом из полости носа - 101-106 шт./мл. Наиболее обсемененными элементами кожи являются запястья, лицо, шея. В других частях человеческого тела количество сапрофитных аэробных бактерий находится в диапазоне 105-106 кое / см<sup>2</sup>. Количество механических и микробных частиц зависит от характера выполняемых движений. В течение 1 минуты человек, не двигаясь, выделяет в окружающую среду 10-1000 механических и микробных частиц, а во время интенсивной работы – до 106. Количество частиц, отделяемых технологической одеждой, зависит от типа ткани, способа обработки швов и края, а также от степени износа. Соблюдение гигиены, применение мер дезинфекции, а также повышение квалификации работников могут привести к снижению загрязнения микроорганизмами лекарственных средств.

### **3.1.2. Исследование воздуха в аптечных помещениях**

Пробы воздуха берут в следующих помещениях аптеки:

1. асептический блок, стерилизационная;
2. вспомогательная, упаковочная, материальная комната;
3. прачечная;
4. сервисный зал.

Отбор проб воздуха осуществляется в следующих условиях:

А) чистая, подготовленная к работе комната не ранее 30 минут после влажной уборки;



Б) закрытые окна, окна и двери;

В) уровень отбора проб воздуха соответствует высоте рабочего стола.

Пробы воздуха берутся аспирационным методом с помощью приборов бактериологического анализа воздуха: прибор Кротова, точки зрения, паба. Скорость вытягивания воздуха должна составлять 25 литров в минуту. Количество воздуха, проходящего через аппарат, составляет 100 литров для определения общего количества бактерий, 250 л., для определения дрожжей и плесени, 250 л., для определения золотистого стафилококка.

Исследование воздуха аптечных помещений проводится с целью определения:

1. общего количества бактерий;
2. наличие дрожжей и плесени;
3. *Staphylococcus aureus*.

Чтобы определить общее количество бактерий, воздух высевается на МПА, грибы на твердую среду Сабуро. *Staphylococcus aureus* обнаруживается на желточно-солевом агаре.

Бляшки с культурами МПА и желточно-солевой агар доставляются в лабораторию и инкубируются при 37°C в течение 18-24 часов. Посевы в среде Сабуро инкубируют при температуре 22-24°C в течение 4 дней.

Для определения общего бактериального загрязнения через 24 часа изучаются культуры, рассчитывается количество выращиваемых колоний и пересчитывается до 1 м<sup>3</sup>.

Для определения золотистого стафилококка через 48 часов посеvy изучаются, а колонии, подозрительные на золотистый стафилококк, подсчитываются и идентифицируются по морфологическим, тинкториальным, плазмокоагулирующим свойствам. Количество золотистого стафилококка определяется в воздухе м<sup>3</sup>.

Чтобы определить количество дрожжевых и плесневых грибов, выращенные колонии дрожжевых и плесневых грибов подсчитываются и пересчитываются на 1 м<sup>3</sup> воздуха.

### **3.1.3. Микрофлора лекарственных средств и ее влияние на свойства препаратов**

Присутствие микробов может существенно повлиять на терапевтическое значение ЛС, начиная с его устойчивости, заканчивая потенциальной

опасностью для здоровья человека из-за токсигенных, аллергенных, а иногда и канцерогенных свойств некоторых видов бактерий и грибов, а также их метаболитов.

Чаще всего в фармацевтических препаратах обнаруживаются:

- спорообразующие бактерии (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*);
- бактерии рода *Salmonella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas aeruginosa* и другие виды этого рода;
- кокки-сарцины, стафилококки;
- грибы рода *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida*.

Микроорганизмы способны разрушать и трансформировать различные компоненты препаратов за счет широкого набора ферментов. При этом биологически активные вещества препаратов могут быть изменены количественно или полностью уничтожены. Например, в таблетках преднизолон обусловлен наличием *Aspergillus sp.* Установлено преобразование стероида; в глазные капли с атропином, содержащие *Corynebacterium sp.*, было обнаружено снижение содержания атропина сульфата. Микроорганизмы могут расщеплять консерванты: метилпарабен разлагается *P. aeruginosa*, а сорбиновая кислота - из грибов рода *Penicillium* и др.

Микроорганизмы могут вызывать изменение органолептических свойств различных лекарственных форм, часто сопровождающихся многими нежелательными изменениями внешнего вида (обесцвечивание, газообразование), вкуса и запаха.

В жидких лекарственных формах метаболиты микроорганизмов могут изменять свой химический состав, а также приводить к образованию токсических продуктов. Из жидких лекарственных форм настои и отвары легче всего высевают микробами; здесь чаще всего обнаруживаются дрожжи и плесень. При хранении лекарств появляются признаки порчи: помутнение, изменение цвета, пленка, осадок, необычный запах. Срок годности этих препаратов ограничен. Спиртовые настойки менее подвержены порче из-за противомикробного действия алкоголя.

Легкие лекарственные формы также подвержены микробному загрязнению. Их микробное поражение является очаговым и проявляется изменением запаха, цвета и консистенции вещества. Например: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* приводят к изменению цвета, делению фаз, появлению неприятного запаха в эмульсиях. Кроме того, на поверхности кремов и мазей возможно развитие *C. albicans*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Verticillium sp.*

В твердых лекарственных формах риск микробной порчи меньше, так как нет условий для размножения микробов. Наличие аспирина и таблеток кодеина *Penicillium* sp., это приводит к поверхностному обесцвечиванию образцов и запаху уксусной кислоты. Такие же изменения вызывают *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. в таблетках нитрозепама. Нередко загрязнение регистрируется в группе коллоидных порошков неорганической природы (общее количество бактерий и грибов более 1000 на 1 г). Вероятно, коллоидные свойства этих порошков способствуют агрегации спор плесени. Кроме того, магний, составляющий структуру этого порошка, является основным микроэлементом в питании бактерий и грибов.

### **3.1.4. Влияние загрязняющих микроорганизмов на здоровье человека**

Помимо ухудшения качества препаратов под воздействием микроорганизмов, загрязненные препараты могут быть опасны для здоровья пациентов. Основными негативными последствиями использования больным зараженных ЛС могут быть снижение или отсутствие терапевтического действия препарата, возникновение побочных реакций, заболеваний, а также перенос и распространение лекарственных препаратов на устойчивые бактерии и грибы.

Серьезные заболевания пациентов могут быть вызваны продуктами биоразрушения или микробными токсинами. Последние могут вызывать токсикоинфекции - острые кишечные заболевания, развивающиеся после приема внутрь лекарственных препаратов, загрязненных патогенными и условно-патогенными бактериями, выделяющими токсины.

Среди них различные микроорганизмы: энтеротоксигенные варианты *Escherichia coli*, *Proteus*, *Enterococcus*, *V. cereus*, *S. aureus*, *Cl. perfringens*, реже – *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*.

Возникновение, развитие и исход заболевания зависят от уровня микробного загрязнения, вирулентности микробов, иммунного статуса пациента и способа введения препарата. Наибольшую опасность представляет их введение в кровоток, глаза, в полость тела, обычно стерильное. При местном применении препаратов вероятность развития инфекционного процесса увеличивается при обширном повреждении тканей в результате травмирования, жжения, хирургического вмешательства. Такие инфекции представляют наибольшую опасность для людей со сниженным иммунным статусом: новорожденных, пожилых пациентов, ослабленных больных.

Лекарственная инфекция наиболее распространена в офтальмологической практике. В настоящее время большое внимание уделяется изучению микрофлоры глазных контактных линз и растворов для их промывания, так как из-за микробного загрязнения последних резко возрастает риск заболеваний глаз.

Возможно развитие кожных заболеваний, вызванных использованием лечебных кремов, загрязненных *P. aeruginosa* и *C. albicans*.

В некоторых случаях препараты, оставаясь стерильными, приобретают **пирогенные свойства**. При парентеральном и особенно внутрисосудистом введении таких препаратов наблюдается стремительное повышение температуры тела до 40°C. Кроме того, происходит учащенный пульс, появляется озноб, повышенное потоотделение, тошнота и головная боль. В особо тяжелых случаях эти явления приводят к смерти.

**Пирогенными веществами (пирогены)** являются эндотоксины (в большей степени, грамотрицательных микробов). С химической точки зрения пирогены представляют собой сложные вещества с высокой молекулярной массой и размером частиц от 50 до 1 мкм, состоящие в основном из липополисахаридов, адсорбированных на белковом носителе. Пирогены растворимы в воде, нерастворимы в спирте и ацетоне, устойчивы к повышенным температурам. Нагрев в автоклаве при 120°C в течение 20 минут приводит к гибели бактерий, но не уничтожает пирогены. Чувствительность пирогенов к высокой температуре различна. Изменение pH водного раствора практически не влияет на термолабильность пирогенов. В сухом состоянии их полное разложение осуществляется только при температуре 200°C в течение 30 мин; стерилизация сухим воздухом при 160°C в течение 2 часов не гарантирует полной апиrogenности. Повышение температуры сокращает время, необходимое для уничтожения пирогенов. При температуре 600°C достаточно минутного нагрева, при 450°C – двухминутного, поэтому из них практически невозможно выпустить воду и растворы для инъекций путем термической стерилизации.

Пирогенные вещества чувствительны к действию окислителей, например, перекиси водорода или перманганата калия. Пирогены имеют очень небольшие размеры и проходят через самые плотные фильтры с размерами пор от 0,005 до 0,001 микрон.

Появление пирогенности препаратов возможно из-за микробного загрязнения дистиллированной воды, нарушения асептики технологического процесса, увеличения времени между приготовлением раствора и стерилизацией (более 1,5 часов).

### 3.1.5. Некоторые методы деконтаминации

**Экстрагирование.** Во многих случаях небольшое количество воздуходувок может справиться с самим процессом. Например, добыча лекарственного растительного сырья за счет употребления алкоголя может быть ограничена за счет снижения числа болезнетворных инфекций. Более высокие концентрации этанола (от 60% до 95%) оказывают бактерицидное и фунгицидное действие на растительные формы, но это действие должно сохраняться и при более значительных концентрациях (от 20%). В то же время концентрация этанола и антибактериальная активность также зависят от стабильности производства, температуры.

Венецианские вольеры дружелюбны к человеку и очень чувствительны к теплу и движению. Остаточное микробное загрязнение после процесса экстракции в основном представляет собой бактериальные эндоспores, устойчивые к антибактериальным агентам, таким как этанол. Нагрев отопительной воды и эффективное приготовление продуктов с общей сетью

Производство сухих экстрактов, если таковые имеются, зависит от испаряемости ткани. В большинстве случаев получается густой экстракт, в котором остается некоторое количество пищи, которая отделяется вспомогательными средствами сушки, например, распылительными или ленточными сушилками. После испарения спирта общая организация микроорганизмов может быть улучшена так же, как и в предшествующем уровне техники. Этот аспект учитывается при проектировании производственного процесса.

По данным, полученным в результате исследований по экстрагированию кипятком экстрактов из лекарственных трав, общее количество пищевых и дрожжевых и плесневых грибов можно уменьшить в среднем более чем на 2 порядка путем экстрагирования кипятком. Количество неспорообразующих бактерий (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*) сильно зависит от растительного материала, в то время как количество спорообразующих заболеваний (*Bacillus cereus*) значительно зависит от экстракции кипяченой водой, что сохраняет его постоянным.

Поскольку вода является результатом роста и размножения, срок хранения жидких и густых водных экстрактов без консервантов не может превышать 24-х часов при температуре от 2 до 8°C. Другие правила безопасности следуют и поддерживают данные о стабильности.

Принимая во внимание влияние растворителей с высоким уровнем выбросов, экстракция CO<sub>2</sub> снижает количество аэробных бактерий, дрожжей и плесени, а также снижает их уровень.

Экстракция этанолом помогает уменьшить микробное загрязнение, поэтому для сведения к минимуму микробного загрязнения может потребоваться повторная обработка экстракта этанолом с последующим выпариванием.

*Термическая обработка.* Для минимизации микробного обсеменения при необходимости перед сушкой растительной продукции и трав можно проводить кратковременную термическую обработку (высокотемпературную) или пастеризацию. Подобные процедуры, как правило, не применяются для экстрактов с высоким содержанием смол, высоковязких экстрактов с тонкодисперсным остатком выше 50% или экстрактов с термолабильными или летучими компонентами.

Высокотемпературная сушка в небольших шахтах, таких как промышленная химчистка по всему миру. Продолжительная сушка при более низких температурах в стационарных сушилках может снизить воздействие определенных химических компонентов, но менее эффективна для снижения частоты возникновения сушильных машин и неэффективна против споровых грамположительных инфекций. Эволюция температур, их потребностей, может привести к физико-химическим, химическим и экологическим

Пропаривание при температуре 65°C может предотвратить появление некоторых микроорганизмов. Процесс выполнения аналогичной обработки выполняется остальными состояниями с тем же контролем.

*Введение консерванта.* Добавление противомикробного комплекса не снижает процесс обеззараживания. Однако, если рост микробов наблюдается в лекарственном средстве без использования консерванта, этот метод предотвращения микробного роста будет оставаться неизменным в течение всего срока годности лекарственного средства.

*Фумигация.* Фумигация лекарственных растений для борьбы с вредителями и болезнями растений также уменьшает загрязнение микробами. Как правило, окуливание пестицидами используется при выращивании культурных видов лекарственных растений. Рекомендуется максимально ограничить применение фумигантов, используя их только в

случае необходимости. Только на самой ранней стадии фумиганта выбор фумиганта, его концентрация и условия использования (температура, влажность, время воздействия) тщательно оцениваются для минимизации остаточного содержания фумиганта в растительном материале. Потенциальная транспортировка остатков фумиганта к растительному препарату и растительному лекарственному продукту при необходимости должна быть всесторонне проанализирована с использованием методов контроля наличия остатков фумиганта в продукте. Оксид этилена не используется для обезвреживания лекарственных растительных материалов.

### 3.2. Санитарно-микробиологический контроль лекарственных средств

Объектами микробиологического контроля в аптеках являются первичная, промежуточная и готовая продукция, вспомогательные вещества и материалы, руки и санитарная одежда персонала, воздух и поверхности помещений и оборудования.

Для соблюдения санитарного режима производства лекарственных средств проводится санитарно-микробиологический контроль за объектами окружающей среды предприятия и каждой серией производимой лекарственной формы. Микробиологическая чистота произведенных лекарственных средств (лекарственных средств и субстанций), а также вспомогательных веществ, используемых в производстве лекарственных средств, должна соответствовать стандартам (табл.3, 4). Нестерильные лекарственные средства могут быть загрязнены микроорганизмами. Они позволяют иметь ограниченное количество микроорганизмов при отсутствии определенных видов бактерий, представляющих опасность для здоровья человека.

*Таблица 3*

#### Микробиологическая чистота лекарственных препаратов

Категория	Препараты	Рекомендуемые требования
1	2	3
1	Препараты, к которым предъявляется требование «стерильность»	Препараты должны быть стерильными
2	Для применения местно, наружно, интравагинально.	Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) не более $10^2$

	<p>Для введения в полости уха, носа Респираторно. Трансдермальные пластыри.</p> <p>За исключением тех лекарственных препаратов, которые должны быть стерильными</p>	<p>в 1 г или в 1 мл, или на 1 пластырь (включая клейкую сторону и основу). Отсутствие энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий на 1 пластырь (включая клейкую сторону и основу). Не более 10 энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий в 1 г или в 1 мл остальных препаратов. Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г или в 1 мл, или на 1 пластырь (включая клейкую сторону и основу). Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл, или на 1 пластырь (включая клейкую сторону и основу)</p>
3	<p>А. Для приема внутрь или введения ректально</p>	<p>Общее число аэробных бактерий не более <math>10^3</math> в 1 г или в 1 мл. Общее число грибов не более <math>10^2</math> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл</p>
	<p>Б. Для приема внутрь – из сырья природного происхождения (животного, растительного или минерального), уровень микробной загрязненности которого невозможно снизить в процессе предварительной обработки.</p>	<p>Общее число аэробных бактерий не более <math>10^4</math> в 1 г или в 1 мл. Общее число грибов не более <math>10^2</math> в 1 г или в 1 мл. Энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий не более <math>10^2</math> в 1 г или в 1 мл Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г или в 10 мл. Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл</p>
4	<p>Лекарственные растительные средства, состоящие из одного вида сырья (фасованная продукция) или нескольких (сборы), а также растительное сырье «ангро»</p>	<p>Общее число аэробных бактерий не более <math>10^7</math> в 1 г. Общее число грибов не более <math>10^5</math> в 1 г. <i>Escherichia coli</i> не более <math>10^2</math> в 1 г.</p>



А. Лекарственные растительные средства или лекарственное сырье «ангро», применяемые в виде настоев и отваров, приготовленные с использованием кипящей воды	Общее число аэробных бактерий не более $10^5$ в 1 г. Общее число грибов не более $10^4$ в 1 г
Б. Лекарственные растительные средства или растительное сырье «ангро», приготовленные без использования кипящей воды	Энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий не более $10^3$ в 1 г. Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г. Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г

Таблица 4

**Микробиологическая чистота субстанций и вспомогательных веществ для производства лекарственных препаратов**

Категория	Субстанции, вспомогательные вещества	Рекомендуемые нормы
1	2	3
1.	Субстанции для производства: А. Стерильных лекарственных препаратов, которые не подвергаются стерилизации	Субстанции должны быть стерильными
	Б. Стерильных лекарственных препаратов, которые подвергаются стерилизации	Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) не более $10^2$ в 1 г или в 1 мл. Отсутствие энтеробактерий в 1 г или в 1 мл
	В. Нестерильных лекарственных препаратов	Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл
2.	Субстанции синтетического происхождения для производства нестерильных лекарственных препаратов	Общее число аэробных бактерий не более $10^3$ в 1 г или в 1 мл. Общее число грибов не более $10^2$ в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл

3.	Субстанции природного происхождения (растительного, животного или минерального) для производства нестерильных лекарственных препаратов	Общее число аэробных бактерий не более 10 <sup>4</sup> в 1 г или в 1 мл. Общее число грибов не более 10 <sup>2</sup> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г или в 10 мл. Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл. Энтеробактерий не более 10 <sup>2</sup> в 1 г или в 1 мл
4.	Вспомогательные вещества (мука пшеничная, крахмал, тальк и т.д.)	Общее число аэробных бактерий не более 10 <sup>3</sup> в 1 г или в 1 мл. Общее число грибов не более 10 <sup>2</sup> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г или в 10 мл. Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл. Других энтеробактерий не более 10 <sup>2</sup> в 1 г или в 1 мл

*Примечания к таблице. 3 и 4.*

1. В зависимости от состава лекарственного средства и особенностей технологического процесса в нормативных документах в порядке исключения могут быть указаны иные технические условия.

2. В нормативных документах на детские лекарства ввести более строгие нормы, а именно: количество аэробных бактерий в 1г или 1мл - 100 на 500, количество грибов - 10 на 50, а также отсутствие бактерий *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

3. При обнаружении в процессе испытаний болезнетворных бактерий, отличных от вышеперечисленных, качество лекарственных средств, субстанций и вспомогательных веществ считается не соответствующим требованиям «микробиологической чистоты».

### **3.2.1. Испытание на стерильность**

Лекарства, глазные капли, мази, пленки и другие препараты и вещества, указанные в документации для инъекций и инфузий должны быть

стерильными. Методы контроля стерильности применяются для испытания всех лекарственных средств, независимо от их природы и лекарственной формы.

Тестирование на стерильность проводится в стерильных условиях, чтобы избежать микробного загрязнения во время инокуляции, например, с использованием ламинарного бокса класса А или изолятора, расположенного в зоне класса В. Могут быть использованы другие меры для предотвращения контаминации, если они не оказывают неблагоприятного воздействия на микроорганизмы, которые могут присутствовать в образце.

### ***Определение антимикробного действия***

Перед проведением теста на стерильность следует определить, обладает ли испытуемый образец антимикробной активностью, которая может существенно повлиять на результаты теста. Для этого готовят суспензии культур тест-микроорганизмов (табл. 5) с конечной концентрацией не более 100 КОЕ/мл. Тест проводят дважды с каждым микроорганизмом отдельно. В пробирки с 10 мл рекомендованной для тестирования питательной среды вносят по 1 мл приготовленной суспензии тест-микроорганизма. В две пробирки с засеянной средой вносят по 1 мл испытуемого образца, в две другие - по 1 мл соответствующего растворителя - положительный контроль. Посевы на тиогликолевой среде инкубируют при  $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  в течение 3 суток. Посевы на жидкой соево-казеиновой среде и среде Сабуро инкубируют при  $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  в течение 5 суток. Визуально контролируйте рост тест-микроорганизмов в контрольных и опытных посевах. Если результаты не совпадают, т.е. при контроле наблюдают рост испытуемого микроорганизма и в эксперименте роста не происходит, предполагается, что испытуемый образец обладает бактериостатическим или фунгистатическим действием.

При наличии антимикробного действия исследуемого образца применяют специфические инактиваторы, указанные в нормативных документах. Например, парааминобензойная кислота для сульфаниламидов, бета-лактамаза для пенициллинов и цефалоспоринов. Неспецифические инактиваторы (твин-20, твин-80, яичный лецитин, гидрохлорид гистидина, тиосульфат натрия и др.) добавляют в буферные и/или питательные среды, как правило, перед стерилизацией.

*Таблица 5*

### **Тест-микроорганизмы для определения ростовых свойств питательных сред и определения антимикробного действия**

Питательные среды	Тест-микроорганизмы	
	вид	штамм

Жидкая тиогликолевая среда	Аэробные бактерии: <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 6633 ATCC 6538-P ATCC 9027
Жидкая соево-казеиновая среда	Грибы: <i>Candida albicans</i>	NCTC 885-653
Жидкая среда Сабуро	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 9642

Примечание:

ATCC – Американская коллекция типовых культур, США.

NCTC – Национальная коллекция типовых культур.

Для разведения исследуемого образца перед испытанием на стерильность можно использовать нейтрализующую жидкость промышленного производства или приготовленную в лаборатории, следующего состава:

- Полисорбата-80 (твина-80) – 30,0 г.
- Лецитина яичного (или соевого) – 3,0 г.
- L-гистидина гидрохлорида – 1,0 г.
- Пептона (мясного или казеинового) – 1,0 г.
- Натрия хлорида – 4,3 г.
- Калия фосфата однозамещенного – 3,6 г.
- Натрия фосфата двузамещенного – 7,2 г.
- Воды – 1000 мл.

Стерилизуют в автоклаве, рН после стерилизации  $7,0 \pm 0,2$ .

Если разведение в вышеприведенном растворе не устраняет антимикробное действие исследуемого образца, то увеличивают концентрацию твина-80 или лецитина. Альтернативно допускается добавление в буферный раствор специфических инактиваторов, устраняющих антимикробное действие лекарственных средств или консервантов (табл. 6).

Таблица 6

#### Инактиваторы антимикробного действия консервантов

Тип консерванта	Инактиватор	Концентрация в растворителе
Фенолы	Натрия лаурилсульфат Твин-80 и лецитин Яичный желток	4 г/л 30 г/л и 3 г/л 5–50 мл/л
Органо-ртутные соединения	Натрия тиогликолят	0,5–5 г/л
Галогены	Натрия тиосульфат	5 г/л

Четвертичные соединения аммония	Яичный желток	5–50 мл/л
---------------------------------	---------------	-----------

При отсутствии инактиватора исследуемый образец разводят, изменяя соотношение объемов посевного материала и питательной среды, или используют метод мембранной фильтрации.

### ***Испытание на стерильность***

Для испытания используют жидкую тиогликолевую среду, жидкую соево-казеиновую среду или жидкую среду Сабуро. Жидкую тиогликолевую среду применяют для выявления аэробных и анаэробных бактерий. Жидкую соево-казеиновую среду или жидкую среду Сабуро применяют для выявления грибов.

Для испытания отбирают образцы лекарственного средства в количестве, указанном в табл. 7, если нет других указаний в частной фармакопейной статье.

*Таблица 7*

### **Количество единиц (ампул, флаконов и др.) от серии исследуемого образца для проведения анализа**

Количество единиц в серии	Количество единиц для проведения анализа (не менее)
1	2
Парентеральные лекарственные средства: Не более 100 От 100 до 500 Более 500 Парентеральные лекарственные средства большого объема Антибиотики, твердые формы, «ангро» (более 5 г)	10 % или 4 (берут наибольшее) 10 2 % или 20 (берут наименьшее) 2 % или 10 (берут наименьшее) 6
Неинъекционные лекарственные средства (в том числе глазные): Не более 200 Более 200 Препараты в однодозовой упаковке	5 % или 2 (берут наибольшее) 10 См. графу «Парентеральные лекарственные средства»

Твердые формы, «ангро»: Не более 4 упаковок Свыше 4, но не более 50 Свыше 50	Каждую 20 % или 4 (берут наибольшее) 2 % или 10 (берут наибольшее)
---	--

При вскрытии образцов не допускают их контаминации микроорганизмами, которые могут находиться на его внешней поверхности. Ампулы и пробки флаконов протирают спиртом этиловым ректифицированным 96 % и фламбируют. Для посева на каждую питательную среду используют количество исследуемого образца, приведенное в табл. 8, если нет других указаний в частной фармакопейной статье.

*Таблица 8*

**Минимальное количество образца для посева на питательные среды**

Количество лекарственного средства в упаковке	Количество образца для посева
Жидкие: Менее 1 мл 1–40 мл 40–100 мл  более 100 мл Антибиотики Другие препараты, растворимые в воде или изопропилмиристите	Весь объем 1/2 г содержимого, но не менее 1 мл 20 мл 10 % содержимого, но не более 20 мл 1 мл Содержимое упаковки, но не менее 0,2 г
Нерастворимые препараты, мази и кремы, поддающиеся эмульгированию или суспендированию	Содержимое упаковки, не менее 0,2 г
Твердые: Менее 0,05 г 0,05–0,3 г 0,3–5 г Более 5 г	Все содержимое 1/2 г содержимого, но не более 0,05 г 0,150 г 0,500 г

**1. Метод мембранной фильтрации**

Метод мембранной фильтрации применяют для определения стерильности препаратов, обладающих выраженным противомикробным действием и препаратов в емкостях объемом более 100 мл. Исключение

составляют препараты с антимикробной активностью, нерастворимые в воде или изопропилмиристате.

Тест проводится с использованием блока фильтров, который должен быть установлен таким образом, чтобы тестируемый раствор можно было вводить и фильтровать в асептических условиях. Испытания проводят под вакуумом 93,3 кПа (70 см.рт.ст.) при расходе воды 55-75 мл в минуту. Допускается использование оборудования, представляющего собой стерильную закрытую систему и также работающего по принципу фильтрации растворов, при этом мембрана хранится в контейнере, в который после фильтрации добавляется стерильная среда. Используются мембранные фильтры с размером пор  $0,45 \pm 0,02$  мкм и внешним диаметром 47 мм. Фильтры из нитрата целлюлозы применяют для водных, маслянистых и слабых спиртовых растворов, фильтры из ацетата целлюлозы — для концентрированных растворов спиртов и т.д. Гидрофобный край фильтра и низкая сорбционная способность минимизируют потери препарата при фильтрации. Для препаратов, не обладающих бактериостатическим или фунгистатическим действием, могут применяться фильтры без гидрофобной кромки, которые перед фильтрованием увлажняют.

Оборудование и фильтры стерилизуются и хранятся в условиях, обеспечивающих стерильность.

При исследовании ЛС в виде раствора в масле фильтр и установка перед анализом должны быть тщательно высушены.

### ***Базовые приготовления***

Жидкий лекарственный препарат в упаковке перемешивают, отбирают необходимое для исследования количество испытуемой пробы (табл. 8) и асептически переносят на один или несколько фильтров. Мембранная фильтрация осуществляется под вакуумом или под давлением.

Если испытуемый образец обладает противомикробным действием или содержит консервант, то используют изотонический 0,9% раствор натрия хлорида или жидкость № 1. 1 (1 г ферментативного пептона растворяют в 1000 мл воды, фильтруют или центрифугируют до прозрачности, разливают в емкости и стерилизуют, рН после стерилизации - 7,1). Испытание проводят, исключая контаминацию микроорганизмами последней порции жидкости для промывания.

Асептически добавляют достаточное количество подходящего растворителя ко всей пробе перед помещением вязких жидкостей или суспензий на фильтр, чтобы увеличить скорость фильтрации.

Если в составе испытуемого образца входят лецитин, масло или консервант и при наличии антимикробного эффекта, то для промывания фильтров используют жидкость № 2 (к 1000 мл жидкости №1 добавляют 1

мл твина-80, разливают по емкостям и стерилизуют, рН после стерилизации 7,1).

Мазь на жировой основе и эмульсию вода-в-масле растворяют в предварительно стерилизованном изопропилмиристе (ИПМ) методом мембранной фильтрации с использованием мембран с диаметром пор 0,22 мкм. Стерильный растворитель и, при необходимости, испытуемый образец нагревают до температуры не выше 44°C непосредственно перед фильтрованием. Сначала через мембрану пропускают стерильный 5 мл ИПМ. Затем раствор лекарственного средства фильтруют в ИПМ. Для максимальной эффективности процесса над фильтром на протяжении всей фильтрации должен находиться слой раствора. После фильтрации мембрану сначала промывают двумя порциями жидкости № 1. 2, каждый по 200 мл, а затем по 100 мл жидкости № 2. 1. При проведении испытаний в питательную среду вносят Твин-80 из расчета 1 г/л.

Если препарат содержит вазелин, для промывки фильтров используют жидкость № 3 (5 г ферментативного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твин-80 растворяют в 1000 мл воды, разливают в емкости и стерилизуют, рН после стерилизации 6, 9). Перед фильтрованием 200 мл жидкости нет. Для максимальной эффективности процесса над фильтром на протяжении всей фильтрации должен находиться слой раствора. После фильтрации пробы фильтр промывают тремя порциями жидкости №1. 3 по 100 мл.

Если препарат выпускается в шприц-тюбиках, то содержимое каждого шприц-тюбика переносят в две воронки блока мембранных фильтров или всю пробу отбирают в стерильную пробирку для последующего переноса на фильтр.

Из твердых лекарственных форм (кроме антибиотиков) готовят разведения в соответствии с инструкцией по применению.

Содержимое стерильных аэрозольных составов асептически удаляют и помещают в стерильную колбу, сжимая шток распылительного клапана. По возможности пропелент удаляют испарением. Добавьте жидкость № 2 в колбу и осторожно перемешивают.

**Валидация** (процедура, обеспечивающая высокую степень уверенности в том, что метод будет стабильно давать результаты, отвечающие заранее установленным критериям приемлемости) метода мембранной фильтрации при контроле лекарственных средств, обладающих антимикробным действием.



### *Ход исследования*

Фильтры после фильтрации асептически снимают с фильтродержателя и помещают в жидкую тиогликолевую среду, жидкую соево-казеиновую среду или жидкую среду Сабуро. При использовании замкнутой системы канистры заполняют равным объемом сред.

При этом следует избегать аэрации тиогликолевой среды. Посевы инкубируют не менее 14 суток при температуре  $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  на жидкой тиогликолевой среде и при температуре  $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  на жидкой соево-казеиновой среде или жидкой среде Сабуро (независимо от метода посева), периодически просматривая питательные среды.

Наличие роста микроорганизмов определяют визуально.

## **2. Метод прямого посева**

### *Подготовка проб*

Определенный объем (табл. 8) нефилтующейся жидкости отбирают в асептических условиях и проводят посев на питательные среды.

Для исследования образцов ЛС, представляющих собой растворы в маслах, в питательную среду предварительно добавляют 10 г/л твина-80 или другого эмульгатора в концентрации, не оказывающей антимикробного действия в условиях испытания.

Для исследования мазей и кремов отбирают 20 образцов и разделяют их на 2 группы по 10 в каждой. Исследуемые образцы эмульгируют в разведении 1:10 с помощью подходящего эмульгатора в соответствующем стерильном растворителе, например, жидкости №1. Полученную эмульсию вносят в питательную среду, не содержащую эмульгатора.

Если исследуемый образец обладает антимикробным действием в условиях испытания, его устраняют путем добавления подходящих инактиваторов (например, твина-80, количество которого указывают в частной фармакопейной статье) или увеличивают количество питательной среды. Посевы образцов растворов в маслах ежедневно аккуратно перемешивают. Однако в том случае, когда тиогликолевая или аналогичная ей среда применяется для выявления анаэробных микроорганизмов, встряхивание или перемешивание должно быть сведено к минимуму для того, чтобы не нарушать анаэробных условий.

Если в состав лекарственного средства входят трудноэмульгируемые жиродержащие продукты, допускается использование определенного эмульгатора соответствующей концентрации в стерильном растворителе с

одновременным нагреванием образца до 40°C (в исключительных случаях – до 45°C) в течение не более 30 мин.

Твердые лекарственные формы в виде порошка или суспензии (если в сосуд добавляют стерильный растворитель) переносят в количестве, указанном в табл. 8, в жидкую тиогликолевую среду, жидкую соево-казеиновую среду или жидкую среду Сабуро и осторожно перемешивают.

### ***Ход исследования***

Посевы инкубируют не менее 14 суток при температуре:

- 32,5 ± 2,5°C на жидкой тиогликолевой среде и при температуре;
- 22,5 ± 2,5°C на жидкой соево-казеиновой среде или жидкой среде Сабуро (независимо от метода посева), периодически просматривая питательные среды.

Наличие роста микроорганизмов определяют визуально. Если исследуемый образец вызывает помутнение питательной среды и визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов, через 14 суток после начала испытания переносят не менее 1 мл помутневшей среды в пробирки с той же стерильной средой. Инкубируют исходные и повторные посевы. Общее время инкубации должно составлять не менее 14 суток, но не более 18 суток от начала испытания.

### **3. Интерпретация результатов при проведении испытаний на стерильность**

При отсутствии роста микроорганизмов считают, что исследуемый образец соответствует требованиям испытания. При наличии роста микроорганизмов, наблюдаемого визуально и подтверждаемого микроскопическим исследованием, считают, что исследуемый образец не соответствует требованиям испытания на стерильность, если не доказана недостоверность испытания, вызванная причинами, не связанными с исследуемым образцом.

Результаты испытания могут быть признаны недостоверными в случае, если выполняется одно или несколько условий:

1. получены неудовлетворительные результаты микробиологического контроля окружающей среды в ходе проведения испытания;
2. выявлены ошибки, допущенные в ходе испытания;
3. обнаружен рост микроорганизмов в отрицательном контроле;
4. после идентификации микроорганизмов, выделенных из исследуемого образца, однозначно признано, что причиной возникновения роста этого вида или видов являются материалы и/или технические приемы, использованные при испытании;

5. если питательная среда нестерильна и/или ее ростовые свойства неудовлетворительны.

Если результаты испытания признаны недостоверными, его повторяют на том же количестве образцов, что и первоначально. Если в результате повторного испытания не обнаруживают роста микроорганизмов, считают, что препарат выдерживает испытание на стерильность. Если в результате повторного испытания обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат не выдерживает испытание на стерильность.

### **3.2.2. Определение микробиологической чистоты**

Испытание на микробиологическую чистоту включает:

- подготовку образцов различных лекарственных форм перед испытанием;
- отбор образцов для анализа;
- количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов;
- выявление и идентификацию отдельных видов бактерий, наличие которых недопустимо или ограничено в нестерильных лекарственных средствах.

Испытание проводят в асептических условиях, чтобы предотвратить контаминацию исследуемых образцов.

#### ***Определение антимикробного действия лекарственного средства***

Перед проведением контроля необходимо определить, обладает ли исследуемое лекарственное средство в условиях испытания на микробиологическую чистоту антимикробным действием, подавляющим рост отдельных видов бактерий и грибов, так как это может привести к неправильной оценке результатов анализа.

Для определения антимикробного действия используют тест-микроорганизмы:

- *Bacillus subtilis* ATCC 6633,
- *Bacillus cereus* ATCC 10702,
- *Escherichia coli* ATCC 25922,
- *Salmonella abony* IHE 103/39,
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P,
- *Candida albicans* NCTC 885-653,
- *Candida albicans* ATCC 10231,
- *Aspergillus niger* ATCC 9642.

Испытание на наличие антимикробного действия проводят одним из описанных ниже методов. Готовят необходимые разведения

лекарственного средства (1:10, 1:50, 1:100, 1:500 и 1:1000) методом последовательных разведений, используя фосфатный буферный раствор с хлоридом натрия и пептоном рН 7,0.

### **1. Метод определения антимикробного действия в условиях испытания на микробиологическую чистоту**

Каждое разведение препарата в количестве 1 мл вносят в шесть чашек Петри диаметром 90 мм, в две из которых добавляют по 0,2 мл взвеси спор *B. subtilis*, в две другие – по 0,2 мл взвеси культуры *C. albicans*, в две последние – 0,2 мл взвеси конидий *A. niger*. Чашки с бактериями заливают 10–15 мл расплавленного и охлажденного до  $47,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  питательного агара, чашки с культурами грибов – тем же количеством среды Сабуро. По 1,0 мл каждого разведения препарата вносят в пробирки с 10 мл жидких сред № 3 и 8 (или аналогичных), куда затем добавляют по 1 мл взвеси *E. coli*, *Salmonella abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* соответственно средам, каждый микроорганизм отдельно. В контрольные чашки и пробирки вместо разведений препарата вносят такое же количество растворителя. Опыт ставят в двойной повторности. Посевы на средах №1, 3, 8 инкубируют при температуре  $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  в течение 48 ч (среды №3, 8) и 5 суток (среда №1). Посевы на среде №2 инкубируют при температуре  $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  в течение 5-ти суток.

После окончания сроков инкубации отмечают появление типичного роста тест-микроорганизмов в контрольных чашках и пробирках без препарата и наличие или отсутствие роста тест-штаммов на средах с различными разведениями препарата. В случае помутнения или изменения окраски среды, затрудняющих учет результатов, делают пересевы на агаризованные среды. При росте типичных колоний *E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* отмечают отсутствие антимикробного действия исследуемого препарата.

### **2. Метод копирования**

Для водонерастворимых (суспензии, эмульсии и др.) или окрашенных соединений лучше всего использовать метод репликации.

Добавьте по 1 мл каждого разведенного тестируемого препарата в стерильную чашку Петри. Добавьте 1 мл разбавителя, использованного для получения разбавления, в контрольную чашку. В опытах и контролях в чашку Петри вносят 10–15 мл соево-казеинового агара или среды 1, размороженных и охлажденных до  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , в остальные чашки добавляют равное количество среды Сабуро и тщательно перемешивают. Опыт настроен на двойной повтор.

После застывания агара чашки подсушивают для удаления конденсата с поверхности среды и наносят суспензии каждого тестируемого бактериального и грибкового штамма в виде бляшек на среды 1 и 2 (или аналогичные) с помощью бактериального кольца, пипетки или репликатора. Чашки с соево-казеиновым агаром или средой № 1 инкубировали при  $32,5 \pm 2,5$  °С в течение 48 ч. Чашки со средой Сабуро инкубировали при  $22,5 \pm 2,5$  °С не более 5 суток.

### ***Учет и интерпретация результатов***

Такой же рост тестируемого микроорганизма, как и в контроле, обозначается знаком «+», отсутствие роста обозначается знаком «-», а слабый, медленный или заторможенный рост обозначается знаком «+/-». Заключение о наличии антимикробного агента делали, если наблюдали достоверное снижение количества колоний на чашке (более 70%) или отсутствие роста тест-микроорганизма по сравнению с контролем на среде, содержащей препарат.

Первое серийное разведение препарата без антимикробного действия использовали для посева на соответствующую питательную среду.

### ***Методы устранения антибактериального действия лекарственных средств***

Для устранения антибактериального действия препарата используют соответствующий специфический (например, парааминобензойную кислоту и бета-лактамазу) или неспецифический (твин-20, твин-80, соевый или яичный лецитин и др.) инактиватор, увеличивают разведение препарата, использовать больший объем растворителя в пределах допустимого диапазона микробной обсемененности; если позволяет природа исследуемого препарата, применить метод мембранной фильтрации с последующей очисткой фильтра, т. е. препарат растворим в воде или изопропилмиристате.

Такие тесты не проводят, если мембранная фильтрация не может быть использована из-за нерастворимости препарата в воде или изопропилмиристате, а все вышеперечисленные способы устранения его антибактериального действия в отношении конкретного исследуемого микроорганизма малоэффективны.

### ***Особенности отбора проб и подготовки к анализу***

Из каждой партии исследуемого лекарственного препарата независимо от объема отбирают для анализа достаточное количество различных упаковок лекарственного препарата (не менее 3-5).

При анализе твердых лекарственных форм берут пробу 10 г для определения общего количества бактерий и грибов в 1 г лекарственного препарата на наличие синегнойной палочки, золотистого стафилококка и кишечной палочки; пробу 10 г - на наличие сальмонелл.

При исследовании таблеток, драже, гранул и других твердых лекарственных средств образец массой 10 г растолочь (при необходимости) в стерильной фарфоровой ступке или на специальном оборудовании, затем перенести в 100 мл буферного раствора. Провести количественное и качественное определение микроорганизмов.

При исследовании капсул 10 г образца переносят в 100 мл буферного раствора, содержащего не более 5 % твина-80, и нагревают до температуры не выше 40°C. После суспендирования капсул в буферном растворе проводили количественное и качественное определение микроорганизмов.

При анализе мягких лекарственных форм используют 10 г препарата для определения общего количества бактерий и грибов, выявляют наличие синегнойной палочки, золотистого стафилококка, кишечной палочки в 1 г препарата, 10 г препарата.

При исследовании мазей, кремов, суппозиториев, легко смешивающихся с водой, навеску массой 10 г помещают в стерильную колбу, содержащую 100 мл буферного раствора и стеклянные шарики диаметром 5-6 мм. Смесь нагревали до температуры не выше 40°C на водяной бане и интенсивно встряхивали до получения однородной эмульсии для количественного и качественного определения микроорганизмов.

Если мягкую лекарственную форму трудно смешать с водой, смешайте образец 10 г со стерильным твином-80 в количестве, которое не должно превышать 1/2 объема образца (5 г в данном примере). Смесь нагревают на водяной бане или термостате до температуры не выше 40°C (в особых случаях - до 45°C) и осторожно перемешивают. При этом время нагрева не должно превышать 30 минут. Добавьте необходимое количество стерильного фосфатно-буферного раствора, предварительно подогретого до соответствующей температуры, и стеклянные шарики диаметром 5-6 мм. Смесь осторожно перемешивали до получения гомогенной эмульсии в разведении 1:10 для количественного и качественного определения микроорганизмов.

При необходимости подготовьте последующие десятикратные разведения, используя фосфатно-солевой буфер, содержащий соответствующую концентрацию стерильного Твин-80.

При анализе жидких лекарственных форм используют образец объемом 10 мл для определения общего количества бактерий и грибов в препарате объемом 1 мл на наличие синегнойной палочки, золотистого стафилококка и кишечной палочки, а образец объемом 10 мл - на наличие кишечной палочки и других энтеробактерий. Количественные и качественные анализы, 10 мл - для определения сальмонелл.

При исследовании растворов, суспензий, сиропов, лекарственных препаратов перенесите 10 мл пробы в 90 мл буферного раствора для количественного и качественного определения смеси и микроорганизмов.

При исследовании масляных растворов, эмульсий 10 мл пробы помещают в стерильную колбу, содержащую 90 мл буферного раствора с содержанием твина-80 не более 5 % и стеклянными шариками диаметром 5–6 мм. Смесь нагревали до температуры не выше 40°C на водяной бане и интенсивно встряхивали до получения однородной эмульсии для количественного и качественного определения микроорганизмов.

При аэрозольном анализе брали пробу 3 г для определения общего количества аэробных бактерий и грибов в 1 г препарата, для выявления наличия синегнойной палочки и золотистого стафилококка и пробу 3 г для проверки наличия энтеробактерий. Отберите пробу, многократно нажимая на шток клапана (сопло).

При исследовании аэрозолей на спиртовой основе 3 г образца (после испарения пропеллента) переносят в 30 мл буферного раствора для перемешивания и количественного и качественного определения микроорганизмов.

Если исследуются аэрозоли на масляной основе, перенесите образец массой 3 г (после испарения пропеллента) в 30 мл, содержащих не более 5% твина-80, и диаметром 5–6 мм. Смесь нагревали до температуры не выше 40°C на водяной бане и интенсивно встряхивали до получения однородной эмульсии для количественного и качественного определения микроорганизмов.

При исследовании аэрозолей на твердой основе перенесите 3 г образца (после испарения пропеллента) в 30 мл буферного раствора для перемешивания и количественного и качественного определения микроорганизмов.

При выборе трансдермального пластыря используйте образец, состоящий из 20 единиц. Снимите защитную пленку с каждого из 10 пластырей с помощью стерильных инструментов. При необходимости пластырь разрезать на более мелкие кусочки стерильными ножницами, перенести

их в колбу вместимостью 1000 мл, содержащую 500 мл стерильного буферного раствора и стеклянные шарики диаметром 5-6 мм, подогреть на водяной бане до температуры не более 40 °С с энергичным встряхиванием в течение 30 минут. 50 мл полученного смыва использовали для количественного определения микроорганизмов методом мембранной фильтрации и выделения синегнойной палочки, золотистого стафилококка.

Для выделения и количественного определения Enterobacteriaceae использовали следующие 10 пластырей, которые добавляли к лактозному бульону (номер среды 11).

Если известно, что пластырь обладает антимикробной активностью, к разбавителю добавляют подходящий инактивирующий агент (твин-80 и/или лецитин). Если лосьон трансдермального пластыря нерастворим и невозможно использовать мембранную фильтрацию, применяют метод прямого посева.

### ***Методы количественного определения аэробных бактерий и грибов***

Представленный метод направлен на количественное определение мезофильных бактерий и грибов, растущих в аэробных условиях.

В зависимости от природы препарата и его физико-химических свойств используют метод агаровых чашек (глубокий, двухслойный, поверхностный, модифицированный по глубине), мембранную фильтрацию или один из вариантов пробирочного метода наиболее вероятного числа.

#### **1. Метод чашек с агаром**

Для культивирования микроорганизмов используют агаризованные среды: соево-казеиновый агар или Среда № 1, сухая, для контроля микробной обсемененности - для культивирования бактерий, агар Сабуро или Среда № 2, сухая, для контроля микробной обсемененности - для посева грибов. Выращивайте инокулят на среде для выращивания бактерий при температуре  $32,5 \pm 2,5$  °С, а инокулят на среде для грибов — при  $22,5 \pm 2,5$  °С. Для каждого разведения образца используйте не менее двух чашек Петри с определенной средой. После оттаивания среду охлаждают до температуры  $45 \pm 5$  °С и добавляют необходимое количество в чашку Петри.

#### **Глубокий метод**



Внесите 1 мл подготовленного для анализа образца в стерильную чашку Петри диаметром 90 мм. Добавьте 15–20 мл агаровой среды и быстро перемешайте. Чем больше диаметр чашки Петри, тем больше количество среды. После застывания агара чашку переворачивают и инкубируют посевной материал.

#### **Двухуровневый метод**

Добавьте 15–20 мл агаровой среды в каждую стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и дайте затвердеть. Чем больше диаметр чашки Петри, тем больше количество среды. Внести 1 мл образца для анализа в пробирку, содержащую 4 мл соответствующей размороженной и охлажденной питательной среды, быстро перемешать содержимое пробирки и перенести на лиофилизированную агаровую поверхность. В чашке Петри верхний слой среды равномерно распределяют вращательными движениями. После отверждения чашки переворачивали и помещали в термостат для инкубации.

#### **Поверхностный метод**

Размороженную и охлажденную питательную среду по 15-20 мл вносят в каждую стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и дают застыть. Чем больше диаметр чашки Петри, тем больше количество среды. Высушите поверхность пластины с агаром. Добавляют в агар 0,1 мл анализируемой пробы и равномерно распределяют шпателем по поверхности среды. Переверните планшет и поместите в термостат для инкубации.

#### **Модифицированный глубинный метод**

Внесите 1 мл подготовленного для анализа образца в стерильную чашку Петри диаметром 90 мм. Добавьте 7–10 мл размороженной и охлажденной среды и быстро перемешайте вращательными движениями. После застывания агара чашку переворачивают и инкубируют. Результаты регистрировали через 48-72 часа.

#### **Подсчет результатов посевов чашечным методом**

Подсчитайте колонии через 48-72 часа (предварительные результаты) и через 5 дней. (конечный результат).

Для получения надежных результатов выберите чашки с количеством колоний бактерий от 30 до 300 и колоний грибов от 10 до 100. Если учитываются результаты двух последующих разведений, количество колоний на чашке находится в пределах указанного выше диапазона, и результат вычисляется по меньшему разведению.

Если в среднем на чашке растет более 300 колоний бактерий или более 100 колоний грибов, выберите соответствующий инокулят, сделав несколько последовательных разведений образца.

Если средний рост на чашке был менее 30 колоний бактерий и менее 10 колоний грибов, количественное содержание бактерий и грибов рассчитывали на основании имеющихся результатов.

При отсутствии микробного роста на питательной среде результаты следующие: При посеве препарата в разведении 1:10 - «1 г (или 1 мл) лекарственного средства содержит менее 10 бактерий (или грибов)», при посеве ЛС в разведении 1:100 – «В 1 г. (или в 1 мл) ЛС содержится менее 100 бактерии (или грибов)» и т.п.

### **Интерпретация результатов**

При необходимости общее количество (бактерий и грибов) в 1 г или 1 мл препарата относится к количеству аэробных бактерий по сравнению с количеством грибов.

## **2. Метод мембранной фильтрации**

Мембранная фильтрация используется для определения количества микроорганизмов в лекарственных средствах, обладающих или не обладающих антимикробным действием.

Нитроцеллюлозные фильтры применяются для водных, масляных и разбавленных спиртовых растворов (менее 30%), из ацетата целлюлозы - для спиртовых растворов (более 30%), кислот, щелочей. Мембранную фильтрацию проводят в стерильных условиях с использованием вакуума.

Образцы обычно растворяют в буферном растворе в соотношении 1:10 или антибактериальные инактиваторы.

Трансдермальные пластыри для полоскания пропускают через каждый мембранный фильтр объемом 50 мл (эквивалентно одному пластырю), который проходит через мембранный фильтр.

В зависимости от характера фильтрации процесс переноса мембраны зависит от времени заливки питательной среды в чашку Петри.

### **Учет результатов**

Подсчитайте инфицированные колонии на одном пластыре через 48-72 часа (предварительные результаты) и через 5 дней (окончательные результаты).

Чтобы определить, полностью ли отмылась мембрана от препарата, отфильтрованного с противомикробными частицами, после фильтрации в следующую секцию промывки выделили 1 мл суспензии *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *Candida albicans* ATCC 885-653 в 1 мл. До 100 колониеобразующих единиц.

### ***Жидкость для очистки фильтра:***

Изотонический раствор натрия хлорида 0,9% стерильный рН 7,0.

Раствор № 1: 1 г мясного пептона растворяют в 1000 мл воды, фильтруют или центрифугируют для осветления, разливают по бутылкам и стерилизуют. рН после стерилизации -  $7,0 \pm 0,2$ .

К 1000 мл жидкости №1 добавить 2 мл жидкости Твин-80, перелить во флакон и простерилизовать. рН после стерилизации  $-6,9 \pm 0,2$ . Если препарат содержит масло, используйте жидкость.

Жидкость №3: Растворите 5 грамм мясного пептона, 3 грамма мясного экстракта и 10 грамм Твин 80 в 1000 мл воды. Разлить по флаконам и простерилизовать. рН после стерилизации -  $6,9 \pm 0,2$ .

### **3. Метод наиболее вероятного числа**

Готовят тестовые образцы в виде растворов, суспензий или эмульсий в разведении 1:10, 1:100, 1:1000 с использованием соответствующих растворителей. Разлить жидкую питательную среду в 12 стерильных пробирок по 9 мл. Пробирки располагают на штативе в четыре ряда по три пробирки.

В первый ряд пробирок внесите 1 мл испытуемого образца в разведении 1:10, во второй ряд – 1 мл в разведении 1:100, в третий ряд – по 1 мл в разведении 1:1000. Добавьте 1 мл разбавителя в четвертый ряд пробирок, чтобы растворить, суспендировать или эмульгировать образец. Посевы инкубируют не более 5 дней.

#### **Учет результатов**

Обратите внимание на количество пробирок в первом, втором и третьем рядах, где можно визуально наблюдать микробный рост. Среда (контрольный разбавитель) в четвертом ряду пробирок должна оставаться стерильной. Полученное трехзначное число соответствует наиболее вероятному количеству жизнеспособных микроорганизмов в 1,0 г или 1,0 мл лекарственного препарата, приведенному в табл. 9.

**Наиболее вероятное число микроорганизмов**

Количество проросших пробирок в каждом ряду			Наиболее вероятное число микроорганизмов в 1 г
Количество препарата в пробирке, мг			
100 мг	10 мг	1 мг	
1	2	3	4
3	3	3	> 1100
3	3	2	1100
3	3	1	460
3	3	0	240
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	93
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	75
3	1	0	43
3	0	3	95
3	0	2	64
3	0	1	39
3	0	0	23

***Выделение бактерий***

Для восстановления жизнеспособности микроорганизмов, поврежденных в ходе техпроцесса, использовали предварительное культивирование образцов в жидкой питательной среде.

Перенесите 10 г или 10 мл испытуемого образца в 100 мл лактозного бульона (номер среды 11), перемешайте и инкубируйте, как правило, 2

часа, но не более 5 часов (эквивалентно 1 г или 1 мл образца) в 100 мл богатой сбражной среды (бульон Мосселя, среда №3). Посевной материал инкубируют в течение 18-48 часов, а когда происходит рост, бактериальные кольца высевают на плотную среду (агар Мосселя, среда № 4) и инкубируют при той же температуре в течение 18-24 часов.

При тестировании чрескожных пластырей на микробную чистоту поместите 10 пластырей в 500 мл лактозного бульона (среда № 11) и осторожно встряхните, чтобы среда не пузырилась, в течение как минимум 15 минут. Пропускают 50 мл промывного раствора через стерильный мембранный нитроцеллюлозный фильтр с размером пор 0,45 мкм, переносят в 100 мл питательной среды (бульон Мосселя, среда № 3) и инкубируют в течение 18-24 часов. Плотная среда (агар Мосселя, среда №4), культивируемая при той же температуре в течение 18-24 часов для выделения энтеробактеров и других грамотрицательных микроорганизмов.

Наличие колоний грамотрицательных палочек на концентрированных средах свидетельствует о контаминации исследуемого образца указанными бактериями.

### ***Количественный анализ***

Для посева используйте три пробирки, каждая из которых содержит 9 мл бульона Мосселя или среды 3. В первую пробирку вносят 1 мл гомогената А (соответствует 0,1 г пробы), хорошо перемешивают и переносят 1 мл (соответствует 0,01 г пробы) во вторую пробирку, снова перемешивают и переносят 1 мл (соответствует 0,001 г пробы) в третью пробирку, меняя пипетку после каждого шага (рис. 2). Культуры выращивали в течение 24-48 часов.

### **Протокол количественного анализа *Enterobacteriaceae***

В случае роста, чтобы подтвердить присутствие *Enterobacteriaceae*, повторно нанесите кольцо на твердую среду (агар Мосселя, среда № 4) и инкубируйте чашку в течение 18-24 часов. Положительный тест на плотной среде, отрицательный тест на эти колонии, которые не росли. Определите наиболее вероятное количество *Enterobacteriaceae* и других грамотрицательных микроорганизмов в образце 1 г или 1 мл по табл. 10

**Определение количества энтеробактерий и других  
грамотрицательных бактерий в образце**

Соответствующее количество испытуемого образца			Наиболее вероятное количество бактерий в 1 г образца
0,1 г	0,01 г	0,001 г	
1мл гомогената 1	1мл гомогената 1 в разведении 1:10	1мл гомогената 1 в разведении 1:100	
+	+	+	Более 10 <sup>3</sup>
+	+	–	От 10 <sup>2</sup> до 10 <sup>3</sup>
+	–	–	От 10 до 10 <sup>2</sup>
–	–	–	Менее 10

Примечание: (+) – положительный тест, (–) – отрицательный тест.

## 2. Обнаружение кишечной палочки

Исследуемые образцы, разбавленные 1:10 стерильным буферным раствором, переносили по 10 мл (эквивалентно 1 г или 1 мл) в 100 мл жидкой питательной среды (соево-казеиновый бульон, среда № 8), перемешивали и перемешивали. Инкубировать в течение 18-48 с. ч. Перенесите 1 мл содержимого флакона в 10 мл бульона МакКонки или среды № 3. Культуры выращивали в течение 18-24 часов.

При наличии роста, при равномерно мутной среде в пробирке, пересечь петлю на плотную среду - агар МакКонки или среду № 4. Инокулят инкубировали в течение 18-48 часов (агар МакКонки) или 18-24 часа. *E. coli* образует красные неслизистые колонии на агаре МакКонки и темно-красные колонии с металлическим блеском на среде № 4 с темно-красным участком вокруг и без слизи. Колонии, подозреваемые в принадлежности к *E. coli*, исследовали под микроскопом на плотных средах. При обнаружении грамотрицательных палочек в мазке одиночные колонии высевают на соево-казеиновый агар, скошенный в пробирки (среда № 1), и инкубируют в течение 18-24 часов.

Для подтверждения использовались биохимические тесты. Из пробирок с чистыми культурами перенесите на агар Симмонса (среда № 14) и соево-казеиновый бульон (среда № 15) и проверьте наличие цитохромоксидазы. Рост или исчезновение бактерий можно наблюдать на агаре Симмонса после 18-24 часов инкубации. Утилизация цитрата зависит от сдвига рН среды в щелочную сторону (изменение цвета среды с зеленого на синий). Наличие индола определяют по появлению красного кольца на поверхности соево-казеинового бульона при добавлении реактива Ковача.

Препарат считается контаминированным кишечной палочкой, если в образце обнаружена грамотрицательная неспорообразующая палочка, не обладающая цитохромоксидазой, не утилизирующая цитрат натрия и образующая индол.

### **Количественное определение кишечной палочки**

Количественное определение *E. coli* проводят так же, как и для других энтеробактерий, путем переноса гомогената А в пробирку, содержащую бульон МакКонки или среду № 3, чтобы подтвердить наличие *E. coli*, повторно засеете петлю на плотную среду (агар МакКонки, среда № 4). Инкубируйте инокулят в течение 18-48 часов (агар МакКонки) или 18-24 часа (среда №4).

Наличие на среде грамотрицательных палочковидных колоний, характерных для кишечной палочки, является положительным тестом, а отсутствие роста этих колоний - отрицательным тестом.

### **3. Идентификация видов бактерий *Salmonella***

Поместите 10 г или 10 мл уникального образца для переноса в 100 мл соево-казеинового бульона или среды № 8 и инкубируйте в течение 18–24 часов. агар; ксилозо-лизин-дезоксихолатный агар; ярко-зеленый, феноловый красный, лактозно-сахарозный агар; висмутсульфитный агар - среда № 5) и инкубируют в течение 24-48 часов. Красные с лактозой и сахарозой - мелкие, блестящие, бесцветные, розовые или молочные колонии, обычно окруженные розовыми или красными участками на висмутсульфитном агаре из мазков грамотрицательных палочек *Salmonella* (среда 5), 2-3 характерные колонии (каждая в отдельности) пересекают на железо-трисахаридный агар (среда 13), нанося объемную культуру петлей сначала на скошенный участок агара, а затем прокалывают колонку, не касаясь дна пробирки. Почернение сред организма при образовании сероводорода - особое свойство сальмонелл. Параллельно требуется проверка на наличие фермента "Цитохромоксидаза" на наличие фермента "Цитохромоксидаза" с использованием скошенного соево-казеинового

агара или чистой культуры. среда №1. Для подтверждения доступны биохимические и серологические исследования поступающих материалов.

Препараты считаются контаминированными бактериями *Salmonella* spp., если в пробе обнаружены грамтрицательные неспорообразующие палочки, не содержащие цитохромоксидазы, не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород.

#### **4. Выявление синегнойной палочки**

Развести испытуемый образец 1:10 глюкозным буфером, пересчитать объем до 10 мл (эквивалентно 1 г или 1 мл) в 100 мл жидкой питательной среды (соево-казеиновый бульон, среда № 8), перемешать и инкубировать в течение 24-48 ч. При наличии роста высевают их по кольцам на селективную питательную среду для выделения *Pseudomonas aeruginosa* (цетримидный агар, цетилпиридиний хлоридный (ЦПХ) агар - среда № 16). Отрицательные палочки высевали на среду № 9 и определяли синезеленый пигмент пиоцианин. Посевы выращивают в течение 24-48 часов.

Для подтверждения наличия признаков проводили биохимические тесты на наличие цитохромоксидазы и способность выделенных культур расти на соево-казеиновом бульоне или среде 8 при температуре  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 18-24 часов.

При тестировании трансдермальных пластырей на микробную чистоту поместите 10 пластырей в 500 мл фосфатно-буферного раствора, слегка встряхните в течение не менее 15 минут и инкубируйте в бульоне или Среде 8 в течение 24–48 часов. Выращивают, пересевают кольцами на селективную среду – цетримидный.

Препарат считали медянкой, если образец содержал грамтрицательные неспорообразующие палочки, формирующие синезеленый пигмент синегнойной палочки, обладающие цитохромоксидазой и растущие при  $42 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### **5. Обнаружение золотистого стафилококка**

Разводят испытуемый образец 1:10 стерильным буферным раствором, переносят 10 мл (эквивалентно 1 г или 1 мл) в 100 мл жидкой питательной среды (соево-казеиновый бульон или среда 8), перемешивают и инкубируют в течение 24-48 ч. В присутствии роста используют циркулирующие субкультуры на селективных питательных средах: агар Фогеля-Джонсона, Берда-Паркера или среду 10 и инкубируют в течение



24-48 часов. Колонии Паркера или золотисто-желтые колонии, окруженные желтыми участками на среде 10, указывают на присутствие *Staphylococcus aureus*.

Для идентификации проводили реакции плазменной агглютинации с использованием чистых культур *Staphylococcus*, скринированных на соево-казеиновом агаре или среде № 1.

При тестировании трансдермальных пластырей на микробную чистоту поместите 10 пластырей в 500 мл фосфатно-буферного раствора и осторожно встряхивайте в течение не менее 15 минут. Пропускают 50 мл промывного раствора через стерильный мембранный нитроцеллюлозный фильтр с размером пор 0,45 мкм, переносят в 100 мл соево-казеинового бульона или среды № 8 и инкубируют 24-48 ч. При наличии роста выполните циклический пересев на агар Фогеля-Джонсона, Берда-Паркера или среду № 10 для выделения *Staphylococcus aureus*.

Если в образце обнаружен грамположительный маннитол *Fermentococcus* (среда Фогеля-Джонсона, среда № 10) с коагулазой, препарат считается контаминированным *Staphylococcus aureus*.

### ***Биохимические тесты для выявления микроорганизмов***

#### **1. Обнаружение присутствия цитохромоксидазы**

*Реагент:* 1% раствор N,N-диметил-п-фенилендиамина дигидрохлорида. Растворы хранят в нейтральных светозащищенных стеклянных флаконах при температуре от 4 до 10 °С. Раствор должен быть бесцветным. Смочите полоску фильтровальной бумаги реагентом. Используйте платиновые кольца или стеклянные палочки для 24-часовых чистых культур исследуемых бактерий, выращенных на соево-казеиновом агаре или среде № 1. Темно-красный цвет в течение 1 минуты свидетельствует о положительной оксидазной реакции. Культуры *Pseudomonas aeruginosa* служили положительным контролем, а культуры *Escherichia coli* служили отрицательным контролем.

#### **2. Обнаружение присутствия индола**

Реактив Ковача:

Амиловый или изоамиловый спирт – 75 мл;  
п-Диметиламинобензальдегид - 5 г;  
Концентрация соляной кислоты - 20 мл.

Растворяют навеску альдегида в спирте при слабом нагревании (на водяной бане при 50-55°C), охлаждают и медленно добавляют кислоту.

Хранить раствор в темном месте при температуре от 4 до 10°C. Реагент должен быть желтым. При неправильном хранении реагент станет коричневым и станет непригодным для использования. В пробирку с соево-казеиновым бульоном или средой 15, в которой росла тест-культура, добавляют 0,5 мл реактива Ковача и осторожно встряхивают. Через несколько минут на поверхности среды в пробирке в присутствии индола появилось красное кольцо. Положительные контроли представляли собой культуры *E. coli*, а отрицательные контроли представляли собой культуры *Salmonella abony*.

### **3. Обнаружение наличия коагулазы (реакция свертывания плазмы)**

Развести сухую цитратную плазму кролика 0,9% стерильным изотоническим раствором натрия хлорида и разлить в стерильные пробирки по 0,5 мл согласно прилагаемой инструкции. Одну петлю суточной культуры изолированных кокков, выращенных на соево-казеиновом агаре или среде № 1, помещают в пробирку. Культуры *Staphylococcus aureus* служили положительным контролем, а культуры *Staphylococcus epidermidis* служили отрицательным контролем. Необходим также контроль незагрязненной плазмы. Пробирки инкубировали при  $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ . Реакцию свертывания плазмы регистрируют каждый час в течение 4-6 часов, слегка наклоняя пробирку, но не встряхивая.

При отсутствии положительной реакции свертывания плазмы время инкубации было увеличено до 24-х часов для получения окончательных результатов.

Проба на наличие коагулазы считается положительной при коагуляции плазмы.

Описанный метод определения микробной чистоты применим к нестерильным фармацевтическим продуктам (субстанциям и препаратам), вспомогательным веществам и полупродуктам, а также для определения эффективности антимикробных консервантов и для контроля производственных помещений в фармацевтических компаниях и лабораториях службы контроля.

#### **3.2.3. Компоненты сред для тестирования стерильности и микробной чистоты лекарственных средств**

Питательные среды должны быть приготовлены точно по данной рецептуре, а сухие питательные среды – согласно инструкции производителя. Желаемый рН питательной среды устанавливается на уровне  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Среду стерилизуют в автоклаве при температуре 15 мин.

Если не указано иное, 121°C подлежит утвержденному процессу стерилизации.

Питательные среды должны обеспечивать рост и развитие микробных контаминантов лекарственного препарата.

**Фосфатный буферный раствор, содержащий хлорид натрия и пептон рН 7,0:**

Фосфат калия монозамещенный 3,6 г.

Двухзамещенный фосфат натрия 7,2 г.

Хлорид натрия 4,3 г.

Пептон (мясной или казеиновый) 1,0 г.

Вода очищенная 1000 мл.

**Полужидкий агар для хранения тест-микроорганизмов:**

Панкреатический гидролизат казеина 8,0 г.

Хлорид натрия 5,0 г.

Агар 5,0 г

Вода очищенная 1000 мл.

рН 7,0 ± 0,2 после стерилизации.

**Казеин-соевый переваренный агар:**

Панкреатический гидролизат казеина 15,0 г.

Соевый гидролизат папайи 5,0 г.

Хлорид натрия 5,0 г.

Агар 15,0 г.

Вода очищенная 1000 мл

рН после стерилизации 7,3 ± 0,2.

Домашняя среда для культивирования аэробных бактерий - среда №1, применяемая для контроля микробной обсемененности, сушки, различных производителей.

**Агар Сабуро с декстрозой и антибиотиками (декстрозный агар Сабуро с антибиотиками):**

Пептон (мясной и казеиновый) 10,0 г.

Глюкозы моногидрат 40,0 г.

Агар 15,0 г.

Вода очищенная 1000 мл.

рН после стерилизации составляет 5,6 ± 0,2.

Среда бытовая для выращивания дрожжей и плесени - Среда № 2 (Соболиный агар с декстрозой и антибиотиками) для контроля микробной обсемененности, сушки, различных производителей.

Добавляют 0,1 г натриевой соли бензилпенициллина и 0,1 г тетрациклина на 1 л среды в виде стерильного раствора перед использованием или поочередно добавляют 50 мг хлорамфеникола (L-тетрациклина) на 1 л среды перед стерилизацией.

**Бульон Мозера для обогащения энтеробактерий (Enterobacter Enrichment Broth - Moser):**

Панкреатический гидролизат желатина 10,0 г.

Глюкоза моногидрат 5,0 г.

Желчь говяжья сухая 20,0 г.

Фосфат калия монозамещенный 2,0 г.

Двузамещенный фосфат натрия 8,0 г.

Ярко-зеленый 0,015 г

Вода очищенная 1000 мл.

pH  $7,2 \pm 0,2$ .

Нагрейте среду при 100°C в течение 30 мин, затем быстро охладите.

Самодельная обогатительная среда для энтеробактерий - Среда №3 для контроля микробной обсемененности, сухая, различных производителей.

**Моссель-агар (кристаллический фиолетовый, нейтральный красный, желчный агар):**

Экстракт дрожжей 3,0 г.

Панкреатический гидролизат казеина 7,0 г.

Желчные соли 1,5 грамма.

лактозы моногидрат 10,0 г.

Хлорид натрия 5,0 г.

Глюкозы моногидрат 10,0 г.

Агар 15,0 г.

Нейтральный красный 0,03 г.

Кристалльная фиолетовая 0,002 г

Вода очищенная 1000 мл.

pH  $7,4 \pm 0,2$ .

Нагреть до кипения. Его нельзя нагревать в автоклаве. Самодельная среда для выделения энтеробактерий - Среда № 4 для контроля микробной обсемененности, сухая, различных производителей.

**Бульон МакКонки:**

Панкреатический гидролизат желатина 20,0 г.

лактозы моногидрат 10,0 г.

Вяленый говяжий желчный пузырь 5,0 грамм.

Бромкрезол фиолетовый 10,0 г.  
Вода очищенная 1000 мл.  
рН после стерилизации  $7,3 \pm 0,2$ .

Самодельная обогатительная среда для энтеробактерий - Среда № 3 для контроля микробной обсемененности, сухая, различных производителей.

**Агар МакКонки:**

Панкреатический гидролизат желатина 17,0 г.  
Пептон (мясной и казеиновый) 3,0 г.  
лактозы моногидрат 10,0 г.  
Хлорид натрия 5,0 г.  
Желчные соли 1,5 грамма.  
Агар 13,5 г.  
Нейтральный красный 0,03 г.  
Кристаллическая фиолетовая 0,001 г  
Вода очищенная 1000 мл.  
рН после стерилизации  $7,1 \pm 0,2$ .

Перед стерилизацией прокипятить 1 минуту при постоянном встряхивании. Самодельная среда для выделения энтеробактерий - Среда № 4 для контроля микробной обсемененности, сухая, различных производителей.

**Дезоксихолат-цитратный агар:**

Мясной экстракт 10,0 г.  
Мясной пептон 10,0 г.  
лактозы моногидрат 10,0 г.  
Цитрат натрия 20,0 г.  
Цитрат железа 1,0 г.  
дезоксихолат натрия 5,0 г.  
Агар 13,5 г.  
Нейтральный красный 0,02 г.  
Вода очищенная 1000 мл.  
рН  $7,3 \pm 0,2$ .

Довести до кипения и варить  
1 мин, охладить до  $50^{\circ}\text{C}$  и разлить в чашки Петри. Его нельзя нагревать в автоклаве.

**Ксилоза, лизин, дезоксихолатный агар (ксилозный, лизиновый, дезоксихолатный агар):**

Ксилоза 3,5 г.  
L-лизин 5,0 г.  
лактозы моногидрат 7,5 г.  
Сахароза 7,5 г.  
Хлорид натрия 5,0 г.  
Экстракт дрожжей 3,0 г.  
Феноловый красный 0,08 г  
Агар 13,5 г.  
дезоксихолат натрия 2,5 г.  
Тиосульфат натрия 6,8 г.  
Железо-аммоний цитрат 0,8 г.  
Вода очищенная 1000 мл.  
рН 7,4 ± 0,2.

Довести до кипения, охладить до 50°C и разлить по чашкам Петри. Его нельзя нагревать в автоклаве.

Агар с бриллиантовым зеленым, агар с феноловым красным, агар с лактозой и сахарозой (среда с агаром с бриллиантовым зеленым):

**Пептон (мясной и казеиновый) 10,0 г.**

Экстракт дрожжей 3,0 г.  
Хлорид натрия 5,0 г.  
лактозы моногидрат 10,0 г.  
Сахароза 10,0 г  
Агар 20,0 г  
Феноловый красный 0,08 г  
Ярко-зеленый 0,0125 г  
Вода очищенная 1000 мл.  
рН после стерилизации составляет 6,9 ± 0,2.

Кипятить 1 минуту. Использовать сразу после автоклавирования.

**Висмутсульфитный агар:**

Мясной экстракт 5,0 г.  
Мясной пептон 10,0 г.  
Глюкоза моногидрат 5,0 г.  
Двузамещенный фосфат натрия 4,0 г.  
Сульфат железа 0,3 г.  
Ярко-зеленый 0,025 г  
Висмута сульфит 8,0 г.  
Агар 15,0 г.  
Вода очищенная 1000 мл.

pH  $7,6 \pm 0,2$ .

Среда не автоклавируется. Приготовленная среда была мутной и зеленой. Самодельная среда для выделения сальмонелл - среда № 5 для контроля микробной контаминации, сухая, различных производителей.

**Глюкозный бульон:**

Мясной пептон 10,0 г.

Мясной экстракт 3,0 г.

Хлорид натрия 5,0 г.

Глюкозы моногидрат 10,0 г.

Бромкрезол фиолетовый 0,02 г

Вода очищенная 1000 мл.

pH после стерилизации составляет  $7,2 \pm 0,2$ .

Самодельная среда для идентификации энтеробактерий - Среда № 6 для контроля микробной контаминации, сухая, различных производителей.

**Нитратный бульон:**

Мясной пептон 8,6 г.

Хлорид натрия 6,4 г.

Нитрат калия 1,5 г.

Вода очищенная 1000 мл.

pH после стерилизации составляет  $7,2 \pm 0,2$ .

Среда самодельная для идентификации энтеробактерий - Среда № 7 для контроля микробной обсемененности, сухая, различных производителей.

**Соево-казеиновый бульон:**

Панкреатический гидролизат казеина 17,0 г.

Гидролизат соевой кислоты папайи 3,0 г.

Хлорид натрия 5,0 г.

Фосфат калия двузамещенный 2,5 г.

Глюкоза моногидрат 2,5 г.

Вода очищенная 1000мл.

pH после стерилизации  $7,3 \pm 0,2$ .

Среда для роста домашних бактерий - это среда № 8, которая используется для контроля микробного загрязнения, сушки и двух частей.

**Цетримидный агар:**

Панкреатический гидролизат желатина 20,0 г.

Хлорид магния 1,4 г.  
Калия сульфат двузамещенный 10,0 г.  
Цетримид (гексадецилпиридиния бромид) 0,3 г.  
Агар 13,6 г.  
Глицерин 10,0 мл.  
Вода очищенная 1000мл.  
рН после стерилизации составляет  $7,2 \pm 0,2$ .

**Домашняя среда для выделения *Pseudomonas aeruginosa* СРС-агар для выделения *Pseudomonas aeruginosa*, сухой.**

СРС-агар:

Сухой фермент пептон 20,0 г.  
Сульфат калия 7,6 г.  
Сульфат магния семиоводной 2,4 г.  
Сода кальцинированная 1,0 г  
Фенольная кислота 0,2 г.  
СРС (N-гексадецилпиридиния хлорид, 1-водный раствор) 0,3 г.  
Агар 8 г.  
Вода очищенная 1000мл.  
рН  $7,2 \pm 0,2$ .

Среда не стерилизуется.

**Агар для обнаружения *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas* Agar Medium for Detection Pyocyanin):**

Панкреатический гидролизат желатина 20,0 г.  
Безводный хлорид магния 1,4 г.  
Безводный сульфат калия 10,0 г.  
Агар 15,0 г.  
Глицерин 10,0 мл.  
Вода очищенная 1000мл.  
рН после стерилизации составляет  $7,2 \pm 0,2$ .

Все ингредиенты, кроме глицерина, растворяли в воде, нагревали сопротивление и кипятили в течение 1 минуты, добавляли глицерин и стерилизовали.

**Агар Берда-Паркера:**

Панкреатический гидролизат казеина 10,0 г.  
Мясной экстракт 5,0 г.  
Экстракт дрожжевой 1,0 г.



хлорид лития 5,0 г.  
Агар 20,0 г  
Глицин 12,0 г.  
Пируват натрия 10,0 г.  
Вода очищенная 950мл.  
рН после стерилизации составляет  $6,8 \pm 0,2$ .

После стерилизации охладить до 45-50°C, добавить 10 мл фруктового 1% раствора теллурида калия и 50 мл 1% сухофруктов.

**Агаровая среда Фогеля-Джонсона:**

Панкреатический гидролизат казеина 10,0 г.  
Экстракт дрожжей 5,0 г.  
Маннитол 10,0 г  
Двузамещенный фосфат калия 5,0 г.  
хлорид лития 5,0 г.  
Глицин 10,0 г  
Агар 16,0 г.  
Феноловый красный 0,025 г  
Вода очищенная 1000мл.  
рН после стерилизации составляет  $7,2 \pm 0,2$ .

После стерилизации охлаждают до 45–50°C и добавляют 20 мл 1% раствора теллурида калия.

Домашняя среда для выделения золотистого стафилококка - Среда № 10 для контроля микробной обсемененности, высыхания, различных возбудителей.

**Лактозный бульон (бульон, содержащий моногидрат лактозы):**

Мясной экстракт 3,0 г.  
Панкреатический гидролизат желатина 5,0 г.  
лактозы моногидрат 5,0 г.  
Вода очищенная 1000мл.  
рН после стерилизации составляет  $6,9 \pm 0,2$ .

После стерилизации следует быстрый охладитель сред. Бытовая среда для интенсивного обогащения энтеробактерий - среда № 11 для контроля микробной обсемененности, сухости, различных патогенов.

**Ярко-зеленый бульон с тетрасульфатом желчи:**

Пептон 8,6 г.  
Вяленый говяжий желчный пузырь 8,0 грамм.  
Хлорид натрия 6,4 г.

Карбонат кальция 20,0 г.

Калия тетрасульфат 20,0

Ярко-зеленый 0,07 г

Вода очищенная 1000мл.

pH  $7,0 \pm 0,2$ .

Перед использованием к 1000 мл питательной среды добавляют 20 мл раствора йода и йодида калия (6 г йодида металла, 5 г йодида калия, 20 мл очищенного).

#### **Трисахаридный железный агар:**

Мясной экстракт 3,0 г.

Экстракт дрожжей 3,0 г.

Пептон (казеиновый и мясной) 20,0 г.

Хлорид натрия 5,0 г.

лактозы моногидрат 10,0 г.

Сахароза 10,0 г

Глюкоза моногидрат 1,0 г.

Железо-аммонийцитрат 0,3 г.

Тиосульфат натрия 0,3 г.

Феноловый красный 0,025 г

Агар 12,0 г.

Вода очищенная 1000 мл.

pH после стерилизации составляет  $7,4 \pm 0,2$ .

Среду наливают в пробирку и заполняют на 1/3 объема. После стерилизации среду наклоняют таким образом, чтобы образовались столбики и боковые столбцы. Самодельная среда для идентификации сальмонелл - Среда № 13 для контроля микробной контаминации, сухая, различных производителей.

#### **Цитратный агар Симмонса:**

Хлорид натрия 5,0 г.

Сульфат магния 0,2 г.

Дигидрофосфат аммония 1,0 г.

Гидрофосфат калия 1,0 г.

Цитрат натрия 3,0 г.

Бромтимоловый синий 0,08 г

Агар 20 г.

Вода очищенная 1000 мл.

pH после стерилизации составляет  $7,2 \pm 0,2$ .

Самодельная среда для идентификации кишечной палочки - Среда № 14 для контроля микробной контаминации, сухая, различных производителей.

### 3.2.4. Испытание на пирогенность

Методы обнаружения пирогена можно разделить на химический, физический и биологический. Химические методы основаны на проведении определенных цветных реакций. Физические методы основаны на измерении электропроводности и полярографических максимумов. Из-за некоторых недостатков первых двух методов наиболее часто используется биологический метод, который официально принят и занесен в Государственную фармакопею Республики Казахстан.

Проверка пирогенности растворов для инъекций и веществ, из которых они изготовлены, основана на измерении температуры тела кролика до и после инъекции.

Каждый кролик содержался в индивидуальной клетке, полностью накормлен и защищен от раздражителей (акустических, оптических и др.). Перед испытанием животных осматривали и отбирали здоровых кроликов того же пола и без альбинизма с массой тела 2,0-3,5 кг и без потери массы тела за предыдущую неделю. Поддерживать постоянную температуру воздуха  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$  в помещениях, где находятся животные и проводятся испытания. За 18 часов до испытания кролики находились натошак без пищи и воды. Во время эксперимента животные не едят и не пьют.

Кроликов, подготовленных впервые или не участвовавших в эксперименте более четырех недель, первоначально готовили к процедуре тестирования, выполняя все рабочие операции (проверка, взвешивание, измерение температуры), кроме инъекций. Кроликов, ранее участвовавших в эксперименте, можно было использовать снова через три дня, если лекарство, которое им давали, было апирогенным. Кроликов, у которых температура тела поднялась выше  $0,6^{\circ}\text{C}$ , можно использовать для дальнейших опытов не ранее, чем через две недели.

Если испытуемый препарат является антигенным, процедура повторения испытания на животных.

Наборы для разведения, шприцы и иглы должны быть стерильными и апирогенными, что обеспечивается нагреванием при  $250^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут или  $200^{\circ}\text{C}$  в течение 60 минут. Для разбавления испытуемого продукта используют 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций. Все растворители должны быть стерильными и апирогенными. Измерьте ректальную температуру кролика медицинским максимальным ртутным термометром или электронным термометром с термочувствительным датчиком с точностью до  $0,1^{\circ}\text{C}$ . В прямую кишку кролика вводят термометр или датчик на глубину от 5 до 7,5 см в зависимости от веса животного.

Исследуемый препарат вводили кроликам в ушную вену. Объем инъекционного раствора должен быть не менее 0,2 мл и не более 10 мл на 1,0 кг массы тела животного. Перед дозированием раствор подогреть до  $37,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Весь объем препарата вводят не более чем за 2 минуты. Тестовая доза испытуемого препарата, объем инъекционного раствора.

Испытания препарата проводили на группе из трех кроликов при исходной температуре  $38,5-39,5^{\circ}\text{C}$ . Перед экспериментом у каждого кролика дважды измеряли температуру тела с интервалом не менее 30 мин. Показания температуры одного и того же животного не должны отличаться более чем на  $0,2^{\circ}\text{C}$ . В противном случае кролики исключались из испытаний. Значение последнего измерения используется в качестве начальной температуры. Растворы испытуемых препаратов вводили животным сразу после второго измерения температуры. Измерения температуры после внутривенного введения исследуемого препарата проводились с интервалами, не превышающими 30 минут, в течение 3 часов. При других парентеральных путях введения - пять часов.

Испытания лекарственных средств можно проводить поэтапно. Используйте трех кроликов для каждого шага. Максимальное количество этапов не должно превышать четырех. В конце каждого испытательного периода определяют максимальное изменение температуры (дельта t) тела кролика по сравнению с начальным значением. Изменения температуры тела животных ниже исходного значения считали нулевыми и не учитывали. Для трех кроликов определяли сумму индивидуальных максимальных подъемов температуры (SUM дельта t). Значения SUM дельта t, полученные на разных этапах испытания, последовательно складывались и результаты сравнивались с уровнями, приведенными в табл. 11.

Таблица 11

Этап	Общее количество животных	SUM дельта t				ЛС признают пирогенным, если SUM дельта t
		Лекарственное средство признают апиrogenным		Повторное испытание (перестановку) проводят		
		Если SUM дельта t	при числе животных с повышением дельта t > $0,5^{\circ}\text{C}$ не более	Если SUM дельта t	при числе животных с повышением дельта t > $0,5^{\circ}\text{C}$	
1	3	>1,2	-	>1,2	1	-
2	6	>2,8	1	>2,8, но <4,3	1	>4,3

3	9	>4,5	2	>4,5 , но <6,0	2	>6,0
4	12	>6,6	3	-	-	6,6*

### Оценка результатов испытаний

Более чем у трех из двенадцати кроликов было индивидуальное повышение температуры более чем на 0,5°C, и препарат считался пирогенным.

### 3.2.5. Микробиологический контроль нестерильных фармацевтических продуктов

**Нестерильные** лекарственные средства – лекарственные средства, в состав которых допускается включение живых микроорганизмов, количество и качественный состав которых зависят от вида и применения изделия и стандартизированы соответствующими документами. Нестерильные препараты составляют около 80% от общего количества выпускаемых лекарств. Микробиологические требования были разработаны при выявлении случаев заболевания человека, вызванного применением микробно-загрязненных препаратов.

Примеры микробных загрязнителей, обнаруженных в фармацевтических продуктах:

Анализируемый продукт	Обнаруженный микроб-загрязнитель
Глазные капли	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Тальк	<i>Clostridium tetani</i>
Глазная мазь с антибиотиком	<i>P. aeruginosa</i>
Крем для рук	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Укропная вода	<i>P. aeruginosa</i>
Раствор хлоргексидина цитрата	<i>Burkholderia cepacia</i>
Инъекционный раствор	<i>Erwinia sp.</i>
Порошок поджелудочной железы	<i>Salmonella sp.</i>
Раствор для контактных линз	<i>Serratia sp., Enterobacter sp.</i>
Хирургическая одежда	<i>Clostridium sp.</i>
Раствор йодофора	<i>P. aeruginosa</i>
Полоскание, содержащее тимол	<i>P. aeruginosa</i>
Антисептическое полоскание	колиформы

В зависимости от источника и пути проникновения микроорганизмов в лекарственный препарат могут применяться различные методы для обеспечения желаемого уровня микробной чистоты нестерильных лекарственных препаратов. Если микробное загрязнение произошло в результате контакта с сырьем, достаточно очистить сырье от микроорганизмов для достижения желаемого уровня микробной чистоты.

Обеззараживание готовой лекарственной формы в случае возникновения микробной контаминации в процессе производства. Предварительное обеззараживание (низкая влажность и высокое давление исходного порошка при отсутствии спорных микроорганизмов) может быть достигнуто прессованием сыпучего материала. На практике применяют четыре метода обеззараживания сырья и готовой продукции.

**Термический способ.** Широко используемый метод промышленной дезактивации. Не подходит для обработки термолабильных лекарственных форм, нагреваемых до 60-70°C с помощью горячего воздуха, инфракрасного и высокочастотного излучения. химический способ. Он больше подходит для стерилизации посуды, труб и других изделий из полимерных материалов. Бицид представляет собой смесь этиленоксида или этиленоксида и бромистого метила (соотношение 1:25). Для прямого обеззараживания фармацевтических препаратов этот метод имеет ограниченное применение, так как окись этилена взаимодействует с веществами, содержащими галогены, гидроксильные и карбоксильные группы.

**УФ облучение.** Существенным ограничением более широкого применения этого метода является его малоэффективность при работе с непрозрачными веществами (бактерицидный эффект достигается только на глубине 1 мм). В основном он используется для обработки упаковочных материалов и технической воды. Формованные вещества (крахмал, тальк, сахар) в диспергированном состоянии (при перемешивании) можно обрабатывать УФ-светом.

**Ионизирующее излучение.** Наиболее перспективный метод обеззараживания сырых и готовых лекарственных форм. Ионизирующее излучение обладает высокой проникающей способностью. В процессе облучения не образуются канцерогенные, мутагенные и токсические вещества, сохраняются физико-химические и биологические свойства обработанных препаратов. Этот метод используется для лечения антибиотиками, витаминами, ферментами, гормонами и алкалоидами.

### 3.2.6. Микробный контроль фармацевтической стерильности

Стерильность – это отсутствие живых микроорганизмов. Для стерильных лекарственных форм наличие микроорганизмов, даже в малом количестве, может стать летальным, учитывая беспрепятственное попадание микроорганизмов в кровь или на слизистые оболочки организма, при условии ослабленного иммунитета человека.

Этот тест относится к стерильным препаратам:

- Препараты для инъекций (растворы, лиофилизированные и стерильные расфасованные инъекции и порошки для инфузий);
- офтальмологические препараты;
- Местный антисептический раствор;
- Местные мази, гели (для раневых поверхностей);

- Методы определения стерильности

Если испытуемый продукт должен быть отфильтрован, мембранная фильтрация является предпочтительным методом.

Среды, используемые для определения стерильности:

1. Жидкие тиогликолевые среды: снижают окислительно-восстановительный потенциал и способствуют росту анаэробных микроорганизмов.
  - Обнаружение анаэробных бактерий
  - Аэробные бактерии
2. Бульон на основе гидролизата казеина и сои (среда Сабуро)
  - Идентификация грибов
  - Идентификация аэробных бактерий.

В работе использовали следующие питательные среды: тиогликолевый и соево-казеиновый бульон для культивирования аэробных и анаэробных бактерий и бульон Сабуро для выявления грибов. Все культуры культивировали не менее 14 дней. Соевый казеиновый бульон и среда Сабуро при  $22,5(\pm 2,5)^{\circ}\text{C}$  на тиогликолевой среде при  $32,5(\pm 2,5)^{\circ}\text{C}$ . Ежедневно проверяйте урожай.

Для определения стерильности использовали прямой посев и мембранную фильтрацию. Прямой посев – это внесение навески испытуемого препарата непосредственно в питательную среду в объеме, в 10 раз превышающем объем используемого препарата. При помутнении питательной среды после внесения образца в конце инкубации повторный посев на аналогичную среду продлевает срок хранения урожая на 4 дня.

При испытании масел и масел готовят образцы состава в виде эмульсии с использованием фосфатно-буферного раствора с твином-80 и стеклянными шариками и при необходимости нагревают до температуры не выше  $42^{\circ}\text{C}$ .

Мембранную фильтрацию применяют в основном при определении стерильности препаратов, обладающих выраженным антибактериальным действием, и препаратов в емкостях объемом более 100 мл. За исключением противомикробных препаратов, нерастворимых в воде или изопропилмиристате.

Тестирование проводят с использованием фильтрующего блока, который должен быть установлен таким образом, чтобы тестируемый раствор (жидкость) можно было ввести и отфильтровать в стерильных условиях. После завершения фильтрации мембраны асептически переносят на питательную среду.

Существует и другая конструкция фильтрующего оборудования – асептические закрытые системы, где мембрана устанавливается в бак, а после фильтрации в бак добавляется стерильная среда. Мембранные фильтры для тестирования на стерильность обычно имеют размер пор 0,45 мкм и внешний диаметр 47 мм.

Для водных, маслянистых и слабоалкогольных (менее 30%) растворов применяют нитроцеллюлозные фильтры, для концентрированных спиртовых растворов - фильтры из ацетата целлюлозы и т. д. Гидрофобные края фильтра и низкая адсорбционная способность минимизируют потери препарата при фильтрации. Для составов, которые не являются бактериостатическими или бактериостатическими, можно использовать фильтры без гидрофобных краев, смачивая их перед фильтрацией, если не указано иное. Установки и фильтры стерилизуются автоклавированием.

Если препарат представляет собой масляный раствор, фильтр и устройство перед использованием необходимо тщательно высушить.

### **3.2.7. Обнаружение бактериального эндотоксина**

Относительно введения показателя «бактериальный эндотоксин» в Государственной фармакопее Республики Казахстан описан способ определения бактериального эндотоксина в парентеральных лекарственных средствах и веществах, используемых для изготовления этих лекарственных средств.

Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводят с помощью реагентов, представляющих собой лизаты клеток крови (амебоцитов) *Limulus* (реактив ЛАЛ) или *Limulus* (реактив ТАЛ). В результате реакции с эндотоксином реакционная смесь мутнеет, а ее вязкость увеличивается до образования плотного геля, образующегося как индикатор наличия в образце бактериального эндотоксина. Анализ, выполненный таким образом, называется тестом на гель-сгусток. Этот метод можно использовать для определения соответствия содержания бактериального эндотоксина максимальному содержанию бактериального эндотоксина, а также для определения содержания бактериального эндотоксина в испытуемом лекарственном средстве.

Допускаются модификации с использованием других методов, если они указаны в фармакопейной статье и валидированы для данного лекарственного средства. Когда среднее значение содержания бактериального эндотоксина, измеренное в испытании, меньше предела содержания бактериального эндотоксина.

По сравнению с биологическими методами этот метод имеет много преимуществ: в 5-10 раз более высокую чувствительность, более быстрые результаты, количественное определение пирогенов. Кроме того, его можно использовать для контроля препаратов, которые нельзя тестировать на кроликах. Одним из недостатков этого метода является его специфичность в отношении эндотоксинов грамотрицательных бактерий, т.е. опасность других источников пирогенов в препарате не обнаруживается.



### 3.3 Гигиеническое и микробиологическое обследование оборудования персонала, лабораторной посуды, рук и спецодежды

Бактериальную обсемененность определяли путем изучения микрофлоры смывов, взятых с рук и поверхностей испытуемых.

В аптеке лабораторная посуда требует исследования:

Флаконы, резиновые пробки, фильтрующие воронки, колбы, цилиндры для приготовления и розлива растворов.

**Отбор проб.** На выбор 3 флакона для приготовления и розлива растворов для инъекций, глазных капель, нестерильных жидких лекарственных средств. Один рулон, запечатанный стерильной пробкой и отправленный в лабораторию. В лаборатории последовательно ополаскивают три одноименных флакона 10 мл стерильной дистиллированной воды.

Резиновые пробки, 5 шт. Образцы одинакового размера помещали в широкогорлые стерильные колбы или банки и закрывали стерильными ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками. В банку с пробкой налить 10 мл стерильной воды, отправить в лабораторию и тщательно промыть.

Не менее трех фильтровальных воронок, мерных колб и градуированных цилиндров одной установки ополаскивают 10 мл стерильной дистиллированной воды. Мазок помещают в стерильный лабораторный флакон и отправляют в лабораторию на анализ.

Пипетки (не менее 3 штук одного объема) ополаскивают последовательно не менее 5 раз в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирки с промывным раствором закрывали стерильными марлевыми пробками и отправляли в лабораторию.

В аптеке промывочным методом необходимо проверить следующее оборудование:

- а) Рабочий стол
- б) контейнеры для хранения пробок;
- в) водопроводные краны;
- г) Перегонные аппараты и другое оборудование.

**Отбор проб.** Промойте стерильным тампоном длиной 5,5 см или марлевой салфеткой и стерилизуйте в бумажном пакете или чашке Петри. Для смачивания ватных тампонов и салфеток в стерильную пробирку наливают 2 мл стерильного физиологического раствора. Салфетку держат стерильным пинцетом, смоченным физиологическим раствором в пробирке, и помещают в эту же пробирку после обтирания испытуемого.

При контроле мелких предметов мазки берут со всей поверхности предмета. При наблюдении за объектами с большими поверхностями промывка производится в нескольких местах на предмете, площадью

примерно 100 см<sup>2</sup>. Для ограничения поверхности используется шаблон (шаблон) из проволоки. Площадь шаблона должна быть 25 см<sup>2</sup>, а для взятия мазков с площади 100 см<sup>2</sup> наносят 4 раза в разные места на предмет. Шаблоны, завернутые в бумагу, стерилизуют в лаборатории. Шаблон в месте отбора проб допускается стерилизовать, прожигая его спиртом или на горелке. Ватным тампоном протрите поверхность, ограниченную трафаретом, в перпендикулярных направлениях.

Для взятия смыва с **рук аптечных работников** тампоном протирают ладонные поверхности, пальцы, межпальцевые пространства, ногтевые ложа и подногтевые поверхности, проводя тампоном не менее 5 раз по каждому участку обеих рук.

Микробиологическое исследование **мягкого инвентаря** проводят путем смывов. При взятии смывов с халатов протирается четыре поверхности по 25 см<sup>2</sup>: нижняя поверхность каждого рукава и две площади с верхней части халата. При взятии смывов с полотенца протирается четыре площади по 25 см<sup>2</sup> в разных его участках.

Смывы с аптечного оборудования, мягкого инвентаря, рук аптечных работников готовят путем добавления 8 мл физиологического раствора в пробирки с ватным тампоном и 2 мл стерильного физиологического раствора, используемого для увлажнения тампона, и перемешивают путем перекачивания пробирки между ладонями в течение 3 мин.

В смывах определяют:

- 1) общую бактериальную обсемененность (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий);
- 2) наличие БГКП.

Чтобы определить общее количество микробов, измерьте количество мезофильных аэробов и факультативных анаэробов в 10 мл смыва. Для этого глубинным методом засевают по 1 мл промывного раствора в две стерильные чашки Петри. Инкубируйте чашки в течение 18-24 часов при 37°C и 24 часа при комнатной температуре. По истечении времени инкубации для инокуляции с помощью увеличительного стекла подсчитайте количество растущих колоний на агаре и внутри него. Количество колоний, установленных в 1 мл моющего раствора, умножают на 10, что соответствует количеству микроорганизмов на всей моющейся поверхности одноименного предмета.

Для определения наличия БГКП инокулируют оставшуюся промывку в 1 мл концентрированной глюкозо-пептонной среды. Через сутки инкубации при 37°C провести повторный поиск на среде Эндо в чашках Петри. Через сутки инкубации в термостате наблюдали за посевами. Отсутствие роста бактерий указывает на отрицательный результат.

При наличии типичных колоний кишечной палочки на среде Эндо их смазывают и окрашивают по Граму. А при обнаружении в мазке грамотрицательных бацилл подозрительную колонию засевают в

пробирку с глюкопептоновой средой и инкубируют в смыве 18-24 часа при 43°C.

**Требования к микробной чистоте:**

- 1.Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий в 10 мл промывочного раствора не должно превышать 150 микроорганизмов;
- 2.Колонии кишечной палочки не допускаются в аптечной посуде, смываемой с оборудования и рук.

## Заключение

В настоящее время во всем мире возрастает интерес к лекарственному растительному сырью - важнейшему источнику витаминов, макро- и микроэлементов и других биологически активных веществ в натуральных, сбалансированных формах, необходимых для жизнедеятельности человека.

В современной медицине важное место занимает фитотерапия (80%), и ее доля продолжает расти.

Поскольку растения широко используются для приготовления различных лекарственных форм, необходимо учитывать контаминацию растительного лекарственного сырья эпифитными и фитопатогенными микроорганизмами.

В данном пособии рассматриваются вопросы, связанные с растительной микрофлорой, фармацевтическим сырьем и готовыми лекарственными средствами, микробиологическими показателями качества лекарственных средств, аптечной гигиеной и методами микробного контроля. Представленная информация вооружит вас практическими навыками проведения гигиенических и микробиологических исследований лекарственных средств, сырья, воздуха в аптечных помещениях, аптечного оборудования и приборов.

Данное пособие облегчит работу студентов за счет учебных материалов, расширит кругозор практикующих врачей, поспособствует систематизации знаний.

Учебное пособие является дополнением к учебникам, и обучающиеся могут использовать их для оптимизации учебного процесса, лучшего понимания содержания предмета, формирования гигиенического мышления.

Таким образом: Врачам-фармацевтам и провизорам необходимы знания в области санитарной и фармацевтической микробиологии для четкого представления о распространении микроорганизмов в природе и об их влиянии на свойства лекарственных препаратов.

## Список литературы

1. Микробиология: учеб. для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальности 060301.65 «Фармация» / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2012. – 608 с.: ил. ISBN 978-5-9704-2086-7
2. Гунар, О. В. Микрофлора лекарственных средств и различные аспекты ее излучения (обзор) / О. В. Гунар // Химикофармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 2. – С. 31–39.
3. Коротяев, А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учеб. для мед. вузов / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. – СПб.: СпецЛит, 2002. – 591 с.
4. Муштоватова, Л. С. Микробиология растений, лекарственного сырья и готовых лекарств: учеб. - метод. пособие / Л. С. Муштоватова, О. П. Бочкарева ; под ред. Е. П. Красноженова. – Томск, 2006. – 41 с.
5. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология / О. К. Поздеев; под ред. В. И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 768 с.
6. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 7 июля 2021 года № ҚР ДСМ-58. Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 9 июля 2021 года № 23416 Об утверждении Санитарных правил "Санитарно-эпидемиологические требования к объектам в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий"
7. Государственная фармакопея Республики Казахстана: Утверждена приказом Министра здравоохранения РК от 31.12.2018 г. №707. Т.2. – Астана: [б.и.], 2009 – 804 с. – ISBN 978-601-7152-43-7: Б.ц.
8. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие. Т.2. Лекарственное растительное сырье. Анатомо-диагностические признаки фармакопейного и нефармакопейного лекарственного растительного сырья / И. А. Самылина, О. Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-9704-1578-8
9. Прищеп Т.П. Основы фармацевтической биотехнологии / Т.П. Прищеп, В.С. Чучалин, К.Л. Зайков и др. Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Изд-во НТЛ, 2006. – 256 с
10. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
11. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. - М.: Изд-во МГУ, 1994.-512 с.
12. Краткий терминологический словарь микробиолога-биотехнолога. М.: Наука, 1989. - 136 с.
13. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие / Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. - М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.

14. Быков В.А., Крылов И.А., Манаков М.Н. и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. М.: Высшая школа, 1987. 142 с.
15. Производство антибиотиков. / Под ред. С.М. Навашина. — М.: "Медицина", 1970.
16. Я.М. Станишевский. Промышленная биотехнология лекарственных средств. М.: гоэтар-Медиа, – 2021. – 140.
17. Д.А. Харкевич. Фармакология: учебник. 12-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, – 2018. – 760 с.
18. А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак, А.И. Нетрусов. Молекулярная микробиология: Учебник для вузов. – М.: МГУ, – 2017. – 480 с.
19. А.А. Воробьев, Е.В. Буданова, В.В. Зверев. Основы биологии, микробиологии и иммунологии: Учебник для студентов среднего профессионального образования. – М.: ИЦ Академия, – 2017. – 288 с.
20. С.Н. Орехов. Промышленное биофармацевтическое производство лекарственных препаратов. – ГЭОТАР-Медиа, – 2012.
21. С.Н. Орехов. Промышленное биофармацевтическое производство лекарственных препаратов, 2-ое издание. – ГЭОТАР-Медиа, – 2015.
22. Добровольская, Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв / Т.Г. Добровольская. — М.: Академия, 2002.
23. Звягинцев, Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Д.Г. Звягинцев. — М.: Изд-во : МГУ, 1991.
24. Микробиология / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.
25. Коротяев, А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. — СПб.: Специальная литература, 1998.
26. Нетрусов, А.И. Микробиология / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. — М.: Академия, 2006.
27. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Кн. 1 / коллектив авторов; под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Воиной. — М.: БИНОМ, 2008.
28. Семенкова, И.Г. Фитопатология / И.Г. Семенкова, Э.С. Соколова; М-во образования РФ. — М.: Академия, 2003.
29. Шейдеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание : в 3 т. Т. 1 : Микрофлора человека и животных и ее функции / Б. А. Шендеров. — М.: Грант, 1998.
30. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. — М.: Мир, 1987.
31. Галынкин, В.А. Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов : справочник / В.А. Галынкин, [и др.]. — СПб.: Проспект Науки, 2006. — 336 с.
32. Галынкин, В.А. Санитарно-микробиологический контроль в пищевой и фармацевтической промышленности / В.А. Галынкин [и др.]. — СПб., 2004. — 248 с.

33. Кочеровец, В.И. Введение в фармацевтическую микробиологию : учебное пособие / В.И. Кочеровец [и др.] ; под. ред. В.А. Галынкина, В.И. Кочеровца. — СПб. : Проспект Науки, 2014. — 238 с.
34. Микробиология: учебник для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальности 060301.65 «Фармация» / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 608 с.
35. Найденов, А.Н. Безопасность работ в микробиологических лабораториях. Защитная эффективность инженерных систем безопасности. — М.: ДеЛи плюс, 2013. — 224 с.
36. Тагиева, Л.В. Безопасность жизнедеятельности в фармацевтических производствах : учебное пособие / Л.В. Тагиева, Л.Н. Константинова. — СПб. : Проспект Науки, 2014. — 352 с.
37. Калуцкий, П. В. Учебно-методическое пособие по микробиологии для студентов фармацевтического факультета / П. В. Калуцкий, О. А. Медведева, Н. Н. Ефремова ; Курск. гос. мед. ун-т, каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии. - Курск : Изд-во КГМУ, 2015. - 117 с. (72 экз.)
38. Микробиология : учеб. для студентов фармацевт. и мед. вузов / А. А. Воробьев, А. С. Быков, Е. П. Пашков, А. М. Рыбакова. - М. : Медицина, 2003. - 335 с. : ил. (29 экз.)
39. Задания для самостоятельной работы по микробиологии : учеб.-метод. пособие для студентов лечеб., педиатр., мед.-профилакт., фармацевт., высш. сестр. образования, стомат. и биотехнолог. фак. / [Е. В. Шаталова и др.] ; Курск. гос. мед. ун-т. - Курск: КГМУ, 2004. - 30 с.
40. Склярова Е.К. История фармации: Учеб. – Ростов н/Д: Феникс, 2015. – 317с.

# **ОСНОВЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

Учебное пособие

---

Ответственный за выпуск  
Компьютерная верстка

Подписана в печать

Формат

Усл.печ.л.

Отпечатано на ризографе. Тираж . Заказ .

Актюбинский центр научно-технической информации, 2022г.

г.Актобе, ул.