Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
« Сибирский государственный медицинский университет Федерального
агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Кафедра микробиологии и вирусологии

МИКРОБИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВ.

(учебно-методическое пособие)

Томск 2006.

Под редакцией зав. кафедрой микробиологии и вирусологии, д.м.н., профессора Красноженова Е.П.

Учебно-методическое пособие разработали: доцент кафедры микробиологии и вирусологии, к.б.н. Муштоватова Л.С., старший преподаватель кафедры микробиологии и вирусологии, к.м.н. Бочкарева О.П.

Рецензент:
доцент Томского политехнического университета, к.м.н. Чубик М.В.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов очного и заочного отделений фармацевтических факультетов, провизоров и аптечных работников.

Утверждено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией фармацевтического факультета (протокол №__4__от 25 апреля__2006 года)

СОДЕРЖАНИЕ

Введение……..4
Микрофлора лекарственных растений……..5
Нормальная микрофлора……..5
Фитопатогенные микроорганизмы…….....9
Микрофлора растительного лекарственного сырья……...16
Определение микробной обсемененности растительного лекарственного сырья……...18
Санитарно-бактериологическое исследование лекарственных препаратов и аптек……19
Санитарно-бактериологическое исследование аптечных лекарственных препаратов……..19
Исследование заводских лекарственных препаратов на стерильность……...24
Исследование заводских лекарственных препаратов на микробную чистоту……..…32
Исследование сухих лекарственных субстанций для приготовления инъекционных растворов…….33
Исследование аптечной посуды и оборудования аптек……...36
Исследование воздуха аптечных помещений…….39
Список литературы……42

Введение

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов очного и заочного отделений фармацевтических факультетов, а также может быть использовано аптечными работниками – провизорами и фармацевтами.

В практической деятельности провизорам необходимы знания в области микробиологии, санитарной бактериологии. Провизор должен иметь четкие представления о мире микроорганизмов, распространении их в природе (воде, воздухе, почве, на растениях), о фитопатогенных микроорганизмах и микробах, приводящих к порче лекарственного сырья.

Приобретенные в области микробиологии знания и умения необходимы для организации фармацевтического дела, создания асептических условий при приготовлении лекарств, защиты от микробной порчи лекарственного сырья и лекарственных препаратов.

В пособии представлены характеристика микрофлоры растений и растительного лекарственного сырья, требования к санитарному состоянию аптек и лекарственных средств, а также методы исследования на биологическую загрязненность лекарств аптечного и заводского изготовления. Приведены сведения, позволяющие овладеть практическими навыками выполнения санитарно-бактериологических методов исследования лекарственных препаратов, лекарственного сырья, аптечного оборудования и посуды, воздуха аптечных помещений и представлены нормы допустимого количества микроорганизмов в объектах исследования аптек.

МИКРОФЛОРА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Микроорганизмы являются постоянными спутниками не только человека и животных, но и, в равной степени, высших растений, в том числе используемых в качестве лекарственного сырья. Микроорганизмы поселяются и ведут активный образ жизни, как на поверхности, так и внутри зеленых частей растений, их корней, семян, плодов. Для приготовления лекарств служат самые разнообразные растения, извлечены из них активнодействующие соединения. Многие растения служат для изготовления отваров, настоев и др. лекарственных форм. Необходимо учитывать, что растительное лекарственное сырье может быть обсеменено микроорганизмами - представителями нормальной микрофлоры растений, а также фитопатогенными микроорганизмами - возбудителями заболеваний растений и работники аптечных учреждений, фармацевтических фабрик и заводов должны обеспечивать сохранность лекарственного сырья от микробной порчи.

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

1. представители нормальной микрофлоры растений;
2. фитопатогенные микроорганизмы - возбудители инфекционных заболеваний растений.

Нормальная микрофлора растений на поверхности листьев, семенах и на прикорневой системе представлена ризосферными и эпифитными микробами.

Зона почвы, находящаяся в контакте с корневой системой растений, носит название **ризосферы**, а микроорганизмы, развивающиеся в данной зоне, называются ризосферными. Условно различают два типа ризосферы: ближнюю и отдаленную.

Ближняя располагается непосредственно на поверхности корней и извлекается вместе с ними, отдаленная начинается на расстоянии нескольких миллиметров от корней и распространяется в радиусе 50 см от них. Количество микроорганизмов в ближней и отдаленной ризосфере различно: на поверхности

корней их от 50 млн до 10 млрд, на расстоянии 15 см от корней до 5 млн в 1 г. почвы. Число микроорганизмов в ризосфере в 100 раз больше, чем в почве, где растения не произрастают, что связано с выделением корнями растений различных питательных веществ. В свою очередь, почвенные микробы могут оказывать благоприятное воздействие на жизнь растений, что обусловлено:

1) минерализацией органических веществ и растительных остатков;
2) образованием тиамина и др. витаминов, аминокислот, ферментов и других факторов роста, усиливающих ферментативные процессы в растениях и способствующих усилению корневого питания и более энергичному обмену веществ растений;
3) антагонистической ролью в отношении фитопатогенных микроорганизмов.

Качественный и количественный состав микрофлоры ризосферы специфичен для каждого вида растений. Основная масса прикорневой микрофлоры представлена неспороносными грамотрицательными бактериями рода Pseudomonas, микобактериями и грибами, главным образом, базидиомицетами, реже фикомицетами, аскомицетами. Указанные грибы образуют симбиоз с корнями растений, в том числе и лекарственных, называемый микоризой. *Микориза - это морфологически единое образование, состоящее из гриба и частей корневой системы растения. При этом гриб может быть симбионтом по отношению к растению-хозяину, или реже, хозяином для растения симбионта.*

Микориза особенно благоприятна для развития растений:

1. увеличивает поглощающую поверхность корней за счет разветвлений гиф гриба;
2. грибы своими ферментами разлагают богатые азотом органические соединения, обеспечивая растения аминокислотами, минеральными веществами и водой;
3. микоризные грибы снабжают растения ростовыми веществами.

Растения в свою очередь выделяют ряд ростовых веществ, стимулирующих развитие гриба. Кроме этого, грибы получают от растений углеводы, служащие источником энергии.

Впервые микориза описана русским ученым Ф.М.Каменским в 1883 году. Впоследствии было выполнено много работ по данной проблеме, однако, она остается далеко нерешенной. Известно, что нет ни одной значительной систематической группы растений (от слоевцовых до семенных), которые не жили бы в содружестве с грибами, хотя собственно микориза характерна только для высших растений. При этом грибы и растения взаимно питают друг друга. Главными представителями микоризных грибов являются базидиомицеты (Boletus, Amanila, Lactarius, Cortinarius, Russula, Triholoma, Entorhiza, Licoperdon, Sclerocierma и др.). Вместе с тем, микоризу может образовывать ряд грибов из фикомицетов (Pythium, Chitridium, Endogyne), аскомицетов (Elaphomyces, Tuber) и несовершенных грибов (Fusarium и др.).

Указанные микроорганизмы сожительствуют с различными представителями растительного царства, в том числе с лекарственными растениями. Так, известен симбиоз грибов с папоротниковидными (Pteridophyta), хвощами (Arthrophyta), плаунообразными (Lycopsida), голосеменными (Gymnospermae), саговниковыми (Cycadaceae), тиссовыми (Taxaceae). Исключительно богаты микоризами сосны, орхидеи и вересковые.

Микоризы можно обнаружить в самых различных почвах (кроме известковых), так как их образование зависит от характера почвы только в количественном, но не качественном отношении.

Различают эктотрофную микоризу, когда гриб оплетает кончики корней растений наподобие чехла, отдельные гифы при этом заходят между клетками эпидермиса, где образуют так называемую «сеть Гартига»; эндотрофную, когда гифы гриба проникают внутрь клеток первичной коры корня, где образуют сплетения в виде клубков или пелетонов; эктоэндотрофную, когда на корешках образуется наружный чехол, а отдельные гифы проникают в первичную кору.

Формирование микоризы связано с сезонной периодичностью: максимальное количество микориз наблюдается летом, минимальное - ранней весной и осенью.

Некоторые авторы описывают еще так называемую перитрофную микоризу, при которой грибница непосредственно не связана с корнями растений, но имеет значение для развития растения, поскольку микроорганизм изменяет реакцию среды около корней и повышает их усвояющую способность.

От микориз необходимо отличать псевдомикоризы, представляющие собой простые сплетения нитей грибка с корнями и нередко приводящие к болезням растения-хозяина. Грибница псевдомикоризы легко отделяется от корня, чем и отличается от истинной микоризы.

Эпифитная микрофлора. Эпифитной называется микрофлора, находящаяся на поверхности надземных частей растений. По качественному составу она довольно однообразна и типичными ее представителями являются Xenthomonas herbicola aureum - грамотрицательные короткие подвижные палочки, образующие колонии золотистого цвета на МПА; Pseudomonas fluorescens - полиморфные грамотрицательные палочки с полярными жгутиками, дающие флуоресценцию на МПА и МПБ. Реже встречаются споровые бактерии Bacillus mesentericus, Bacillus vulgatus, бесспоровые молочнокислые бактерии, E. coli, грибы плесневые и дрожжевые.

Многие эпифитные микроорганизмы являются антагонистами фитопатогенных бактерий, тем самым, предохраняют растения от заболеваний. Заселенность микробами растений зависит от условий произрастания, их высоты и целостности. Так, растения окультуренных почв содержат большее количество микробов, чем растения лесов и лугов; осенью на листьях обнаруживается больше бактерий, чем ранней весной. Верхние листья содержат меньше микробов, чем нижние, на которые бактерии попадают из почвы вместе с капельками влаги, отскакивающими от земли во время дождя. Особенно сильно заселены микробами растения, произрастающие на полях орошения,

свалках, местах выпаса скота; в этих растениях могут содержаться патогенные для человека микроорганизмы.

Срезанные и сорванные растения необходимо сразу подвергать обработке, так как они являются хорошей средой для размножения микробов. На высушенных растениях жизнедеятельность микробов значительно снижается, многие бактерии погибают.

Фитопатогенные микроорганизмы

Микроорганизмы, вызывающие инфекционные заболевания растений называются фитопатогенными. Инфекционные болезни растений бактериального происхождения — ***бактериозы***. К бактериозам относятся различные виды гнилей, бактериальные мшистости, ожоги (некрозы), увядания, опухоли и др.

К ***вирусным болезням*** относятся мозаичные болезни, желтуха, болезни увядания, карликовость, закукливание и другие. Различают также ***микофитозы,*** или грибковые болезни, например, *фузариозы, аскохитозы, воловни* и многие другие. К инфекционным болезням растений относят и ***актиномикозы,*** вызываемые актиномицетами.

Фитопатогенные бактерии, вызывающие разнообразные бактериозы растений, относятся к уже известным родам или выделяются в специальные роды. Однако существующая классификация фитопатогенных бактерий несовершенна, не всегда определена родовая и видовая принадлежность микроорганизма.

Фитопатогенные бактерии относятся к родам: Erwinia, Pectobacterium, Pseudomonas, Xanthomonas, Rhizobium, Corynebacterium, Agrobacterium и другие (табл. № 1). Заражение растений происходит через инфицированные семена, почву, грунтовые и дождевые воды, насекомых, а в некоторых случаях, и через воздух. Воздух, как путь распространения бактериальных болезней растений, может иметь значение при наличии массового источника, от которого

и переносятся возбудители. Однако роль воздуха в передаче бактериозов ограничена. Возбудители грибковых и бактериальных болезней растений более тесно, чем возбудители заболеваний человека и животных, связаны с почвой, что обусловлено особенностями жизни растений.

Таблица 1

Фитопатогенные бактерии - возбудители
инфекционных заболеваний лекарственных растений

Роды	**Виды**	**Вызываемые заболевания**
Erwinia	E. amylovora	Ожог, увядание
Pseudomonas	P. syringae	Пятнистость
Xenthomonas	X. heterocea	Пятнистость, увядание
Corynebacterium	C. insidiosum, C. fasciens	Увядание
Pectobacterium	P. phetophtorum, P. aroidae	Гнили
Rhisobium	R. legyminosorum	Язвы
Agrobacterium	A. tumefaciens	Опухоли

Важна роль погибших растений в передаче и распространении болезней, особенно бактериальных, так как почва, содержащая остатки неперегнивших полностью больных растений, бывает главным источником инфекта. Однако следует помнить, что фитопатогенные бактерии не могут длительно существовать в почве из-за антагонистического действия других бактерий, актиномицетов и грибов.

Фитопатогенные микроорганизмы сравнительно легко могут проникать в растения через естественные образования (чечевички, нектарники, желёзки, корневые волоски) и искусственные повреждения, даже ничтожные царапины. Некоторые микроорганизмы, способны вырабатывать ферменты, гидролизирующие кутикулу растений и облегчающие внедрение возбудителя.

Проникновение бактерий в ткани растений до некоторой степени сходно с проникновением бактерий в животные ткани, особенно тогда, когда это

сопровождается выделением микробами ферментов, растворяющих межклеточное вещество, и ядовитых веществ, которые убивают клетки, либо уменьшают их сопротивляемость микроорганизмам. При этом клетки мацерируются и отслаиваются друг от друга, что облегчает бактериям или грибам доступ внутрь растительных тканей. Такие бактериозы называются паренхиматозными, а путь распространения бактерий - *интрацеллюлярным и межклеточным.* Многие бактерии распространяются и размножаются в сосудистых пучках, особенно в ксилемной их части. Сосуды как бы закупориваются бактериями, и растение увядает. Такие заболевания называются сосудистыми. Увядание растений объясняется также действием ядов, выделяемых микроорганизмами.

С начала заражения и до момента появления у растений внешних симптомов болезни проходит инкубационный период. Длительность его зависит от очень многих факторов: температуры, влажности воздуха, света, питания, от устойчивости или восприимчивости растения. Развитие бактериоза характеризуется возрастающей интенсивностью поражения, связанной с размножением, активностью и распространением возбудителей по клеткам. Характер поражения может быть ограниченным, если у растения активизируются защитные реакции (действие окислительных ферментов, фитонцидов и др.).

По совокупности анатомических и физиологических изменений определяют тип болезни растений:

1. Камедетечения, смолотечения, слизетечения. Чаще всего вызываются бактериями рода Erwinia и грибами (класс Ascomycetes), в большинстве наблюдаются у лиственных и хвойных деревьев.
2. Сухая и мокрая гниль. При этом размягчаются и разрушаются отдельные участки тканей и органов растения за счет жизнедеятельности бактерий (род Pectobacterium) и грибов (класс Ascomycetes и Fungi imperfecti).

3. Мучнистая роса. На листьях и побегах возникает белый налет, который является следствием размножения грибов (класс Ascomycetes).
4. Пожелтение, увядание, засыхание. При этих состояниях растения отстают в росте (карликовость), их листья имеют бледно-желтую окраску, корни могут загнивать, разрушаться, и растения гибнут. Это заболевание чаще всего вызывается грибами (Fungi imperfecti), реже бактериями (род Corynebacterium), в ряде случаев заболевание носит неинфекционный характер.
5. Чернь. На листьях и побегах появляется черная пленка вследствие развития сумчатых и несовершенных грибов или бактерий рода Erwinia.
6. Ожог. На листьях, молодых побегах, цветах, плодах образуются водянистые пятна, которые темнеют, становятся коричневыми или черными. Пораженный лист отмирает, на плодах остаются темные пятна. Возбудителями ожога являются бактерии рода Erwinia.
7. Пятнистость. Некоторые бактерии (род Pseudomonas), грибы (класс Ascomycetes и Fungi imperfecti), вызывают образование пятен разного цвета, формы, размеров на листьях, семенах и плодах.
8. Опухоли. Местное увеличение объема стволов, ветвей, корней, корневищ в виде наростов, вздутий, утолщений за счет гиперплазии клеток. Эти заболевания вызываются бактериями (род Agrobacterium), грибами и механическими повреждениями.
9. Язвы. Проявляются в виде углублений, что окруженных наплывом. Вызываются бактериями (род Erwinia), грибами, механическими повреждениями, низкой температурой.
10. Мозаика листьев. На листьях появляются бледно окрашенные пятна, чередующиеся с нормально окрашенными участками. Вызываются вирусами.

11. Ведьмины метлы. Образование побегов из спящих почек в результате развития бактерий (род Rhisobium), грибов (класс Ascomycetes) и вирусов.
12. Деформация. Проявляется в изменении формы органов растения (искривление побегов, курчавость листьев, карликовость) вследствие поражения грибами (класс Ascomycetes и Fungi imperfecti), вирусами (семейство Reoviridae).

В последние годы все большее значение в растительной патологии приобретают вирусы, известно более 200 вирусных болезней растений. Большинство вирусов относится к семейству Reoviridae, родам Phytoreovirus, Fijvirus.

Растения заражаются вирусами при контакте с насекомыми, во время прививок, через почву, семена и прочее. Вирусные болезни наблюдаются у древесных, кустарниковых и травянистых растений.

Среди всех, возбудителей болезней растений особого упоминания заслуживает *спорынья,* и, в частности, склероции этого гриба (Claviceps purpurea). Спорынья паразитирует на злаках, главным образом на ржи. В настоящее время освоено ее культивирование в лабораторных условиях, с последующим применением посевного «заразного» материала, для искусственного заражения. В спорынье содержатся следующие алкалоиды: *эрготамин, эргозин, эргокристин, эргокриптии, эргокорнии, эргометрин* (левовращающиеся физиологически активные вещества) и эти же вещества в виде правовращающих физиологических неактивных форм (к названию их добавляется окончание «ин»). Спорынья широко применяется в акушерско-гинекологической практике для сокращения матки и остановки маточных кровотечений.

Существенно важным является, то обстоятельство, что у больных растений заметно отклоняются от нормы обменные процессы вплоть до качественных изменений клеточных структур, что приводит к нарушению химического состава тканей и снижению содержания действующих начал в

лекарственных растениях и использование их в качестве сырья в аптечных и заводских условиях становится невозможным.

Растительный организм обладает защитными механизмами, противодействующими внедрению и размножению фитопатогенных бактерий. Эта защита обеспечивается за счет совокупности наследственных и приобретенных свойств, создающих возможность организму противодействовать внедрению и размножению болезнетворных микробов и их ядовитых продуктов. Сюда можно отнести особенности строения покровных тканей, реакцию клеточного сока, наличие в тканях каких-либо веществ, вредно влияющих на микроорганизмы, и т.д. Растения могут также проявлять активные реакции против болезнетворных агентов: *образование некрозов, антиферментов, внутриклеточное переваривание паразита и прочее.*

Устойчивость растительных организмов может быть специфически или неспецифически повышена благодаря применению различных веществ.

К специфической резистентности можно отнести *явления устойчивости, выработанные к определенному паразиту.* Например, проращивание семян пшеницы в экстрактах гриба Helminthosporiuin sativum создает устойчивость растения к этому микроорганизму. К неспецифической резистентности относятся *явления устойчивости, создаваемые путем обработки семян химическими веществами или введением химикатов в растительный организм, путем внекорневой подкормки (опрыскивание растений) или внесением химических веществ в почву.*

Меры профилактики заключаются в дезинфекции семян и посадочного материала, дезинфекции почвы, опрыскивании растений химическими веществами, уничтожении растительных остатков, переносчиков возбудителей, удалении больных растений и изоляции здоровых. Борьба с уже развившимися болезнями растений может быть 'подразделена на следующие категории:

1. карантинные мероприятия, обеспечивающие охрану территории от завоза из других стран возбудителей болезней растений и

осуществляемых специально организованной государственной службой карантина растений;

2. физико-химические и биологические меры защиты, когда удаляют больные растения, изолируют здоровые, обрезают и удаляют больные части растений, уничтожают промежуточных хозяев и переносчиков болезней, собирают и уничтожают плодовые тела грибов, собирают и сжигают опавшие листья (хвою), дезинфицируют почву, производят лечение ран, обеззараживание семян, опрыскивание и опыление фунгицидами, вводят лечебные составы, используют миколитические бактерии или грибы-паразиты второго порядка, антибиотики (в том числе фитонциды) и др.

Из всех мер защиты, перечисленных во второй категории, заслуживают особого упоминания миколитические бактерии и грибы-паразиты второго порядка, потому что они достаточно многочисленны и с определенным успехом могут использоваться для борьбы с грибами - возбудителями болезней растений и с вредными насекомыми (табл. 2 и 3*)*. Грибницы почвенных и других грибов могут разрушаться рядом бактерий, названных миколитическими. Они относятся к роду Pseudomonas, а также к порядку Actinomycetales.

Таблица №2

Некоторые грибы, паразитирующие на грибах

Название		Систематическое положение гриба-паразита
Гриба-хозяина	Гриба-паразита	
1. Armillaria mellea	Endomyces decipiens	Ascomycetes
2. Boletus	Hypomyces	Ascomycetes
3. Cronatium ribocola	Tuberculina maxima	Fungi imperfecti
4. Erysiphe	Cicinnobolus cesatii	Fungi imperfecti
5. Formes	Hypocrea, Hypomyce	Ascomycetes
6. Polyporus	Hypocrea, Hypomyce	Ascomycetes

Таблица № 3

Некоторые грибы, паразитирующие на вредных насекомых

Название		Систематическое положение гриба-паразита
Гриба-хозяина	Поражаемого насекомого	
1. Beauveria bassiana	Шелковичный червь, яблочная плодоножка, колорадский жук	Fungi imperfecti
2. Botrydis tenella	Майский жук	Fungi imperfecti
3. Cordiceps militaris	Чешуекрылые	Ascomycetes
4. Entomophthora	Яблонная медянка	Phyccomycetes
5. Nestria diploa	Щитовки	Ascomycetes

Разработка методов применения грибов-паразитов второго порядка, в различных климатических условиях, может создать перспективу более интенсивного использования этой группы организмов, как средства биологической борьбы с грибами - возбудителями болезней растений, в том числе лекарственных.

МИКРОФЛОРА РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ

Лекарственное растительное сырье может обсеменяться микробами на всех этапах заготовки (сбор, первичная обработка, сушка, измельчение, упаковка) и хранения. В аптечных условиях растительное сырье сохраняется, как правило, в измельченном виде, а это значительно увеличивает поверхность материала, и, следовательно, опасность его отсыревания, порчи. При хранении сырья важно соблюдение санитарного режима в аптеках. Неблагоприятное действие оказывают: влажность, пыль, насекомые и другие факторы, повышающие микробное обсеменение и приводящие к порче лекарственного сырья. Внешними проявлениями микробной порчи растительного сырья являются изменение цвета и консистенции, загнивание, плесневение всего растения или его частей. Гниение растительных материалов сопровождается определенным чередованием микрофлоры, (грибы — бактерии), что зависит от

качества и глубины расщепления веществ, от pH среды и других причин и использование такого недоброкачественного сырья становится бесполезным.

Недоброкачественное сырье не только бесполезно, но и вредно больному человеку, так как при этом резко снижается содержание или полностью исчезают фармакологически активные вещества, сырье не оказывает необходимого влияния на патологический процесс, а имеющиеся микроорганизмы и продукты их обмена могут ухудшить его состояние.

Применительно к различным лекарственным растениям, видовой состав микроорганизмов будет разным. Это зависит от структуры и количества действующих начал, а также других веществ, подвергающихся ферментативному расщеплению в условиях хранения.

Чаще всего портятся плоды, ягоды и корневища, богатые сахаристыми веществами. Более устойчивыми оказываются сухие листья, корни, кора.

Состав микроорганизмов зависит от вида лекарственного сырья, его структуры и фармакологических свойств. Преобладают грибы (*Mucor, Rhizopus, Peniciliiurn, Aspergillus, Fusarium, Accharomyces, Candida, Aureobasidium, Alternaria, Actinomyces,* иногда — *Sporotrichum* и др), актиномицеты, спорообразующие виды бактерий (*B. subtillis, B. mesatherium*) а также неспоровые (*Chromobacterium aurcmtiaciim, Phylomonas* и др).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКРСТВЕННОГО СЫРЬЯ

Приготовление смывов: в асептических условиях (в стерильной чашке Петри, обожженными ножницами и пинцетом) из листа или верхнего слоя корневища вырезают кусочек площадью 1 $см^2$ или берут 1 г лекарственного сырья, которые помещают в пробирку с 10 мл стерильного физиологического раствора и взбалтывают в течение 5 мин. Из полученного смыва готовят четыре десятикратных разведения (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000), для посева используют два последних разведения в связи с большой обсемененностью растительного сырья.

Определение микробной обсемененности: в стерильную чашку Петри вносят 1 мл смыва, после чего в нее наливают 15 мл расплавленного и остуженного до 45^0С МПА, перемешивают и после застывания агара посевы инкубируют при 37^0С 24-48 ч. Производят подсчет выросших колоний на поверхности и в глубине агара. Полученное число колоний следует умножать на степень разведения.

Выявление обсемененности растительного лекарственного сырья дрожжевыми и плесневыми грибами: для выявления дрожжевых и плесневых грибов смыв из растительного лекарственного сырья по 0,5 мл засевают газоном на поверхность двух чашек Петри с твердой средой Сабуро. Посевы инкубируют при температуре 20 – 22°С 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. Увеличивая полученный результат в 2 раза, определяют количество дрожжевых и плесневых грибов в 1 г или 1 $см^2$ исходного сырья.

Допускается содержание в 1 г или 1 $см^2$ лекарственного сырья не более 10000 микроорганизмов, их них до 1000 грибов,

САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И АПТЕК

САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АПТЕЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Одним из факторов окружающей среды, способным оказывать неблагоприятное воздействие на качество лекарств, изготовляемых в аптеках и на фармацевтических предприятиях, являются микроорганизмы.

Попадая в лекарственные формы, микроорганизмы начинают интенсивно размножаться. Обладая набором ферментных систем, микробы используют

действующие вещества лекарственного препарата, снижая при этом его лечебное действие, вплоть до полной инактивации, а в ряде случаев лекарство становится токсичным. Микробы являются основной причиной возникновения пирогенности у инъекционных растворов. Кроме того лекарства могут стать источником передачи болезнетворных микроорганизмов, попавших в него при изготовлении.

Порче микробами могут подвергаться большинство лекарственных форм. Наиболее уязвимыми в этом отношении являются отвары, настои, микстуры, различные водные растворы и растворы для инъекций.

Число видов микроорганизмов, выделенных из лекарств, определяется десятками, в том числе – стафилококки, стрептококки, сарцины, кишечная палочка, дрожжевые и плесневые грибы и др.

Микроорганизмы встречаются как в жидких лекарственных формах, так и в кристаллических субстанциях – тальк, крахмал, сахара и др.

Весьма энергично микроорганизмы разрушают лекарственное растительное сырьё. Так листья наперстянки, при порче фитопатогенными микроорганизмами, могут терять до 50% активных терапевтических веществ, листья ландыша – около 30%. Наибольшему разрушению микробами подвергаются части лекарственных растений, в которых имеются сахара – плоды, ягоды.

Кроме потери активности при развитии микробов в стерильных лекарственных препаратах может наступить такое явление как пирогенность. Пирогенная реакция организма человека, возникающая за счет убитых бактерий и продуктов их распада, содержащихся в лекарственном препарате, характеризуется повышением температуры тела, вазомоторными расстройствами, в тяжелых случаях – шоковым состоянием. Пирогенами являются бактериальные эндотоксины (преимущественно грамотрицательных бактерий). Пирогены проходят через бактериальные фильтры, устойчивы к нагреванию и другим факторам окружающей среды, не инактивируются

кипячением, для их уничтожения необходимо автоклавирование в течение 3 ч. Все растворы предназначенные для инъекций должны быть апирогенны.

Основными причинами пирогенности лекарственных форм являются:

1. загрязненная дистиллированная вода (неправильная эксплуатация дистиллятора или несвежая дистиллированная вода;
2. микроорганизмы, попавшие в лекарственные инъекционные растворы в результате небрежного отношения к асептике технологического процесса и аптечных помещений;
3. микроорганизмы, успевшие размножиться в лекарственном препарате, если время между окончанием его приготовления и началом стерилизации было достаточно большим (более 1,5 ч).

Поэтому существуют специальные требования к изготовлению инъекционных растворов:

1. растворы, изготовляемые для инъекций, перед стерилизацией должны содержать не более 30 микробных клеток в 1 мл.

2. предназначенная для изготовления стерильных лекарственных форм дистиллированная вода не должна содержать кишечной палочки, а общее количество микроорганизмов не должно превышать 15 клеток в 1 мл.

В связи с этим, особую важность приобретает систематический санитарно-бактериологический контроль за санитарным режимом аптечных помещений и технологическим процессом изготовления лекарств в аптеках.

Контроль лекарственных препаратов производят в боксах со строгим соблюдением требований асептики.

Подготовка бокса к работе. Помещение бокса моют горячей водой с добавлением моющего средства и обрабатывают дезинфицирующим веществом, например 3% раствором перекиси водорода, 0,5% раствором цитазола, 5% раствором формалина с моющим порошком «Сульфанол». Затем в боксе включают бактерицидные лампы не менее чем за 2 ч до начала работы. Воздух в боксе должен регулярно проверяться на микробную загрязненность. Для этого чашки Петри с МПА и средой Сабуро оставляют открытыми на 15

мин, затем закрывают и инкубируют посевы на МПА при 37^{o} С 48 ч, на среде Сабуро при комнатной температуре 5 сут. Допустимым считается рост не более 5 колоний на чашке Петри с МПА, большее количество колоний является признаком загрязненности бокса. Плесневых и дрожжевых грибов не должно быть. Работа в боксе производится в специально предназначенных стерильных халатах и тапочках, которые стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при 120^{o}С.

Согласно методическим указаниям по микробиологическому контролю в аптеках объектами бактериологического контроля являются:

1. вода дистиллированная;
2. инъекционные растворы до стерилизации;
3. инъекционные растворы после стерилизации;
4. глазные капли после стерилизации;
5. глазные капли, приготовленные в асептических условиях на стерильных основах;
6. нестерильные лекарственные препараты;
7. аптечная посуда, резиновые пробки;
8. аптечный инвентарь, оборудование, руки и санитарная одежда персонала;
9. воздушная среда аптечных помещений.

Отбор проб для исследования производят сотрудники санитарно-эпидемиологического надзора, а при проведении исследований в аптеках лечебно-профилактических учреждений – работники бактериологических лабораторий не менее двух раз в квартал.

На фармацевтических заводах проводится бактериологический контроль каждой серии выпускаемой лекарственной формы работниками бактериологической лаборатории.

1. **Отбор проб лекарственных препаратов**

Пробы отбирают только из неповрежденных, укупоренных и упакованных согласно нормативно-технической документации упаковочных единиц.

При отборе проб необходимо учитывать свойства лекарственных средств, а также предохранять их от загрязнения.

При отборе проб ядовитых и наркотических лекарственных средств, следует руководствоваться правилами работы, предусмотренными соответствующими приказами, инструкциями и положениями, утвержденными Министерством Здравоохранения России.

Пробы дистиллированной воды (кроме дистиллированной воды, используемой для приготовления глазных капель на стерильной основе) отбирают в стерильные флаконы в количестве 300 $см^3$ из бюретки, конец которой предварительно обжигают спиртовым факелом. При неудовлетворительных анализах первичного контроля повторную пробу отбирают в количестве 500 $см^3$ непосредственно из приемника.

Пробы дистиллированной воды, используемой для приготовления глазных капель, отбирают в стерильные флаконы стерильными пипетками в количестве 15 – 20 $см^3$, непосредственно из емкостей в которых осуществляется стерилизация.

Инъекционные растворы (до стерилизации) в количестве не менее 3 единиц отбирают во время или после их приготовления, но не позднее 1,5 ч после приготовления и доставляют в лабораторию в тех же флаконах, в которых они будут подвергнуты стерилизации.

Инъекционные растворы, глазные капли после стерилизации и глазные капли, приготовленные на стерильной основе, доставляют в лабораторию в аптечной посуде в количестве не менее 3 единиц одной лекарственных формы.

Настои, отвары, другие жидкие нестерильные лекарственные формы в количестве не менее 3 единиц доставляют в лабораторию в тех же флаконах, в которых они отпускаются из аптеки.

Сухие лекарственные формы (таблетки, порошки) забирают для исследования в заводской или аптечной упаковках в количестве не менее 30г.

Отбор химических субстанций, применяемых для приготовления лекарственных препаратов, производят стерильными ложками в стерильную посуду лаборатории в количестве 30 – 50 г.

2. **Методика исследования**

При исследовании дистиллированной воды и аптечных лекарственных препаратов определяют общее микробное число (количество микроорганизмов в 1 $см^3$ воды) и количество дрожжевых и плесневых грибов в 1$см^3$ воды.

Для определения общего микробного числа по 1$см^3$ лекарственной формы или воды вносят в две стерильные чашки Петри и заливают 15 – 20 мл расплавленного и остуженного до температуры 45 - 50°С МПА. Посевы инкубируют 18 – 24 ч при температуре 37°С и 24 ч при комнатной температуре. После инкубации посевов подсчитывают число выросших колоний, как на поверхности, так и внутри питательной среды. Подсчёт колоний проводят обязательно с помощью лупы, т.к. колонии могут быть мелкими даже после 48-часовой инкубации.

При вычислении результатов определяют среднее арифметическое из суммарного числа колоний, выросших на чашках Петри.

Для выявления дрожжевых и плесневых грибов дистиллированную воду или лекарственный препарат по 0,5 $см^3$ засевают газоном на поверхность двух чашек Петри с твердой средой Сабуро. Посевы инкубируют при температуре 20 – 22°С 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. Увеличивая полученный результат в 2 раза, определяют количество дрожжевых и плесневых грибов в 1 $см^3$ лекарственной формы.

Результаты сравнивают с допустимой нормой и делают заключение о соответствии дистиллированной воды или лекарственного препарата санитарно-бактериологическим нормам.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВОДСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Стерильность лекарственных средств достигается соблюдением необходимых санитарно-гигиенических условий их изготовления и режима стерилизации.

Препараты, стерилизуемые в процессе их приготовления, исследуются на стерильность. С этой целью в стерильных лекарственных препаратах определяется наличие микроорганизмов, а также дрожжевых и плесневых грибов.

Количество испытуемого препарата для посева зависит от объема содержимого одной единицы лекарственной формы и регламентировано ГФ XI и представлено в таблице 4.

Таблица 4

Объем содержимого одной единицы препарата, мл	Объем лекарственного средства для посева, мл	Объем питательной среды, мл
Менее 1	1	10
1 – 4	1	10
5 – 19	2	20
20 – 100	2 - 4	20 – 40
Более 100	10	100

Во избежание неправильной оценки результатов анализа на стерильность, необходимо однократно определить наличие антимикробного действия лекарственного препарата. Для этого в 2 пробирки с тиогликолевой средой и в 2 пробирки с жидкой средой Сабуро добавляют соответствующее количество (табл. 4) испытуемого лекарственного препарата и в каждую пробирку вносят по 0,1 мл микробной взвеси тест-штамма, содержащего 1000 клеток в 1 мл. Посевы в тиогликолевой среде инкубируют при температуре от 30 до 35°С в течение 48 ч, а на среде Сабуро – при температуре от 20 до 25°С в течение 72 ч. Контролем служат пробирки с питательной средой, в которые вместо данного

лекарственного средства вносят аналогичное количество стерильной дистиллированной воды. В качестве тест-культуры микроорганизмов используют штаммы, рекомендованные ГФ-XI: Staphylococcus aureus ATCC 6538P; Bacillus subtilis ATCC 6633; Escherihia coli ATCC 25922; Candida albicans ATCC-885-653.

При отсутствии антимикробного действия исследуемого препарата в пробирках будет наблюдаться рост микроорганизмов тест-культур. При наличии антимикробного действия рост микроорганизмов будет отсутствовать.

Если исследуемый препарат характеризуется антимикробным действием, то для его нейтрализации используют инактиваторы, например: пенициллиназу для пенициллинов и цефалоспоринов, пара-аминобензойную кислоту для сульфаниламидов и др. При отсутствии инактиватора возможно увеличение разведения препарата в питательной среде, для этого берут 1 мл испытуемой лекарственной формы и увеличивают объем питательной среды до 250 мл.

Для определения стерильности применяют метод прямого посева исследуемого лекарственного препарата на питательные среды.

Для выявления бактерий посев лекарственного препарата проводят на тиогликолевую среду, для определения грибов на жидкую среду Сабуро в объемах, указанных в таблице 4.

При исследовании мазей и растворов лекарственных средств в маслах отбирают асептически по 0,1 г (мл) от каждой единицы отобранной для исследования лекарственной формы и вносят в стерильную колбу, содержащую стерильные стеклянные бусы, 100 мл 1 мол. фосфатного буферного раствора (pH 6,8-7,0) и эмульгатор. Выбор эмульгатора и его количество зависят от природы мази и растворов лекарственных средств в маслах. Наиболее что применяют твин-80 в концентрации до 2,5 %, не оказывающий антимикробного действия. При испытании мазей, легко эмульгируемых в воде, эмульгатор в буферный раствор не вносят. Содержимое колбы подогревают до температуры $40^{o}C$ и встряхивают не более 30 мин до получения однородной эмульсии. Полученную эмульсию в количестве по 5 мл засевают в колбу с 40 мл

тиогликолевой среды для выявления бактерий и в колбу с 40 мл жидкой среды Сабуро для выявления грибов.

Посевы на тиогликолевой среде инкубируют при температуре от 30 до 35°С 14 сут, а в среде Сабуро при температуре 20 – 25°С тоже количество времени.

При определении стерильности лекарственных средств, обладающих выраженным антимикробным действием, лекарственных средств, разлитых в емкости более 100 мл, а также при испытании мазей и растворов в маслах предпочтительнее использовать **метод мембранной фильтрации**. Для этого от каждой серии, независимо от ее объема, отбирают 30 емкостей, которые делят на 3 группы по 10 емкостей. Емкости 2 групп (20 штук) используют для испытания на стерильность, третьей группы (10 штук) – для контроля полноты отмывания мембраны от лекарственного средства. Исследование проводят с использованием фильтрационной установки, включающей фильтродержатель, соединенный с колбой приемником. На фильтродержатель помещают мембрану с размером пор 0,45 + 0,02 мкм.

Допускается использование аппарата, представляющего стерильную замкнутую систему и работающую по принципу фильтрации растворов. Фильтрационную установку в собранном виде стерилизуют в автоклаве при 121+1^{o}С. Стерилизацию можно осуществлять и другим методом, обеспечивающим сохранность рабочих характеристик мембран, а также стерильность установки (ионизирующее излучение, окись этилена и др.).

Испытуемое лекарственное средство при необходимости растворяют или суспендируют в растворителе не подавляющем рост микроорганизмов, например, растворе натрия хлорида 0,9%. Растворитель перед использованием необходимо профильтровать через мембраны с порами размером 0,45+0,02 мкм. Фильтрование отобранных образцов проводят в асептических условиях под вакуумом при скорости протекания воды 55-75 мл в 1 мин. При испытании лекарственных средств с антимикробным действием или содержащих консервант после окончания фильтрации мембрану необходимо промыть 3-5

порциями по 100 мл соответствующего растворителя. После отмывания мембраны ее извлекают, разрезают стерильными ножницами пополам и одну половину помещают в колбу со 100 мл тиогликолевой среды, вторую – в колбу со 100 мл среды Сабуро. Посевы на тиогликолевой среде инкубируют при температуре от 30 до 35°С 14 сут, а в среде Сабуро при температуре 20 – 25°С тоже количество времени. При испытании мазей и растворов лекарственных средств в маслах от каждой из 20 емкостей отбирают по 100 мг препарата в колбу со 100 мл растворителя (изопропилмиристат и др), который предварительно подогревают до 45^{o}С . Встряхивают и фильтруют через мембраны с размером пор 0,22+0,02мкм измерения. После фильтрации образца мембрану промывают 2 порциями по 200 мл жидкости (пептон - 5 г, твин -80 - 10 г, воды дистиллированной до 1000 мл, pH после стерилизации 7,1+0,2). После отмывания мембраны ее извлекают, разрезают стерильными ножницами пополам и одну половину помещают в колбу со 100мл тиогликолевой среды, вторую – в колбу со 100 мл среды Сабуро. Посевы на тиогликолевой среде инкубируют при температуре от 30 до 35°С 14 сут, а в среде Сабуро при температуре 20 – 25°С тоже количество времени. При испытании лекарственных средств, имеющих вязкую консистенцию или медленно фильтрующихся суспензий, необходимо предварительно добавить растворитель, указанный в частной статье, для увеличения скорости фильтрации.

Контроль полноты отмывания фильтра (третья группа емкостей) проводят следующим образом: после фильтрации и отмывания мембраны ее извлекают , разрезают стерильными ножницами пополам и одну половину помещают в колбу со 100 мл тиогликолевой среды и суточной культуры золотистого стафилококка АТСС 6538 Р из расчета 100 микробных клеток на весь объем среды, вторую – в колбу со 100 мл среды Сабуро и 48 часовой культурой Candida albicans АТСС 885-653 из расчета 100 микробных тел на весь объем питательной среды. . Посевы на тиогликолевой среде инкубируют при температуре от 30 до 35°С48-72 ч, а в среде Сабуро при температуре 20 –

25°С тоже количество времени. Наличие роста тест культур микробов свидетельствуют о достаточной полноте отмывания мембран от антимикробного лекарственного средства.

Учет и интерпретация результатов.

Посевы просматривают в рассеянном свете ежедневно и по окончании времени инкубации делают окончательное заключение. Наличие роста бактерий и грибов в питательных средах оценивают визуально по появлению мутности, осадка, поверхностно расположенной пленки, пристеночного роста и другим макроскопическим изменениям. При изменении питательной среды наличие в ней микроорганизмов необходимо подтвердить микроскопированием мазков, приготовленных из посевов и окрашенных по Граму.

Препарат считают стерильным при отсутствии роста бактерий и грибов, т.е. если в среде отсутствуют видимые изменения.

При обнаружении роста испытание повторяют на таком же количестве образцов, как и в первый раз.

При отсутствии роста микроорганизмов при повторном посеве препарат считают удовлетворяющим требованию испытания на стерильность. В случае роста микроорганизмов при повторном посеве, морфологически сходных с микроорганизмами, выявленными в первичном посеве, испытуемый препарат считают нестерильным.

Если при повторном посеве наблюдается рост микроорганизмов, отличающихся по морфологии от первоначально выделенных, испытание повторяют в третий раз на удвоенном количестве образцов. При отсутствии роста микроорганизмов в третьем испытании препарат считают удовлетворяющим требованиям на стерильность. При наличии роста микроорганизмов хотя бы в одной пробе в третьем испытании препарат считают нестерильным.

Состав питательных сред

Для контроля стерильности применяют «Сухую питательную среду для контроля стерильности» и жидкую среду Сабуро.

Вместо коммерческой среды можно использовать тиогликолевую среду индивидуального приготовления, имеющую следующий состав:

Панкреатического гидролизата казеина	15,0 г
Дрожжевого экстракта 10%	5,0 г
Натрия хлорида	2,5 г
Глюкозы	5,0 г
Цистина	0,75 г
Тиогликолевой кислоты	0,3 мл
Раствора резазурина натрия 1:1000	1,0 мл
Агара	0,75 г
Воды дистиллированной	До 1000 мл

pH после стерилизации 7,0 ± 0,2

Тиогликолевая среда пригодна к употреблению в течение 14 дней со дня приготовления и хранить её необходимо при температуре от 10 до 25°С в защищенном от света месте. Если при хранении среды, содержащей резазурин, её верхний слой (более 1/3 объема) окрасится в розовый цвет, среду можно регенерировать нагреванием на кипящей водяной бане в течение 10 – 15 мин до исчезновения розовой окраски с последующим быстрым охлаждением. В случае если окраска не исчезает после нагревания, среду считают непригодной к употреблению. Регенерацию среды можно проводить только один раз.

Жидкая среда Сабуро:

Пептона ферментативного	10 г
Глюкозы	40 г
Воды дистиллированной	До 1000 мл

pH после стерилизации 5,6 ± 0,2.

Тиогликолевую среду и среду Сабуро стерилизуют насыщенным паром при избыточном давлении в автоклаве 0,11 ± 0,02 МПа (1,1 ± 0,2 кгс/см^2) при температуре 121 ± 1°С в течение 15 мин.

Требования к ростовым качествам питательных сред

Тиогликолевая среда и среда Сабуро должны обеспечивать визуально обнаруживаемый рост соответствующих тест-штаммов аэробных и анаэробных бактерий и грибов.

Питательные среды должны обеспечивать рост микроорганизмов при посеве их в количестве менее 100 жизнеспособных клеток: для тиогликолевой среды – не позднее 48 ч инкубации при температуре от 30 до 35°С и для среды Сабуро – не позднее 72 ч инкубации при температуре от 20 до 25°С.

Испытание на пирогенность

Испытание проводят на здоровых кроликах обоего пола, не альбиносах, массой 2-3,5 кг, содержащихся на полноценном рационе. Каждый кролик должен находится в отдельной клетке в помещении с постоянной температурой. В течение недели, предшествующей опыту, кролики не должны терять в весе. Взвешивание животных проводят не менее 3 раз через день. В течение 3 сут перед испытанием у каждого кролика измеряют температуру. Измерения проводят ежедневно утром до дачи корма при помощи ртутного медицинского или электротермомометра с точностью до 0,1 ^{o}. Датчик термометра вводят в прямую кишку на глубину 7-9см за внутренний сфинктер на время, необходимое для достижения максимальной температуры. Исходная температура должна быть 38,5-39,5^{o}. Животные с более низкой или более высокой температурой для испытания не пригодны. Кроме того, кроликов, впервые предназначенных для испытания лекарственных средств, проверяют на реактивность путем внутривенного введения 10 мл 0,9 % стерильного непирогенного раствора натрия хлорида. В случаях изменения температуры у кроликов более чем на ±0,4^{o} животные считаются непригодными для опыта.

Если нет других указаний в частной Фармакопейной статье для испытаний отбирают не менее 2-х флаконов или ампул от каждой серии, содержащей от 1000 до 10000 флаконов или ампул. При количестве в серии более 10000 флаконов или ампул отбирают 3 единицы препарата, при

количестве в серии менее 1000 единиц для анализа отбирают 1 флакон или ампулу. Содержимое отобранных флаконов или ампул смешивают и вводят в ушную вену 3 кроликам. Растворы испытуемых лекарственных средств подогретые до 37^{o} вводят в количествах предусмотренных соответствующими частными статьями. Лекарственное средство считаются непирогенными если сумма повышения температуры у 3 кроликов меньше или равна $1,4^{o}$. Если сумма превышает $2,2^{o}$, то препарат считают пирогенным. В случаях если сумма повышений температуры находится в пределах от 1,5 до $2,2^{o}$C испытания проводят повторно на 5 кроликах и препарат считается непирогенным если сумма повышения температуры у всех 8 кроликов не превышает $3,7^{o}$C. Если же сумма равна или превышает $3,8^{o}$C лекарственное средство считают пирогенным.

В частной фармакопейной статье могут быть указаны другие пределы отклонения температуры.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВОДСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ЧИСТОТУ

Лекарственные препараты, не стерилизуемые в процессе производства, могут быть обсеменены микроорганизмами и подлежат исследованию на микробиологическую чистоту.

Исследование лекарственных препаратов на микробиологическую чистоту проводится с целью определения количества жизнеспособных бактерий и грибов, а также выявления определенных видов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, наличие которых недопустимо в нестерильных лекарственных средствах.

Подготовка лекарственных средств на испытание

От каждой серии лекарственного средства (независимо от объема) отбирают пробу не менее 50 г (мл), состоящую из равных разовых проб, взятых как минимум из 10 разных упаковок.

Для антибиотиков, мазей и других мягких лекарственных форм отбирают от каждой серии пробу не менее 15 г, состоящую из разовых проб, взятых не менее чем из 10 разных упаковок. Для одного анализа используют образцы по 3 г для каждого раздела исследования.

В зависимости от физических свойств лекарственной формы образец для анализа готовят в виде раствора, суспензии или эмульсии:

- Твердые труднорастворимые лекарственные средства измельчают с помощью специального оборудования и суспендируют в фосфатном буферном растворе pH 7,0 в соотношении 1:10;
- Мягкие лекарственные формы, нерастворимые в воде, эмульгируют в фосфатном буферном растворе (1:10) с помощью стерильных стеклянных бус и минимального количества эмульгатора (например, твин-80), применяя механическое встряхивание и нагревание до 45°С в случаях необходимости.

ИССЛЕДОВАНИЕ СУХИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ИНЪЕКЦИОННЫХ РАСТВОРОВ

Исследование сухих лекарственных субстанций, используемых для приготовления инъекционных растворов и глазных капель, проводят в случаях неоднократных неудовлетворительных бактериологических анализов лекарственных препаратов и превышения норм предельно-допустимого содержания непатогенных микроорганизмов в них, при удовлетворительных анализах дистиллированной воды, а также при удовлетворительных анализах контроля аптечной посуды, пробок.

Определение общего числа бактерий

Испытание проводят двухслойным агаровым методом в чашках Петри.

Приготовленный образец в количестве по 1 мл вносят в каждую из двух пробирок с 4 мл расплавленного и остуженного до температуры от 45° до 50°С МПА. Быстро перемешивают и выливают в чашку Петри, содержащую 15 – 20 мл застывшего МПА. Покачиванием чашки Петри равномерно распределяют

верхний слой агара. После застывания среды чашки Петри переворачивают и инкубируют в течение 5 сут при 35°С.

Через 48 ч и окончательно через 5 сут подсчитывают число бактериальных колоний на двух чашках, находят среднее арифметическое значение и вычисляют число бактерий в 1 г (мл) лекарственного препарата. Полученный результат сравнивают с допустимой нормой и делают заключение.

Для получения достоверных результатов учитывают только те чашки, на которых выросло от 30 до 300 колоний. Если число колоний на чашках Петри превышает 300, делают ряд последовательных разведений образца и посев повторяют, выбирая разведение, наиболее соответствующее указанному выше уровню.

Определение дрожжевых и плесневых грибов

Исследование проводят двухслойным методом, описанным выше, используя твердую среду Сабуро. Посевы инкубируют в течение 5 сут при температуре от 20 до 25°С. Через 72 ч и окончательно через 5 сут подсчитывают общее число колоний дрожжевых и плесневых грибов на двух чашках Петри, находят среднее арифметическое значение. Таким образом определяют количество дрожжевых и плесневых грибов в 1 г (мл) лекарственного препарата.

Выявление микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, рода Proteus проводят только при подозрении наличия этих микроорганизмов в лекарственных формах.

Качественное определение условно-патогенных и патогенных микроорганизмов

1. Определение бактерий семейства Enterobacteriaceae (роды Escherichia, Salmonella, Shigella).

Посев лекарственных средств производят на среду Эндо и висмут-сульфитный агар. Идентификацию энтеробактерий осуществляют следующим образом: если в образце обнаружены грамотрицательные неспоровые палочки, дающие отрицательную реакцию на

цитохромоксидазу, ферментирующие глюкозу и восстанавливающие нитраты в нитриты, исследуемый препарат содержит бактерии семейства Enterobacteriaceae.

2. Определение патогенных стафилококков.

Определение патогенных стафилококков производят посевом препарата на желточно-солевой агар. На этой среде патогенные стафилококки вызывают лицитовителлазную реакцию, проявляющуюся в образовании вокруг колоний зоны помутнения с радужным венчиком по периферии. Выделенную чистую культуру исследуют на наличие фермента плазмокоагулазы.

3. Выявление Pseudomonas aeruginosa.

Осуществляют на среде с глицерином. Синегнойная палочка на этой среде образует зеленоватые флуоресцирующие колонии, выделяющие в среду сине-зеленый пигмент.

4. Выявление протея.

Для выявления протея производят посев исследуемого материала на скошенный агар методом Шукевича. После суточной инкубации с верхнего края агара делают мазки и при наличии в них грамотрицательных полиморфных бактерий делают заключение о выделении протея, при необходимости используют биохимическое и антигенное типирование.

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XI издания приняты следующие критерии оценки микробной обсемененности лекарственных средств (табл. 5)

Наличие условно-патогенных микроорганизмов в лекарственных препаратах недопустимо

Таблица 5

Нормативы предельно допустимого содержания
непатогенных микроорганизмов в лекарственных формах

Лекарственные средства	Содержание микроорганизмов в 1 г/мл
Инъекционные растворы перед стерилизацией, не позднее 1,5 ч после приготовления	Не более 30
Инъекционные растворы после стерилизации	Стерильны
Глазные капли, средства для новорожденных	Стерильны
Дистиллированная вода для приготовления стерильных растворов	Не более 15
Препараты для местного применения (на кожу, слизистую носа, гинекологические)	Не более 100, в том числе не более 10 грибов
Пероральные препараты	Не более 1000, в том числе не более 100 грибов
Препараты растительного происхождения	Не более 10000, в том числе не более 1000 грибов

.

.*ИССЛЕДОВАНИЕ АПТЕЧНОЙ ПОСУДЫ, ОБОРУДОВАНИЯ АПТЕК*

1. Флаконы для приготовления и розлива инъекционных растворов, глазных капель, нестерильных жидких лекарственных препаратов отбирают в количестве 3 штук одного объема, укупоривают стерильными пробками и доставляют в лабораторию.

2. Резиновые пробки по 5 штук одинакового размера помещают в широкогорлые стерильные колбы или банки, закрытые ватно-марлевыми стерильными пробками и бумажными колпаками.

3. Фильтровальные воронки, мерные колбы, цилиндры в количестве не менее 3 единиц одного наименования контролируют путем последовательного ополаскивания 10 $см^3$ стерильной дистиллированной воды. Смывы помещают в стерильный флакон лаборатории и доставляют в лабораторию для исследования.

4. Пипетки (не менее 3 штук одного объема) последовательно прополаскивают не менее 5 раз каждую в 10 $см^3$ стерильной дистиллированной воды. Пробирки

со смывной жидкостью закрывают стерильными ватномарлевыми пробками и доставляют в лабораторию

5. В аптеках следующее оборудование подлежит исследованию методом смывов:

а) рабочие столы;

б) тара для хранения пробок;

в) водопроводный кран;

г).дистиллятор и другое оборудование.

Взятие смывов производится с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов, которые заготавливаются в лабораториях. В день взятия смывов в каждую пробирку с тампоном наливается по 2 мл стерильной водопроводной воды. Непосредственно перед взятием смывов тампоны увлажняются путем опускания его вниз. Смывы с крупного инвентаря берутся с площади 100 $см^2$. Для ограничения поверхности берется шаблон (трафарет), сделанный из проволоки. Трафарет должен иметь площадь 25 $см^2$, и чтоб взять смывы с площади 100 $см^2$ его накладывают 4 раза в разных местах исследуемого предмета. Трафареты, завернутые в бумагу, стерилизуются в лаборатории. Допускается стерилизация трафарета на месте отбора проб путем обжигания его спиртом или на горелке. Ограниченная трафаретом поверхность протирается тампоном во взаимно-перпендикулярных направлениях. После взятия смыва тампон вкладывается в ту же пробирку, на которой ставится порядковый номер. Описание пробы вносится в протокол забора проб.

При взятии смыва с мелких предметов протирается вся поверхность предмета.

6. При взятии смывов с халатов протирается 4 поверхности по 25 $см^2$: нижняя поверхность каждого рукава и 2 площади с верхней чти халата. При взятии смывов с полотенца протирается 4 площади по 25 $см^2$ в разных его учтках.

7. Для взятия смыва с рук аптечных работников тампоном протирают ладонные поверхности, пальцы, межпальцевые пространства, ногти, подногтевые пространства, проводя тампоном не менее 5 раз по каждому учтку обеих рук.

Подготовка проб к исследованию

А) *Смывы с аптечной посуды*

Три одноименных флакона, доставленные в лабораторию из аптеки, последовательно ополаскивают 10 $см^3$ стерильной дистиллированной воды.

В банку с доставленными в лабораторию пробками наливают 10 $см^3$ стерильной воды и тщательно споласкивают.

Со всей остальной аптечной посуды смывы готовят в аптеке и доставляют в лабораторию для исследования.

Б) *Смывы с аптечного оборудования, мягкого инвентаря, рук аптечных работников*

В пробирки с ватным тампоном и 2 $см^3$ стерильной дистиллированной воды добавляют 8 $см^3$ воды (всего в пробирке 10 $см^3$) и перемешивают путем перекатывания пробирки между ладонями в течение 3 мин.

В пробах определяют:

1. количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий;

2. наличие бактерий группы кишечной палочки.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий определяют в 10 $см^3$ смывной жидкости. Для этого по 1 $см^3$ смыва вносят в 2 стерильные чашки Петри и заливают 15 – 20 мл расплавленного и остуженного до температуры 45 - 50°С МПА. Содержимое чашек Петри перемешивают круговыми движениями и посевы инкубируют при температуре 37°С 18 – 24 ч и 24 ч при комнатной температуре. По истечении времени инкубирования посевов подсчитывают число выросших колоний, как на поверхности, так и внутри агара, используя лупу. Число колоний установленное в 1 $см^3$ смывной жидкости умножают на 10, что соответствует количеству микроорганизмов на всей смывной поверхности одноименных предметов.

Для определения наличия бактерий группы кишечной палочки оставшуюся смывную жидкость засевают в 1 $см^3$ концентрированной глюкозо-пептонной среды и инкубируют посевы при температуре 37°С 18 – 24 ч. Затем

из пробирок проводят пересев петлей на среду Эндо в чашках Петри. Через сутки инкубирования в термостате посевы просматривают. Отсутствие роста бактерий указывает на отрицательный результат.

При наличии на среде Эндо типичных для бактерий группы кишечной палочки колоний, из них делают мазки и окрашивают по Граму. И, если в мазках обнаруживаются грамотрицательные палочки, то подозрительные колонии засевают в пробирки с глюкозо-пептонной средой и инкубируют при температуре 43°С 18 – 24 ч. Газообразование в среде с глюкозой и типичные грамотрицательные палочки дают основание для окончательного положительного ответа о наличии E. coli в смывной жидкости.

Интерпретация результатов

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий не должно превышать 150 микроорганизмов в 10 $см^3$ смывной жидкости.

Бактерии группы кишечной палочки в аптечной посуде, смывах с оборудования и рук не допускаются.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА АПТЕЧНЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

Пробы воздуха отбирают в следующих помещениях аптеки:

1. асептический блок, стерилизационная;
2. ассистентская, фасовочная, материальная комнаты;
3. моечная;
4. зал обслуживания.

Отбор проб воздуха производят при соблюдении следующих условий:

А) чистое, подготовленное к работе помещение, не ранее 30 мин после влажной уборки;

Б) закрытые форточки, окна и двери;

В) уровень отбора проб воздуха соответствует высоте рабочего стола.

Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с помощью приборов для бактериологического анализа воздуха: прибор Кротова, ПОВ, ПАБ.

Скорость протяжения воздуха должна составлять 25 литров в минуту. Количество пропущенного через аппарат воздуха 100 л для определения общего количества бактерий, 250 л для определения дрожжевых и плесневых грибов, 250 л для определения золотистого стафилококка.

Исследование воздуха аптечных помещений проводится с целью определения:

1. общего количества бактерий;
2. наличия дрожжевых и плесневых грибов;
3. наличия золотистого стафилококка.

Для определения общего количества бактерий воздух засевают на МПА, грибов – на твердую среду Сабуро. Золотистый стафилококк выявляют на желточно-солевом агаре.

Чашки с посевами на МПА и желточно-солевом агаре доставляют в лабораторию и инкубируют при 37°С 18 – 24 ч. Посевы на желточно-солевом агаре дополнительно выдерживают 24 ч при комнатной температуре. Посевы на среде Сабуро инкубируют при температуре 22 - 24°С 4 сут.

Для определения общей бактериальной обсемененности через 24 ч посевы просматривают, подсчитывают количество выросших колоний и производят перерасчет на 1 $м^3$.

Для определения золотистого стафилококка через 48 ч просматривают посевы и подсчитывают колонии, подозрительные на золотистый стафилококк и проводят их идентификацию по морфологическим, тинкториальным, плазмокоагулирующим свойствам. Количество золотистого стафилококка определяют в $м^3$ воздуха.

Для определения количества дрожжевых и плесневых грибов выросшие колонии дрожжевых и плесневых грибов подсчитывают и делают перерасчет на 1 $м^3$ воздуха.

Таблица 6

Критерии оценки микробной обсемененности воздуха помещений аптек

Наименование помещений	Условия	Количество золотистого стафилококка в 1 $м^3$	Общее количество микроорганизмов в 1 $м^3$	Количество дрожжевых и плесневых грибов в 1 $м^3$
Асептический блок, стерилизационная	До работы	Не должно быть в 250 л	Не более 500	Не должно быть
	После работы	Не должно быть в 250 л	Не более 1000	Не должно быть
Ассистентская, фасовочная, дефектарная, материальная	До работы	Не должно быть в 250 л	Не более 750	Не должно быть
		Не должно быть в 250 л	Не выше 1000	Не должно быть
Моечная	Во время работы	Не должно быть в 250 л	Не выше 1000	До 12
Зал обслуживания	Во время работы	До 100	Не более 1500	До 20

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А.В., Быков А.С. и др. «Микробиология». – М., 2000.
2. Государственная фармакопея СССР/ XI издание (выпуск 2). – М. «Медицина», -1987.
3. Кочемасов З.Н., Ефремова С.Н., Набоков Ю.С. «Микробиология». – М., - 1984.
4. Поздеев О.К. «Медицинская микробиология». – М., - 2002.
5. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. – Томск: изд. ТГУ. 2003.