

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**М.Р. Карпова, Л.С. Муштоватова, О.П. Бочкарева,
Е.В. Попова, И.Ф. Зверева, А.В. Грицута**

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

учебное пособие

Под ред. Л.С. Муштоватовой

**Томск
Издательство СибГМУ
2017**

УДК 615.21.3.076(0758)

ББК 52.81я73

М 545

Авторы:

М.Р. Карпова, Л.С. Муштоватова, О.П. Бочкарева, Е.В. Попова,
И.Ф. Зверева, А.В. Грицута

М 545 Методы микробиологического контроля лекарственных средств: учебное пособие / М.Р. Карпова, Л.С. Муштоватова, О.П. Бочкарева, Е.В. Попова, И.Ф. Зверева, А.В. Грицута; под ред. Л.С. Муштоватой. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2017. – 249 с.

В учебном пособии представлена характеристика чистых помещений фармацевтических производств, требования к их санитарному состоянию, а также методы микробиологического контроля объектов окружающей среды и лекарственных препаратов. Дана характеристика микрофлоры растений, лекарственного сырья и методы их исследования на микробную загрязненность. Приведены сведения, позволяющие овладеть практическими навыками выполнения санитарно-бактериологических методов исследования лекарственных препаратов, лекарственного сырья, оборудования, воздуха производственных помещений, представлены нормы допустимого количества микроорганизмов в объектах исследования.

Пособие предназначено для студентов фармацевтического факультета медицинского вуза.

УДК 615.21.3.076(0758)

ББК 52.81я73

Рецензент:

М.В. Чубик – к.м.н., доцент кафедры биотехнологии и органической химии ИФВТ ТПУ.

Утверждено и рекомендовано к печати методическим советом фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 11 марта 2017 г.).

© Карпова М.Р., Бочкарева О.П., Попова Е.В.,
Зверева И.Ф., Грицута А.В., 2017
© Издательство СибГМУ, 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	6
Глава 1. ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВУ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ КОНТРОЛЮ САНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПОМЕЩЕНИЙ	7
1.1. Общие положения.....	7
1.2. Здания, помещения, производственные линии и оборудование.....	8
1.3. Производство стерильных лекарственных препаратов.....	12
1.4. Классификация и организация помещений для производства нестерильных лекарственных средств.....	13
Глава 2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРЕДПРИЯТИИ. ПРАВИЛА РАБОТЫ	20
2.1. Общие положения.....	20
2.2. Организация и оборудование лаборатории.....	23
2.3. Правила работы и техника безопасности.....	25
Глава 3. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ	31
3.1. Классификация питательных сред.....	31
3.2. Требования к ростовым качествам питательных сред....	34
3.3. Контроль ростовых качеств питательных сред.....	36
3.4. Методика определения биологических (ростовых) свойств среды.....	38
3.5. Тест-культуры микроорганизмов, их применение.....	43
Глава 4. ЧИСТЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЯХ	48
4.1. Чистые помещения, классификация.....	48
4.2. Передаточные, воздушные шлюзы и ламинарные боксы.....	56
Глава 5. МИКРОФЛОРА ВОЗДУХА И МЕТОДЫ ЕЕ ИЗУЧЕНИЯ	66
5.1. Микрофлора воздуха помещений и возможные пути ее загрязнения.....	66

5.2. Методы микробиологического контроля воздуха и нормы допустимого количества микроорганизмов в помещениях различных классов чистоты.....	68
Глава 6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЯХ.....	75
6.1. Требования к санитарному состоянию чистых помещений.....	75
6.2. Микробиологический контроль оборудования чистых помещений.....	76
6.3. Микробиологический контроль технологической одежды и рук персонала.....	78
Глава 7. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВОДЫ ОЧИЩЕННОЙ И ВОДЫ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ.....	82
7.1. Характеристика и правила забора воды очищенной и воды для инъекций. Показатели микробиологического контроля.....	82
7.2. Методы микробиологического контроля и нормы допустимого количества микроорганизмов в воде очищенной и в воде для инъекций.....	85
Глава 8. КОНТРОЛЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ.....	90
8.1. Методы испытания стерильности.....	90
8.2. Исследование стерильности лекарственных средств....	93
8.3. Питательные среды, применяемые для контроля стерильности.....	101
8.4. Определение пирогенности в стерильных лекарственных препаратах и в воде для инъекций.....	107
8.5. Определение эндотоксинов в стерильных лекарственных препаратах и в воде для инъекций.....	109
Глава 9. КОНТРОЛЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ЧИСТОТУ.....	114
9.1. Требования к качеству лекарственных средств.....	114
9.2. Отбор образцов лекарственных средств.....	124
9.3. Методы количественного определения аэробных микроорганизмов.....	127
9.4. Определение отдельных видов микроорганизмов.....	133
9.5. Питательные среды, применяемые для контроля микробиологической чистоты.....	139

Глава 10. КОНТРОЛЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ.....	143
10.1. Определение антимикробного действия лекарственных средств.....	143
10.2. Способы устранения антимикробного действия лекарственных средств.....	145
Глава 11. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.....	150
11.1. Вакцины.....	150
11.2. Лечебно-профилактические сыворотки и иммуноглобулины.....	154
11.3. Интерфероны, бактериофаги, аллергены.....	157
Глава 12. МИКРОФЛОРА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ....	162
12.1. Характеристика микрофлоры растений.....	162
12.2. Нормальная микрофлора растений.....	163
12.3. Фитопатогенные микроорганизмы.....	171
12.4. Меры профилактики и борьбы с инфекционными заболеваниями растений.....	194
12.5. Микрофлора растительного лекарственного сырья.....	196
12.6. Определение микробной обсемененности растительного лекарственного сырья.....	198
Ответы на тестовые задания.....	201
Приложения.....	204
Приложение 1. Тест-штаммы, применяемые для контроля питательных сред.....	204
Приложение 2. Тест-микроорганизмы и условия инкубации для определения ростовых и селективных свойств питательных сред.....	245
Рекомендуемая литература.....	248

ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие разработано для проведения практических занятий по дисциплине «Методы микробиологического контроля лекарственных средств» у студентов очной и очно-заочной формы обучения фармацевтического факультета медицинских вузов.

В учебном пособии представлены современные методы микробиологического контроля различных медицинских препаратов, объектов окружающей среды, а также характеристика чистых помещений фармацевтических производств, требования к их санитарному состоянию. Отдельные подглавы посвящены особенностям производства и контроля стерильных и нестерильных лекарственных препаратов.

Выпускникам фармацевтических факультетов, занимающимся микробиологическим контролем на предприятиях важно знать принципы устройства микробиологической лаборатории на фармацевтическом предприятии, поэтому отдельная глава посвящена этому вопросу.

Приведены сведения, позволяющие овладеть практическими навыками выполнения санитарно-бактериологических методов исследования лекарственных препаратов, лекарственного сырья, оборудования, воздуха производственных помещений. Для этого подробно представлены питательные среды для микробиологического контроля и нормы допустимого количества микроорганизмов в объектах исследования. Дана характеристика микрофлоры растений микрофлоры растений, лекарственного сырья и методы их исследования на микробную загрязненность. Подробно представлена характеристика чистых помещений на фармацевтических предприятиях, требования к санитарному состоянию и микробиологический контроль в них. Отдельно описаны устройства передаточных, воздушных шлюзов и ламинарных боксов.

Особое внимание уделено методам микробиологического контроля иммунобиологических препаратов. Специальные подразделы посвящены контролю вакцин, лечебно-профилактических сывороток и иммуноглобулинов, интерферонов, бактериофагов и аллергенов.

Пособие содержит фактологический материал, организованный в таблицы. Каждая глава заканчивается тестами, что позволит контролировать усвоение представленного материала.

Глава 1

ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВУ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ КОНТРОЛЮ САНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

1.1. Общие положения

Лекарственные средства – это продукция, к которой предъявляются высокие требования по безопасности и эффективности в процессе их разработки, испытаний, производства и реализации.

Основные критерии к производству и контролю качества определяются международными «Правилами производства лекарственных средств» – «Good Manufacturing Practice for Medicinal Products (GMP)».

В РФ основополагающим документом, регламентирующим производство лекарственных средств является национальный стандарт ГОСТ Р 52249 и Государственная фармакопея Российской Федерации, определяющая показатели качества выпускаемых лекарственных субстанций и изготовленных из них препаратов.

Лекарственное сырье и готовые препараты могут обсеменяться микроорганизмами на различных этапах их технологического изготовления, а также при хранении. Микробиологическая контаминация продукта происходит через воду, нестерильную посуду, воздух производственных помещений, руки персонала и т. д.

Выявление загрязнения осуществляется в ходе микробиологического мониторинга. Данный вид контроля проводится как в чистых помещениях, так и в контролируемых зонах на производстве и в лабораториях. Программа мониторинга должна иметь статус обязательного к исполнению документа и содержать следующую информацию:

- план и описание помещений, точек проб отбора;
- установление критических точек (открытый продукт, частое вмешательство оператора и т. д.);
- периодичность и время взятия проб;
- ссылки на методики отбора проб, проведения испытаний, оценки результатов;
- установление ответственности за определенные операции;
- установление лимита тревоги (ЛТ) и лимита действия (ЛД).

Особенно важен мониторинг среды при производстве стерильных лекарств, в частности, препаратов, производимых в асептических условиях.

1.2. Здания, помещения, производственные линии и оборудование

Одним из ключевых принципов GMP является соответствие места расположения, проектирование, строительство и эксплуатация чистых помещений, оборудования и инженерных систем характеру выполняемых работ, так как это гарантирует очистку воздуха чистых помещений и защищает население от возможных вредных выбросов химической и биологической природы. В свою очередь, чистые помещения обеспечивают необходимую степень защиты производимых лекарственных препаратов от воздействия окружающей среды. Необходимое оборудование позволяет гарантировать качество препаратов, очистки и устранения остаточных загрязнений с поверхностей; исключается возможность загрязнения препарата продуктами разложения и элементами конструкций (частицы металла, уплотнений и т. п.). Инженерные системы обеспечивают соответствующее функционирование чистых помещений и оборудования, служат для подготовки воды, воздуха, сжатого воздуха и инертных газов, используемых в технологическом процессе.

Помещения. В процессе производства существует риск перекрестного загрязнения исходных материалов или продуктов в ходе неконтролируемого выделения пыли, газов, испарений, аэрозолей или микроорганизмов из материалов (продукции) и от остаточных загрязнений на оборудовании и одежде людей.

Для предотвращения перекрестного загрязнения необходимо осуществлять производство в специально выделенных зонах

(обязательное для пенициллинов, живых вакцин, бактериальных препаратов из живых микроорганизмов и некоторых других биологических препаратов) или разделять циклы производства во времени с соответствующей уборкой помещения и оборудования между циклами. Лица, не имеющие права допуска работы в этих помещениях, не допускаются в них.

В помещении не должно быть труднодоступных для очистки мест. Все открытые поверхности в чистых зонах должны быть гладкими, непроницаемыми, без трещин и изломов, что обеспечит возможность многократной обработки моющими и дезинфицирующими средствами. Для предотвращения попадания загрязнения из пространства подвесные потолки должны быть герметичными. Все чистые помещения должны быть максимально защищены от проникновения насекомых или животных.

В зонах, используемых для асептического производства, запрещается устанавливать канализационные трубы. В чистых помещениях более низких классов при удалении стоков следует предусматривать гидрозатворы для предотвращения обратного потока.

Количество помещений для переодевания, душевых и туалетов должно соответствовать численности персонала. Недопустим выход из туалета непосредственно в производственные и в складские помещения.

Помещения для переодевания должны обеспечивать физическое разделение различных этапов переодевания, чтобы свести к минимуму загрязнение технологической одежды частицами и микроорганизмами. Последняя часть помещения в оснащённом состоянии должна иметь тот же класс чистоты, что и зона, в которую она ведет. Устройства для мытья рук следует, как правило, устанавливать только в передней части комнаты для переодевания. Комнаты отдыха и приема пищи должны быть отделены от остальных помещений.

Воздушные потоки не должны представлять риска для загрязнения продукта. Необходимо организовать эффективную обработку и обтекание рециркулирующего воздуха контролируемой зоны. Соседние помещения различных типов должны иметь перепад давления воздуха 10–15 Па (рекомендуемое значение), чтобы воздух перемещался от более чистых к менее чистым смежным помещениям. При работе с патогенными,

высокотоксичными, радиоактивными материалами или живыми вирусами, бактериями могут потребоваться специальные способы подготовки воздуха и обеспечения перепада давления. Для некоторых операций может потребоваться деконтаминация оборудования и обработка удаляемого воздуха.

Необходимо предусмотреть систему аварийного оповещения об отказе системы подготовки воздуха и установить датчики перепада давления между зонами. Значения перепада давления регулярно фиксируются в специальном журнале.

В зонах складирования все поступающие материалы, готовая продукция обязаны пройти карантин и должны храниться отдельно (каждое наименование) до получения разрешения на использование или отгрузку в условиях хранения, установленных производителем. Все складские зоны должны быть аттестованы, иметь «валидацию условий хранения», которая подтвердит приемлемость поддержания заявляемых условий хранения.

Для отбора проб исходных материалов выделяется отдельная зона – конструкция, эксплуатация которой должна соответствовать заявленному классу чистоты производственных помещений. Например, если производство таблеток осуществляется в зонах класса D, то и складская зона отбора проб должна соответствовать классу D. Помещения для животных необходимо изолировать от остальных зон и организовать отдельную систему вентиляции и отдельный вход.

Оборудование. Оборудование и производственные линии должны использоваться строго по назначению. К основным производственным инженерным системам относятся: система подготовки воздуха для чистых помещений, системы подготовки воды очищенной и воды для инъекций, чистого пара, сжатого воздуха и инертных газов. На каждую систему должны быть разработаны инструкции по эксплуатации и обслуживанию, составлены программы и график производственно-профилактических работ. Все работы с критическим оборудованием (стерилизаторы, системы подготовки и фильтрации воздуха, воздушные и газовые фильтры, системы приготовления, хранения и распределения воды и пр.) и инженерными системами должны документально фиксироваться.

Конструкция, установка и расположение оборудования, мест соединения и зон обслуживания должны предусматривать воз-

возможность работы с оборудованием, его технического обслуживания и ремонта снаружи чистой зоны. Если при проведении технического обслуживания или ремонта оборудования чистой зоны, был нарушен уровень чистоты, то перед возобновлением производства следует выполнять соответствующую очистку, дезинфекцию и/или стерилизацию этого оборудования. Трубопроводы, воздуховоды и другое оборудование следует монтировать так, чтобы не было труднодоступных для очистки зон и поверхностей, а также негерметичных мест. При этом средства для мытья и чистки не должны быть источниками загрязнения.

Ленты конвейеров не должны пересекать зону А (В) и рабочую зону с меньшей чистотой воздуха. В противном случае, ленту необходимо непрерывно стерилизовать.

Конструкция, монтаж и техническое обслуживание систем водоподготовки и ее распределения должны обеспечивать получение воды требуемого качества. Нельзя эксплуатировать оборудование подготовки воды сверх проектной мощности. Трубопроводы для очищенной воды и воды для инъекций необходимо обрабатывать согласно инструкции, в которой указаны пределы микробной загрязненности и меры по ее устранению, если обнаружены превышения норм этого показателя.

Упаковочные линии, печатные машины для упаковки должны находиться в чистом состоянии и не содержать продукции или документов, относящихся к предшествующей работе. Очистка линии упаковки продукции должна выполняться по специальным инструкциям. Продукция различных видов не должна упаковываться в непосредственной близости друг от друга при отсутствии физического разделения зон. Все критическое оборудование подлежат аттестации и плановому техническому обслуживанию. Их повторный ввод в действие должен быть разрешен в установленном порядке.

После очистки и дезинфекции оборудования необходимо осуществлять контроль наличия остатков предыдущего продукта или моющих средств, маркировку этого оборудования с указанием статуса чистоты. В зависимости от статуса на каждой единице оборудования необходимо размещать этикетку «Очищено», «В работе» или «Подлежит очистке». Для наглядности рекомендуется использовать этикетки красного, желтого и зеленого цветов.

Очистка помещений, оборудования и систем разнообразна.

Различают разные виды очистки:

- 1) очистка при переходе на следующую серию одного и того же препарата;
- 2) очистка при переходе с препарата на препарат;
- 3) очистка при длительном простое производственного участка.

Все процедуры очистки и дезинфекции помещений, оборудования и систем должны в обязательном порядке фиксироваться, а применяемые моющие и дезинфицирующие средства должны быть официально одобрены. Неисправное оборудование следует удалять из производственного процесса и маркировать его соответствующим образом.

1.3. Производство стерильных лекарственных препаратов

К производству стерильных препаратов предъявляются особые требования, которые направлены на сведение к минимуму риска загрязнения микроорганизмами, пирогенами и взвешенными частицами конечного продукта. Особо загрязняющими веществами являются сенсibiliзирующие вещества, биологические препараты, содержащие живые микроорганизмы, цитотоксины, некоторые гормоны. Наиболее опасное загрязнение – это загрязнение инъекционных препаратов, а также препаратов, предназначенных для приема в больших дозах и/или в течение продолжительного времени.

Процессы производства стерильных лекарственных средств подразделяются на две категории:

- финишная стерилизация (т. е. стерилизация в герметичной первичной упаковке);
- процессы, осуществляемые в асептических условиях на одном или всех этапах производства.

Для производства стерильной продукции чистые помещения (зоны) классифицируются в соответствии с требованиями к производственной операции и требованиями к окружающей ее среде для сведения к минимуму риска загрязнения продукта или материалов микроорганизмами.

Чистые зоны при производстве стерильных лекарственных средств подразделяются на четыре типа:

А – зона для проведения операций, представляющих высокий риск для качества продукции, например зоны наполнения, укупорки, вскрытия ампул и флаконов, соединения частей оборудования в асептических условиях. В таких зонах обычно используется однонаправленный (ламинарный) поток воздуха, который контролируется и подтверждается при аттестации.

В – зона, непосредственно окружающая зону А, предназначена для асептического приготовления и наполнения;

С и **Д** – чистые зоны для выполнения менее ответственных стадий производства стерильной продукции.

Изолирование производственных помещений позволяет снизить риск микробного загрязнения продукции из окружающей среды. Изолятор предназначен для проведения операций с высоким риском для качества продукции. Допускается наличие рабочих зон внутри изолятора без ламинарного потока воздуха. Это помещение должно контролироваться и соответствовать зоне Д.

1.4. Классификация и организация помещений для производства нестерильных лекарственных средств

Производство нестерильных лекарственных средств, согласно ОСТ 42-510, должно осуществляться в помещениях классов чистоты «С» и «D» (см. табл. 1–6). При этом нормирование содержания механических частиц, в отличие от нормирования содержания жизнеспособных микроорганизмов в воздухе, не предусматривается.

Введены зоны категории «К». К ним относятся все остальные производственные помещения и участки со следующими фиксируемыми и контролируемыми параметрами техническими условиями:

- 1) кратность воздухообмена не ниже 5;
- 2) двухступенчатая очистка воздуха: 1 ступень – фильтры класса не ниже G4 (эффективность не менее 90 %); 2 ступень – фильтры класса F9 (эффективность не менее 95 %);
- 3) климатические параметры (температура, влажность) принимаются по технологическим требованиям;
- 4) помещения фасовки лекарственных трав и сборов, загрузки на экстракцию сухого лекарственного растительного сырья, получения жидких экстрактов (водных, водно-спиртовых,

спиртовых), а также антисептических средств (йодные растворы, бриллиантовая зелень, растворы перекиси и т. д.) должны быть отделены.

Таблица 1

Классы чистоты производственных помещений и участков при изготовлении порошков лекарственных средств

Класс чистоты	Название помещения, участка, операции	Максимально допустимое содержание микроорганизмов в 1 м³ воздуха, КОЕ
D	Помещение получения кристаллических продуктов (кристаллизация, фильтрация, промывка порошков) сушки и просева, подготовки материалов первичной упаковки (бидоны, банки, пакеты). Участок фасовки и первичной упаковки порошков.	500

Примечание: КОЕ (Колониеобразующие Единицы) – показатель, характеризующий микробиологическую «чистоту» или, напротив, степень бактериальной загрязненности. Оценивается по числу живых микроорганизмов, содержащихся в определенных объемах исследуемых проб по проросшим единичным колониям на плотных питательных средах.

Таблица 2

Классы чистоты производственных помещений и участков при изготовлении твердых лекарственных форм

Класс чистоты	Название помещения, участка, операции	Максимально допустимое содержание микроорганизмов в 1 м³ воздуха, КОЕ
C	Помещение получения пустых желатиновых капсул на автоматических линиях.	100

D	<p>Помещения подготовки материалов первичной упаковки, приготовления растворов для грануляции (сахарный сироп, крахмальный клейстер, водно-спиртовые и другие растворы), операции смешивания лекарственных и вспомогательных веществ, влажной грануляции и сушки гранулята, участок таблетирования, наполнения желатиновых капсул, полировки и отбраковки наполненных капсул, покрытие таблеток оболочками. Помещение вскрытия упаковок порошками лекарственных веществ, измельчения и просеивания, приготовления дезинфицирующих растворов, фасовки и первичной упаковки ГЛС.</p>	500
---	--	-----

Таблица 3

Классы чистоты производственных помещений и участков при изготовлении мягких лекарственных форм

Класс чистоты	Название помещения, участка, операции	Максимально допустимое содержание микроорганизмов в 1 м ³ воздуха, КОЕ
D	<p>Помещения подготовки материалов первичной упаковки, приготовления мягких лекарственных форм (концентратов, мазевой и свечной основ, водных растворов лекарственных веществ для гелей и эмульсионных мазей, эмульгирования, гомогенизации и др.)</p> <p>Участки вскрытия упаковок с лекарственными и вспомогательными веществами, отвешивания компонентов, расплавление и фильтрация, приготовления эмульгатора, приготовления дезинфицирующих растворов, фасовки и первичной упаковки мягких лекарственных форм (в тубы банки, пленки из полимерных материалов и др.).</p>	500

Таблица 4

Классы чистоты производственных помещений и участков при изготовлении жидких лекарственных форм

Класс чистоты	Название помещения, участка, операции	Максимально допустимое содержание микроорганизмов в 1 м ³ воздуха, КОЕ
D	Помещения подготовки материалов первичной упаковки, получение сиропа. Помещения вскрытия упаковок с лекарственными и вспомогательными веществами, измельчения и просеивания (для суспензий) и т. д., приготовления дезинфицирующих растворов, тонкой фильтрации перед розливом, фасовкой (розлив) и первичной упаковкой жидких лекарственных форм.	500

Таблица 5

Классы чистоты производственных помещений и участков при изготовлении аэрозольных лекарственных форм

Класс чистоты	Название помещения, участка, операции	Максимально допустимое содержание микроорганизмов в 1 м ³ воздуха, КОЕ
D	Помещения подготовки материалов первичной упаковки (аэрозольных баллонов), приготовления растворов для заполнения аэрозольных баллонов. Помещения вскрытия упаковок с лекарственными и вспомогательными веществами, приготовления дезинфицирующих растворов, фасовки (наполнение аэрозольных баллонов растворами, пропелентом) укупорки, насадки распылительных колпачков и упаковки баллонов.	500

Классы чистоты лабораторных помещений и зон

Класс чистоты	Название помещения, участка, операции	Максимально допустимое содержание микроорганизмов в 1 м ³ воздуха, КОЕ
А	Зона посева.	менее 1
D	Помещение посевов в микробиологической лаборатории.	500
D	Экспресс-лаборатория (в комплексе «чистых» производственных помещений).	500

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один или несколько правильных ответов.

1. ОСНОВНЫМ ДОКУМЕНТОМ, РЕГЛАМЕНТИРУЮЩИМ ПРОИЗВОДСТВО ЛЕКАРСТВ В РФ, ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) Административный регламент Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по организации проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности лекарственных средств
- 2) ГОСТ Р 52249 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств»
- 3) МУ 44-116 «Асептическое производство медицинских иммунологических препаратов»
- 4) Федеральный закон РФ № 61 «Об обращении лекарственных средств»

2. ВОЗМОЖНЫМИ ПУТЯМИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ КОНТАМИНАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ГОТОВЫХ ПРЕПАРАТОВ МОГУТ БЫТЬ

- 1) вода
- 2) нестерильная посуда
- 3) воздух производственных помещений
- 4) руки персонала

3. В СПЕЦИАЛЬНО ВЫДЕЛЕННЫХ ЗОНАХ СТРОГО ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ ПРОИЗВОДСТВО

- 1) растворов для инъекций
- 2) глазных капель
- 3) бактериальных препаратов
- 4) экстрактов лекарственных трав

4. В ОТДЕЛЬНО ВЗЯТЫХ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПОМЕЩЕНИЯХ ИМЕЮТ ПРАВО НАХОДИТЬСЯ

- 1) уборщики помещений
- 2) технологический персонал
- 3) руководство производства
- 4) лица, имеющие право допуска в эти помещения

5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПРОИЗВОДСТВА ПОЗВОЛЯЕТ

- 1) вовремя выявить возможные микробиологические загрязнения при производстве
- 2) выявить патогенные микроорганизмы у технологического персонала
- 3) повысить эффективность производства лекарственных средств
- 4) выявить нарушителей производственной дисциплины

6. ПЕРЕПАД ДАВЛЕНИЯ (10–15 Па) РЕЦИРКУЛИРУЮЩЕГО ВОЗДУХА В СМЕЖНЫХ ПОМЕЩЕНИЯХ НЕОБХОДИМ ДЛЯ

- 1) обеспечения необходимой влажности производственного воздуха
- 2) соблюдения оптимального температурного режима в рабочей зоне
- 3) эффективной циркуляции воздуха из более чистого помещения в менее чистое
- 4) эффективной фильтрации воздуха в данных помещениях

7. ВАЛИДАЦИЯ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ ПОДРАЗУМЕВАЕТ

- 1) соблюдение карантина поступающего сырья
- 2) аттестацию складских зон
- 3) соблюдение температурного режима условий хранения
- 4) строгий пропускной режим в складские помещения

8. К ОСНОВНЫМ ПРОИЗВОДСТВЕННЫМ ИНЖЕНЕРНЫМ СИСТЕМАМ ОТНОСЯТСЯ

- 1) система подготовки воздуха для чистых помещений
- 2) системы подготовки воды очищенной и воды для инъекций
- 3) системы подготовки чистого пара, сжатого воздуха и инертных газов
- 4) линии упаковки продукции

9. ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ ЗОНА ТИПА В ПРЕДНАЗНАЧЕНА ДЛЯ

- 1) проведения операций, представляющих высокий риск для качества продукции
- 2) асептического приготовления и наполнения
- 3) операций с материалами после мойки
- 4) приготовления растворов и подготовки первичной упаковки, материалов и др. для последующего наполнения

10. ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ВВЕДЕНА ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ КАТЕГОРИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

- 1) А
- 2) С
- 3) К
- 4) F

Глава 2

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРЕДПРИЯТИИ. ПРАВИЛА РАБОТЫ

2.1. Общие положения

Неотъемлемой составляющей системы обеспечения качества являются: контроль санитарно-гигиенического состояния производства, основного и вспомогательного сырья, производственного процесса и готовой продукции, которые проводятся в соответствии с программой производственного контроля.

Программа производственного контроля – документ предприятия-изготовителя, определяющий порядок и периодичность контроля санитарно-гигиенического состояния производства лекарственных средств, сырья, производственного процесса и готового продукта. Программа разрабатывается ответственными лицами предприятия, утверждается руководителем предприятия-изготовителя. Ответственность за разработку программы производственного контроля и ее выполнение несет руководитель производственной микробиологической лаборатории.

Производственный контроль проводится в производственных лабораториях, имеющих разрешение на работу, выданное федеральными органами исполнительной власти в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

В соответствии с Федеральным законом Российской Федерации от 8.08.2001 № 128 «О лицензировании отдельных видов деятельности», производственные лаборатории, осуществляющие работы с санитарно-показательными микроорганизмами, должны иметь лицензию на деятельность, связанную с использованием возбудителей инфекционных заболеваний IV группы патогенности.

Порядок лицензирования определен постановлением Правительства России от 4.07.2002 № 501 «Положение о лицензировании деятельности, связанной с использованием возбудителей инфекционных заболеваний».

Значительную часть требований к качеству фармацевтической продукции и к условиям производства контролирует микробиолог: стерильность, микробное обсеменение сырья и нестерильных лекарственных средств, соблюдение правил производственной гигиены, предусмотренных GMP. Микробиологическая лаборатория обеспечивает контроль качества, осуществляя микробиологический мониторинг всех этапов производственного процесса:

- входной контроль сырья,
- контроль хранения и упаковки,
- контроль процесса производства,
- контроль готового продукта (приемо-сдаточный контроль),
- контроль утилизации.

Обязательным пунктом в микробиологическом мониторинге является контроль и оценка микробиологического состояния производственной среды (рис. 1). Основной микробиологический мониторинг включает отслеживание контаминации:

- воздуха – активным методом (при помощи прибора) и пассивным (седиментационный метод);
- оборудования чистых помещений – метод отпечатков на агаровую среду, метод взятия мазков с поверхности;
- работников – метод отпечатков;
- упаковочного материала;
- химических субстанций, применяемых для производства лекарственных препаратов;
- лекарственного растительного сырья;
- воды очищенной и воды инъекционной;
- готовых лекарственных препаратов.

Во всех случаях речь идет о культивационных методах на агаровой среде с подсчетом количества колоний.

На асептических производствах также контролируется:

- стерильность первичной упаковки;
- микробиологическая нагрузка инъекционного препарата перед фильтрацией;
- стерильность дезсредств;

- эффективность методов стерилизации;
- описание мер, которые должны быть приняты при превышении лимитов.

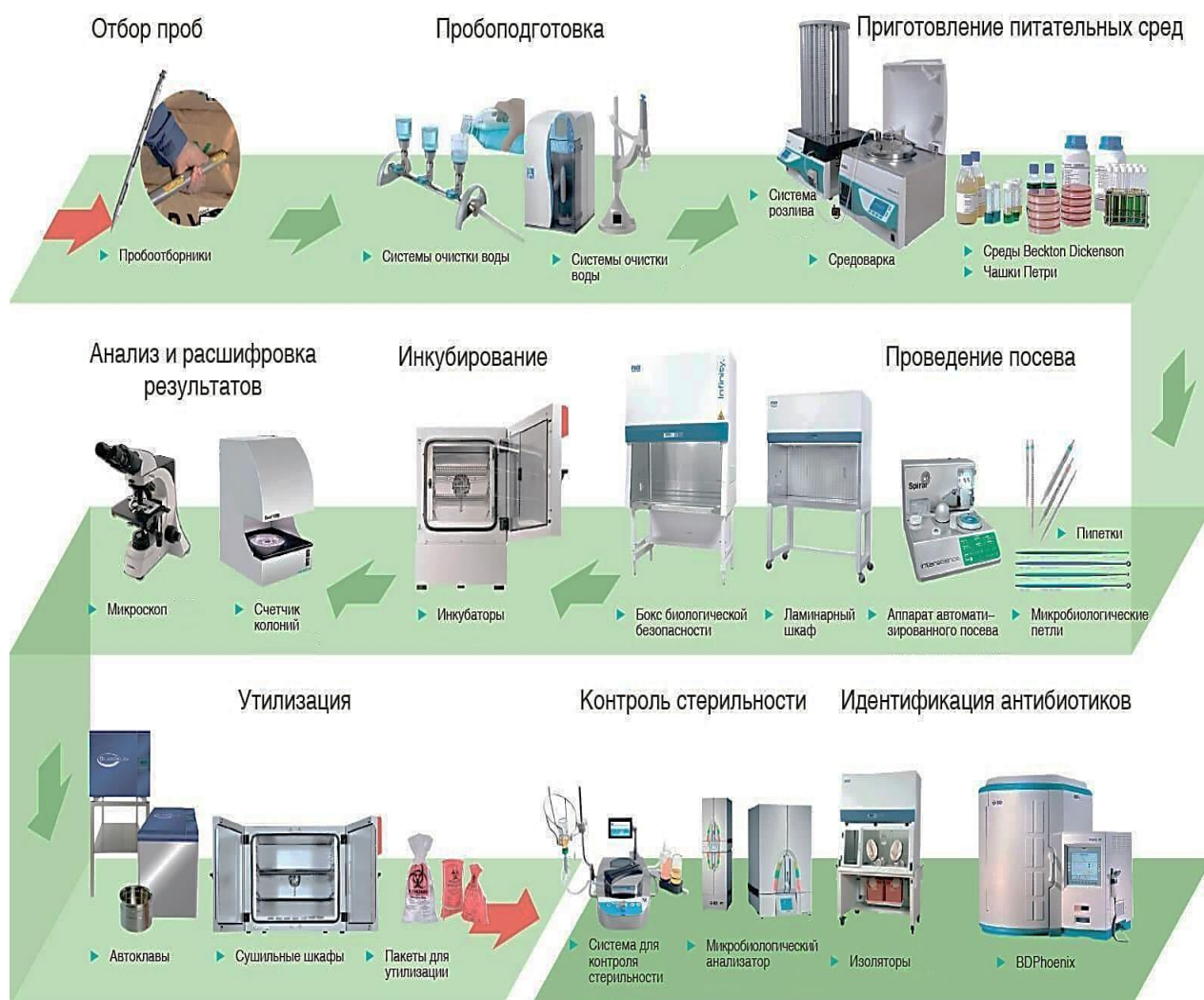


Рис. 1. Этапы производственного контроля

При определении стратегии контроля по каждому объекту необходимо выбрать критические точки и параметры контроля, объем испытаний, которые позволили бы обеспечить качество выпускаемой продукции. В большинстве случаев используется три схемы организации контроля качества – усиленный, нормальный и ослабленный контроль. Например, если есть точная информация о поставщике, об уровне его производства и накопленном опыте работы, имеющих знания для внутрипроизводственного контроля, результатам рассмотрения ежегодного обзора качества, то можно ограничиться ослабленным контролем.

2.2. Организация и оборудование лаборатории

Микробиологические лаборатории должны иметь определенный набор помещений в соответствии с производственной мощностью и номенклатурой проводимых исследований.

Как правило, в структуру лаборатории входят:

- лабораторные комнаты и боксы для работы в асептических условиях;
- автоклавная – специально оборудованное помещение для стерилизации питательных сред, посуды, обеззараживания отработанного материала;
- моечная, оборудованная для мытья посуды;
- виварий – помещение, предназначенное для содержания лабораторных животных.

Отдельные комнаты должны быть предусмотрены для приборов, чувствительных к вибрации, электромагнитным полям и другим условиям.

В соответствии с правилами устройства, техники безопасности, производственной санитарии и личной гигиены микробиологические лаборатории должны находиться в отдельном здании или в изолированной части здания. Лаборатория должна иметь, как минимум, два входа. Все помещения должны иметь естественное и искусственное освещение, температура воздуха должна поддерживаться в пределах 18–21 °С. Стены в лабораторных помещениях должны быть облицованы глазурованной плиткой или выкрашены масляной краской светлых тонов на высоту 1,5 метра. Полы в лабораторных помещениях покрываются линолеумом или гладкой плиткой. Полы не должны быть скользкими. Ширина основных проходов в помещениях к рабочим местам должна быть не менее 1,5 метра. В лаборатории должны быть особым образом проведены электричество, вентиляция, водопровод и отопление. В системе водоснабжения предусматривается отдельная подача воды для бытовых нужд и для лабораторных исследований.

Помещения лаборатории должны быть оборудованы пожарной сигнализацией и обеспечены средствами для тушения пожара, дезинфицирующими растворами, аптечкой с набором предметов для оказания первой медицинской помощи.

Лаборатории имеют «чистую» и «грязную» зоны. «Чистая» зона – помещение или группа помещений лаборатории, где не проводятся работы с анализируемыми объектами и микробиологические анализы. Чистая зона включает комнаты отдыха, гардероб для верхней одежды, комнаты для работы с документацией и клиентами, подсобные помещения, помещения с холодильниками для хранения продуктов питания и диагностических препаратов. «Грязная» зона – помещение или группа помещений лаборатории, где проводятся работы с анализируемыми объектами и микробиологические анализы. Грязная зона включает помещения для регистрации и приема материала, боксы для проведения исследований, автоклавную для обеззараживания материалов, термостатную. Вытяжная вентиляция грязной зоны оборудуется фильтрами тонкой очистки воздуха, выбрасываемого лабораторией.

После окончания рабочего дня ежедневно проводится текущая уборка помещений влажным способом: в «чистой» зоне лаборатории с применением моющих средств, в «грязной» зоне – с применением моющих и дезинфицирующих средств.

Ряд работ с культурами микроорганизмов: видовой и количественный учет микроорганизмов, выделение чистых культур должны осуществляться в боксе. Бокс представляет собой небольшое изолированное помещение, разделенное перегородкой на две части. Вход в основную, рабочую, часть бокса осуществляется через тамбур с раздвижной дверью, что исключает резкое перемещение воздуха и занесение извне посторонней микрофлоры. Все оборудование бокса регулярно должно подвергаться очистке от микрофлоры с использованием дезинфицирующих средств. Помещения боксов дезинфицируют с помощью бактерицидных ламп и обтирания оборудования, стен и столов дезинфицирующими растворами. Бактерицидные лампы включают в отсутствие персонала. При необходимости кратковременного нахождения персонала в таком помещении следует пользоваться защитными очками. Помещение боксов не менее 1 раза в неделю моют горячей водой с мылом, дезинфицирующими средствами и протирают досуха.

Помещение для приготовления питательных сред должно находиться рядом с моечной и стерилизационной. В моечной комнате должны быть раковина с подводкой холодной и горячей воды, дистиллятор, плита (газовая или электрическая), шкаф или

полки для хранения чистой посуды, моющие средства, ерши, ветошь, место для сушки вымытой посуды.

В стерилизационной должны находиться приборы (автоклав, сушильные шкафы и пр.) для стерилизации посуды, питательных сред и обеззараживания отработанного материала. В лабораторной комнате должны быть шкаф, термостат, холодильники, центрифуга, микроскоп, горелки (газовые или спиртовые). Наружные и внутренние поверхности мебели должны быть доступны для обработки их дезинфицирующими веществами. Рабочие столы покрываются материалом, устойчивым к воздействию кислот, щелочей и высокой температуры.

Лабораторное оборудование, используемое в работе, должно пройти квалификацию. Приборы и средства измерений лаборатории, должны быть исправны, своевременно аттестованы (прошедшие метрологическую экспертизу в установленные сроки) и иметь технический паспорт, проверяться перед началом использования.

Лаборатория должна обеспечивать единство измерений (испытаний) с применением методов измерений (испытаний), аттестованных в соответствующем порядке.

2.3. Правила работы и техника безопасности

Для безопасности лиц, работающих в микробиологической лаборатории и обеспечения стерильности работы необходимо строго соблюдать правила работы в микробиологических лабораториях.

С этой целью со всеми работающими в лаборатории проводится обязательный инструктаж по технике безопасности. Работники должны пройти обучение и иметь необходимые допуски для работы на соответствующем оборудовании (автоклавы, центрифуги, работы с газообразными веществами, находящимися в баллонах под давлением и др.). Вход посторонних лиц в лабораторные помещения должен строго контролироваться.

При работе в производственной лаборатории необходимо соблюдать меры, направленные на предупреждение опасностей, связанных с возможностью:

- заражения персонала при исследовании материалов, содержащих возбудителей инфекционных и паразитарных заболе-

- ваний;
- отравлений, аллергизации, ожогов и других поражений, связанных с применением ядовитых, огнеопасных и радиоактивных веществ, сильных кислот, щелочей, аэрозолей и т. п.;
 - вредностей и опасностей, возникающих при работе со специальными приборами, аппаратами, оборудованием и стеклянной посудой;
 - возможностей загрязнения внешней окружающей среды за счет выноса вредных агентов из лаборатории с воздухом, сточными водами и отходами.

Для каждого вида аппаратуры, механизмов или оборудования, установленных в лаборатории, должна быть составлена инструкция по их эксплуатации и вывешена на рабочем месте, периодически через каждые два года она пересматривается.

При эксплуатации приборов и аппаратов необходимо строго руководствоваться правилами, изложенными в техническом паспорте. Приборы должны быть заземлены, если этого требует инструкция по их эксплуатации.

Все испытания проводятся строго по разработанным на предприятии методикам, прошедшим валидацию (аттестацию). Работа по памяти категорически запрещена. Любые изменения в методиках или используемом оборудовании должны оформляться через систему контроля изменений.

При проведении микробиологических исследований необходимо соблюдать следующие правила (рис. 2):



Рис. 2. Внешний вид работника лаборатории

- Персонал лаборатории должен иметь индивидуальную спецодежду (халат, шапочку, обувь). Личные вещи работающих находятся в специально приспособленном помещении. В боксе работают в стерильных халатах, сменной обуви, шапочках и марлевой маске, которые одевают в предбокснике.
- Перед началом работы бокс должен быть облучен ультрафиолетовыми лучами в течение 30–40 минут.
- Материал, который поступает в лабораторию для исследования, обязательно записывают в специальном журнале и маркируют.
- Работу с исследуемым материалом проводят с помощью инструментов (пинцеты, иглы, петли, корнцанги и пр.).
- Перед работой тщательно проверяют целостность стеклянной посуды и проходимость игл и поршней у шприцов
- Жидкости, содержащие патогенные микробы, переливают над дезинфицирующим раствором. Переливание инфицированных жидкостей из сосуда в сосуд через край не допускается. При наборе таких жидкостей в пипетки используют резиновые груши.
- Посев исследуемого материала в пробирки и чашки Петри производят вблизи от огня горелки (спиртовки) с обжиганием петли, шпателя, краев пробирки. При использовании спиртовок необходимо следить за их герметичностью, не вынимать фитиль из горящей спиртовки, не зажигать одну спиртовку от другой, не пользоваться спиртовкой вблизи легковоспламеняющихся жидкостей. Не оставлять без надобности горящую спиртовку, пламя гасить только колпачком.
- При посеве делают надпись на пробирках, чашках, колбах, флаконах и пр. с указанием названия материала, его номера и даты посева или соответствующего регистрационного номера;
- По окончании работы запрещается оставлять на рабочих столах нефиксированные мазки, чашки Петри, пробирки и другую посуду.
- Отработанный материал подлежит обязательному ежедневному уничтожению. Поверхность рабочего места, как и использованные инструменты дезинфицируют. Оставление посуды для автоклавирования на следующий день допускается только в порядке исключения в баках с дезинфицирующим

раствором.

- Руки обмывают дезинфицирующим раствором с последующим мытьем в теплой воде с мылом.
- После окончания работы и уборки помещения облучают бактерицидными лампами в течение 30–60 мин. Мощность облучения должна составлять 2,5 Вт/м³.
- В лаборатории не допускаются лишние хождения, резкие движения, ненужные разговоры. Выполнение этих требований предупреждает проникновение посторонних микробов из воздуха и ротовой полости в исследуемый материал.
- Все термостаты, холодильники и сейфы с культурами обязательно пломбировать.
- Курить, употреблять пищу и хранить продукты в лаборатории категорически запрещено.
- Выполнение и контроль этих правил возлагается на заведующего лабораторией.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один или несколько правильных ответов.

1. ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ФАРМПРЕДПРИЯТИЯ ДОЛЖНА БЫТЬ ЛИЦЕНЗИРОВАНА, ТАК КАК

- 1) осуществляет работы с санитарно-показательными микроорганизмами
- 2) наличие лицензии определяется требованиями GMP
- 3) лаборатория осуществляет микробиологический мониторинг на всех этапах производства
- 4) результаты исследований используются для внутреннего контроля

2. ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СТРАТЕГИИ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО КОНТРОЛЯ НЕОБХОДИМО ВЫБРАТЬ

- 1) критические точки контроля
- 2) ответственных сотрудников для проведения лабораторных испытаний
- 3) параметры контроля
- 4) объемы проводимых испытаний

3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ДОЛЖНА НАХОДИТЬСЯ

- 1) вблизи от производственных помещений
- 2) в отдельном здании
- 3) около складских помещений
- 4) в изолированной части здания

4. «ГРЯЗНАЯ» ЗОНА ЛАБОРАТОРИИ ВКЛЮЧАЕТ

- 1) гардероб для верхней одежды
- 2) подсобные помещения
- 3) помещения для регистрации и приема исследуемого материала
- 4) боксы для проведения исследований

5. ПРОВЕДЕНИЕ УБОРКИ В «ГРЯЗНОЙ» ЗОНЕ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ

- 1) по окончании рабочего дня с применением моющих средств
- 2) два раза в неделю с применением моющих средств
- 3) по окончании рабочего дня с применением моющих и дезинфицирующих средств
- 4) два раза в неделю с применением моющих и дезинфицирующих средств

6. РАБОТЫ, СВЯЗАННЫЕ С КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ДОЛЖНЫ ОСУЩЕСТВЛЯТЬСЯ

- 1) в отдельной лабораторной комнате
- 2) в термостатной
- 3) в лабораторном помещении со спиртовыми (газовыми) горелками
- 4) в специальных боксах

7. НЕОБХОДИМЫМ УСЛОВИЕМ ДЛЯ ДОПУСКА РАБОТНИКОВ ЛАБОРАТОРИИ К ПРОВЕДЕНИЮ ИСПЫТАНИЙ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) наличие допусков на определенные виды работ
- 2) прохождение медицинской комиссии
- 3) прохождение инструктажа по технике безопасности
- 4) знание технологического процесса

8. ПРИ ЭКСПЛУАТАЦИИ ПРИБОРОВ И АППАРАТОВ НЕОБХОДИМО СТРОГО РУКОВОДСТВОВАТЬСЯ

- 1) ГОСТами на проведение испытаний
- 2) правилами, изложенными в техническом паспорте
- 3) инструкцией по технике безопасности
- 4) распоряжениями заведующего лабораторией

9. ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ ДОЛЖНО БЫТЬ

- 1) устойчивым к воздействию кислот
- 2) устойчивым к воздействию щелочей
- 3) доступными для обработки дезинфицирующих средств
- 4) своевременно аттестовано

10. ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- 1) необходимо иметь индивидуальную спецодежду (халат, шапочку, обувь)
- 2) помещения облучают бактерицидными лампами
- 3) нельзя вынимать фитиль из горячей спиртовки, зажигать одну спиртовку от другой, пользоваться спиртовкой вблизи легковоспламеняющихся жидкостей
- 4) нельзя переливать инфицированные жидкости из сосуда в сосуд через край

Глава 3

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ

3.1. Классификация питательных сред

Важнейшим условием для проведения микробиологического мониторинга является выбор питательной среды

В настоящее время предложено огромное количество сред, в основу классификации которых положены следующие признаки.

1. Целевое использование. По целевому использованию среды делятся на производственные и непроизводственные.

Производственные среды – это среды, которые используются в производстве иммунобиологических препаратов и среды для контроля стерильности данных препаратов.

Непроизводственные среды используются в здравоохранении, в исследовательских работах. К ним относятся среды для выделения и выращивания микроорганизмов.

2. Назначение. Различают среды общего назначения (универсальные) и специальные питательные среды.

Универсальные среды используют для культивирования большого количества микроорганизмов, могут служить основой для приготовления специальных сред (питательный агар, питательный бульон и др.).

Специальные питательные среды предназначены для выращивания определенных видов микроорганизмов, изучения их свойств, для длительного хранения и транспортировки. Выделяют следующие специальные питательные среды:

- Элективные (селективные) или избирательные среды используются для культивирования отдельных конкретных видов бактерий. Их избирательный рост обеспечивается созданием оптимальных условий для данных бактерий (кон-

центрация солей, рН среды и др.), положительной селекцией (элективные среды) или добавлением веществ, угнетающих рост других микроорганизмов (желчь, антибиотики и др.). Например, элективной средой для холерного вибриона является щелочной агар, для стафилококков – желточно-солевой агар (ЖСА).

- Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды используют для изучения биохимической активности микроорганизмов, которая характеризует конкретные ферментативные свойства определенного вида бактерий. Для определения способности сбраживать углеводы применяют среды с добавлением углевода (глюкоза, лактоза, мальтоза, манит, сахароза) и индикатор (среда Гиса, среда Эндо и др.). При росте микроорганизмов, расщепляющих углеводы, изменяется цвет среды.

Способность бактерий расщеплять белки определяется по образованию сероводорода, индола, аммиака. Выделение этих веществ фиксируется соответствующими индикаторами.

- Транспортные (консервирующие) среды предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала; в них предотвращается отмирание патогенных микроорганизмов и подавляется развитие сапрофитов. Пример такой среды – глицериновая смесь, используемая для сбора испражнений при исследованиях, проводимых с целью обнаружения ряда кишечных бактерий.

3. Состав. Среда делят на простые и сложные, на натуральные и синтетические среды. К первым относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду. Сложные среды готовят, прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества, необходимые для размножения того или иного микроорганизма.

Натуральные среды готовят из продуктов животного и растительного происхождения. В настоящее время разработаны среды, в которых ценные пищевые продукты (мясо и др.) заменены непищевыми: костной и рыбной мукой, кормовыми дрожжами, сгустками крови и др. Примером натуральных сред являются мясопептонный агар, мясопептонный бульон, картофельные и другие среды. Такие среды идеально подходят для многих микроор-

ганизмов, так как они содержат всё необходимое для роста и развития бактерий. Недостатком натуральных сред является непостоянство сложного химического состава. Натуральные среды, в основном применяются для достижения диагностических целей, накопления биомассы микроорганизмов.

Синтетические среды готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях. Важным преимуществом этих сред является то, что состав их постоянен. Такие среды производят, как правило, производят для определенного вида микроорганизмов, так как каждый имеет свои особенности обмена веществ. Используются синтетические среды, в основном, для изучения метаболизма веществ, иногда для диагностических целей, аналитики и хранения микроорганизмов.

4. Консистенция. Среды бывают *жидкие, полужидкие, плотные, сухие и сыпучие*. Плотные и полужидкие среды готовят из жидких веществ, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин.

Агар-агар – полисахарид, получаемый из определенных сортов морских водорослей. Он не является для микроорганизмов питательным веществом и служит только для уплотнения среды. В воде агар плавится при 80–100 °С, застывает при 40–45 °С.

Желатин – белок животного происхождения. При 25–30 °С желатиновые среды плавятся, поэтому культуры на них обычно выращивают при комнатной температуре. Плотность этих сред при рН ниже 6,0 и выше 7,0 уменьшается, и они плохо застывают. Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество – при их росте среда разжижается.

В качестве плотных сред применяют также свернутую сыворотку крови, свернутые яйца, картофель, среды с силикагелем.

Сухие среды производятся в виде порошков или гранул, влажность которых не превышает 10 %. Они удобны для хранения, транспортировки, легко растворяются в воде.

Сыпучие среды используют для хранения культур-продуцентов в микробиологической промышленности. Например, это могут быть отруби, кварцевый песок, пропитанные питательными веществами.

3.2. Требования к ростовым качествам питательных сред

Для обеспечения роста широкого спектра микроорганизмов питательная среда должна удовлетворять следующим условиям:

- содержать все необходимые для роста питательные вещества в легко усвояемой форме;
- иметь оптимальную влажность;
- иметь оптимальную рН (оптимальные – для конкретного микроорганизма);
- быть изотоничной;
- быть стерильной;
- по возможности, должна быть прозрачной;
- при добавлении красящего вещества должна иметь соответствующий цвет;
- должна иметь соответствующую консистенцию.

С целью успешного культивирования бактерий важно, чтобы питательные среды содержали необходимые для построения клетки элементы – азот, углерод, кислород, водород, фосфор, калий, сера, натрий, магний, железо; а также такие микроэлементы, как кобальт, йод, марганец, бор, цинк, молибден, медь и др. Для роста патогенных микроорганизмов в питательной среде должны содержаться готовые органические вещества растительного и животного происхождения. В ряде случаев питательные среды должны содержать ростовые вещества (витамины, аминокислоты, пептиды и др.).

В качестве источников азота бактерии могут использовать как простые аммонийные соединения, так и высокомолекулярные вещества – пептоны. Строго паразитические виды бактерий нуждаются в нативном, неизмененном белке.

Универсальными источниками азота и углерода являются:

- продукты переработки мяса животных (мясная вода, мясной экстракт, пептоны);
- продукты переработки рыбы (панкреатический гидролизат кильки, рыбной муки);
- казеин, кислотные гидролизаты казеина;
- продукты переработки дрожжей (дрожжевой автолизат, дрожжевые экстракты);

– продукты растительного происхождения (папайновый гидролизат соевых бобов, растительные пептоны).

Наилучшим источником углерода являются углеводы такие, как сахара, органические кислоты, многоатомные спирты и др.

Фосфаты калия и натрия, пуриновые и пиримидиновые основания служат основными источниками фосфора.

Сульфаты различных металлов, тиосульфаты, аминокислоты цистеин и метионин могут быть источниками серы для микроорганизмов.

Источниками всех металлов для бактерий являются их катионы неорганических солей.

Необходимые ростовые вещества некоторые микроорганизмы синтезируют сами, а для части бактерий, не способных синтезировать эти вещества, необходимо вносить их в питательную среду: аминокислоты, пурины и пиримидины – 10,0 мкг/мл, витамины – до 1,0 мкг/мл среды. Факторы роста можно добавлять в виде отдельных веществ: кровь (гемин), дрожжевые экстракты (витамины), яйца (лецитин) и др.

Питательные среды должны иметь достаточную влажность. При недостатке воды физиологические процессы микроорганизмов замедляются или прекращаются полностью.

Одним из условий культивирования бактерий является создание в питательной среде оптимального уровня кислотности (рН). Уровень рН среды зависит от вида культивируемого микроорганизма. Большинство бактерий растет при слабощелочной реакции среды (рН 7,2–7,4).

Питательные среды должны быть изотоничными для бактерий, т. е. осмотическое давление в средах должно быть таким же, как и внутриклеточное.

Среды лабораторного приготовления должны строго соответствовать качественно-количественному составу, описанному в специальных документах. Питательные среды из коммерческих препаратов готовят в соответствии с этикеткой и инструкцией по применению.

3.3. Контроль ростовых качеств питательных сред

Оценка качества питательных сред и их компонентов проводится с помощью совокупности показателей в соответствии с назначением сред. Она включает контроль:

- качества препарата по физико-химическим показателям;
- специфических ростовых качеств по биологическим показателям.

Биологические (ростовые) свойства среды оценивают по следующим показателям:

- *чувствительность* – определяют по максимальному разведению (10^{-1} – 10^{-9}) стандартизованной до 10 ЕД тестовой культуры, при котором на всех засеянных чашках Петри (пробирках) обнаруживается рост;
- *скорость роста* – минимальное время инкубации посевов (в часах), достаточное для выявления роста микроорганизмов и их характерных признаков (для всех групп питательных сред);
- *дифференцирующие свойства* – оценивают по выраженности основных отличительных признаков, характеризующих рост тестовых штаммов на контролируемой питательной среде;
- *процент всхожести* – процентное соотношение среднего значения количества колониеобразующих единиц (далее – КОЕ), выросших на контролируемой плотной питательной среде, к среднему значению количества КОЕ, выросших на контрольной среде;
- *показатель ингибции* – оценивают по степени подавляющего воздействия на посторонние патогенные и непатогенные микроорганизмы, определяя минимальное разведение, при котором полностью отсутствует рост посторонних микроорганизмов;
- *показатель стабильности биологических свойств микроорганизмов* – определяют по отсутствию проявления атипичных их свойств (тинкториальных, культуральных, морфологических, физиолого-биохимических, серологических, фаголизабельных и др.). Показатель вычисляют по отношению количества КОЕ с атипичными свойствами к общему количеству КОЕ на контролируемой питательной среде.

Контроль биологических свойств готовых питательных сред подразделяется на два вида: качественный и количественный контроль. Возможно использование среды сравнения – среды ранее отконтролированной и удовлетворяющей требованиям качества.

С этой целью готовую среду засевают культурой (тест-штаммом) того (целевого) микроорганизма, для которого приготовлена среда, и гетерологичных штаммов, и визуально (или под малым увеличением микроскопа) изучают характер его роста.

Качественный контроль выявляет грубые нарушения технологии приготовления, приводящих к выраженному снижению ростовых и (или) дифференцирующих свойств готовой питательной среды. Такой контроль проводится после каждой варки питательных сред. С этой целью определяют наличие и характер роста каждого из тест-штаммов. Рост целевых тест-штаммов должен быть типичным по цвету, размеру и морфологии колоний; рост нецелевых должен частично или полностью подавляться. Готовая питательная среда считается пригодной, если по истечении срока инкубации тестовый штамм дает хорошо различимый рост со всеми типичными для него отличительными признаками, которые предполагается выявлять на данной среде. Контролируемыми признаками могут быть: помутнение жидкой или полужидкой среды, изменение цвета, образование газа, отличительная форма, структура, окраска колоний, наличие и диаметр зоны изменения цвета и прозрачности среды вокруг колоний.

Результаты качественного контроля питательной среды документируются.

Количественный контроль питательных сред выявляет относительные изменения (ухудшения) ростовых свойств в ходе транспортировки, хранения, приготовления, стерилизации, а также при изменении технологических требований в процессе производства сред, в результате которых они оказываются менее эффективными. Для оценки результатов количественным методом при интерпретации ингибирующих, накопительных или задерживающих рост свойств среды, подсчитывают количество выросших колоний на тестируемой и контрольной (среде выращивания) средах.

Количественный контроль выполняется:

– при поступлении каждой новой серии питательных сред;

- при необходимости решения вопроса о продлении срока годности питательных сред, либо возможности ее дальнейшего использования в случае выявления нарушений условий хранения.

Для проведения контроля питательных сред количество образцов одной серии среды должно быть не менее трех.

Серия среды признается годной только после проведения всех видов контроля.

Питательные среды, не прошедшие контроль по биологическим показателям подлежат уничтожению.

3.4. Методика определения биологических (ростовых) свойств среды

Определение показателей чувствительности и скорости роста. Культуры тест-штаммов, выращенные на скошенном агаре, смывают физиологическим раствором NaCl и подводят под оптический стандарт ГИСК им. Тарасевича, соответствующий 10 ед. мутности. В тех случаях, когда не определен коэффициент пересчета микробных клеток в единицы мутности, расчеты ведут от 10 ед. мутности по соответствующему разведению.

Из исходной стандартной взвеси готовят 10-кратные разведения путем последовательного переноса не менее 0,5 мл культуры в 8 пробирок с 4,5 мл физиологического раствора, тщательно перемешивая и меняя стерильную пипетку после каждого «шага».

Из 4-х последних разведений (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) по 0,1 мл взвеси вносят в 3 хорошо подсушенные чашки (пробирки) с плотной средой или 3 пробирки с 10 мл жидкой (полужидкой) питательной средой (при посеве в жидкие (полужидкие) питательные среды обогащения посеvy производят из разведений 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} по 1 мл взвеси в каждую пробирку с 9 мл среды).

При посевах на чашки и пробирки с плотной средой взвесь культуры распределяют по поверхности среды, используя для каждой чашки новый шпатель. Посевы помещают в соответствующие условия культивирования.

После инкубации производят учет результатов, чувствительность среды определяют по наибольшему разведению, обеспечивающему формирование колоний или визуально видимый рост на всех засеянных чашках (пробирках) с питательной средой. При

определении показателя чувствительности в жидких средах обогащения в случае отсутствия визуально обнаруживаемого роста после соответствующей инкубации посевов из каждой пробирки производят высев на чашки с питательным агаром, разделенным на 4–8 секторов, на каждый из которых засевают по одной петле культуры из каждой пробирки с жидкой средой.

Учет результатов скорости роста культуры в каждом взятом в опыт разведении микробной взвеси производят для плотных сред через 12–24–48 часов инкубации, для жидких (обогащения) – через 3–6 и далее часов. Показатель скорости роста определяют по минимальному времени инкубации посевов, за которое при соответствующем разведении обеспечен отчетливый видимый невооруженным глазом рост культуры (помутнение, наличие пленки, осадка, роста по уклону и др.) во всех засеянных пробирках с жидкими (полужидкими) питательными средами или формирование типичных, легко дифференцируемых колоний на чашках (пробирках) с плотной средой.

Определение стабильности биологических свойств культур. Определение этого показателя проводят на чашках, где выросло не менее 25 и не более 100–150 колоний. Изучают свойства культур, выращенных на питательных средах, по культурально-морфологическим, биохимическим, серологическим, фаголизательным и другим признакам. При этом оцениваются:

- характер роста культур (равномерное помутнение среды, формирование пленки на поверхности среды, придонно-пристеночный рост, рост в виде осадка и др. в жидких средах. Равномерное, зональное помутнение среды, рост по уколу, сталактитовый рост, в виде елочки и др. – в полужидких средах; форма, структура, характер роста колоний, диаметр (измеряется с помощью микрометра или циркуля-измерителя, средний диаметр вычисляется из 5-ти измерений на каждой чашке. Диаметр колоний в популяции не должен отличаться более чем в 2 раза) – на плотных средах);
- морфология микробов – форма (кокки, палочки, отсутствие полиморфизма в размерах, окраске и др.);
- расположение (одиночное, парное, гроздевидное, цепочки и др.);
- строение (наличие капсулы, жгутиков, спор, включений и др.);
- подвижность;
- серологические признаки изучают в реакции агглютинации

на стекле с видовыми (рецепторными) агглютинирующими сыворотками, с антительными диагностикумами или с люминесцирующими сыворотками, с антительными диагностикумами или с люминесцирующими адсорбированными сыворотками. Проверяют физико-химическое состояние клеток – стабильность взвеси микробов (отсутствие спонтанной агглютинации) в растворе трипофлавина, в 0,85 % и 4 % растворах NaCl;

- биохимические свойства (ферментация углеводов, образование H_2S и индола и др.), пигментообразование;
- фаголизабельность;
- биологические свойства (гемолиз и др.).

Названные свойства определяют по общепринятым методикам.

Определение дифференцирующих свойств. Дифференцирующие свойства среды определяют по следующим тестам:

- выраженности дифференцирующего признака – структура колоний, изменение цвета колоний или цвета среды под колониями, ореол вокруг них, диаметр последнего, появление диффузного изменения цвета среды;
- четкости дифференциации колоний группы патогенных микроорганизмов от микробов непатогенных видов, входящих в тот же систематический таксон, и от естественных ассоциантов при посеве смесей.

Для оценки дифференцирующих свойств среды готовят смесь из штамма каждого возбудителя и одного из штаммов непатогенных микробов. Испытывают два варианта смесей патогенного и непатогенного микробов в отношении 1:1 и 1:10. Высев из каждой смеси производят по 0,1 мл на 3 чашки с опытной средой. Первая смесь необходима для учета четкости дифференциации, вторая – для оценки возможности выделения единичных патогенных возбудителей из смеси с другими микроорганизмами.

Дифференцирующие свойства сред, используемых для идентификации чистых культур, определяют качественно набором штаммов с положительными и отрицательными признаками по соответствующим тестам.

Определение показателя ингибиции. Ингибирующие свойства среды определяются как по отношению к патогенной флоре, так и по отношению к микробам-ассоциантам.

При определении показателя ингибиции в отношении микро-

бов-ассоциантов посевная доза этих микробов должна превышать посевную дозу патогенной флоры в 10 раз для слабо элективных и в 100 раз (и более) для селективных сред. Смесь готовится путем соединения 1 мл взвеси, содержащей в посевной дозе 100 микробных клеток возбудителя и 1 мл взвеси одного из микробов-ассоциантов, содержащего 1000 и 10000 м.к. Из указанных смесей производят высев по 0,1 мл на 3 чашки (каждый штамм смешивается с патогенным возбудителем отдельно).

Ингибирующее действие жидких селективных (элективных) питательных сред обогащения определяют по отношению к патогенной и к соответствующей непатогенной микрофлоре с использованием монокультур и их смеси. С этой целью по 1 мл взвеси, содержащей 10, 100 и 1000 м.к. чистой культуры патогенного, 1000, 10000 м.к. (и более) чистой культуры непатогенного микробов, вносят в три параллельные пробирки (с 10 мл среды) каждого разведения. Одновременно в 3 пробирки с 10 мл испытуемой среды вносят это же количество микробных клеток патогенного возбудителя в смеси с 1000, 10000 и 100000 м.к. непатогенного микроба. Через 3–6 и более часов инкубации производят высев из каждой пробирки с посевами чистых культур и из смесей по 0,1 мл на чашки с соответствующей средой для последующей идентификации и через оптимальный срок инкубации учитывают результат (аналогично тому, как для плотных сред).

Определение показателя эффективности. Оценку качества белковых основ по показателю эффективности на моделях жидкой питательной среды производят путем определения концентрации микробной взвеси в среде через соответствующий срок инкубации по изменению показателя оптической плотности (на спектрофотометре или ФЭКе).

На модели плотной питательной среды эффективность определяют по следующей методике: 18–20-часовую культуру смыывают с плотной среды физиологическим раствором хлористого натрия и взвесь доводят до 10 ед. оптического стандарта мутности ГИСК им. Тарасевича. Полученную взвесь разводят физиологическим раствором в 2 раза, что соответствует приблизительно 500 млн. микробных тел в 1 мл (5 ед. стандарта). 0,1 мл этого разведения засевают на 2 пробирки со скошенным испытуемым агаром (скашивают таким образом, чтобы в нижней части пробирки не было столбика). Через 20 часов роста при 37 °С культуры

смывают с поверхности агара 2,5 мл физиологического раствора. Добавление физиологического раствора, которое пошло на это разведение, плюс 0,5 мл взвеси культуры в физиологическом растворе и составят выход микробных тел (в млрд) с 1 мл среды.

Пример: 2,5 мл физиологического раствора смывают культуры с 5 мл питательного агара. Следовательно, на 1 мл питательного агара приходится 0,5 мл взвеси культуры. Для разведения 0,5 мл взвеси культуры до содержания 1 млрд. микробных тел (10 ед. стандарта) пошло 3,2 мл физиологического раствора. Следовательно, в пробирке будет содержаться 3,2 мл физиологического раствора плюс 0,5 взвеси культуры, т. е. всего 3,7 мл. Выход микробных тел с 1 мл среды составит соответственно 3,7 млрд.

В жидких (полужидких) средах обогащения определение накопительного эффекта проводят по следующей методике:

Разведение соответствующих тест-штаммов проводят по методике, описанной для определения чувствительности. Из разведений культур в 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} до 1 мл взвеси из каждого вносят в 3–5 пробирок с 10 мл жидкой (полужидкой) испытуемой средой. Параллельно из каждого разведения производят высев по 0,1 мл взвеси культуры на 3–5 чашек с питательным агаром для определения числа жизнеспособных микробных клеток в посевной дозе, необходимого для последующего вычисления прироста возбудителя в средах обогащения. После соответствующей инкубации посевов в среде обогащения (3–6 и более часов), независимо от видимых ее изменений, из каждой пробирки производят высев на чашки с питательным агаром (по 0,1 мл на чашку). В случае обильного роста культуры в жидкой среде ее перед посевом на чашки необходимо развести. Степень разведения учитывают при обсчете результатов. Через 18–20 и более часов инкубации производят подсчет сформировавшихся колоний на чашках, засеянных из исходных взвесей культур и из жидких сред обогащения.

Прирост числа микроорганизмов при размножении в среде обогащения в процессе инкубации посевов в течение соответствующего времени (t) определяют по формуле (в %):

$$J = \frac{n_t - n_0}{n_t} \times 100, \text{ где}$$

n_t – число колоний на чашках, засеянных из жидких сред после инкубации;

n_0 – число колоний при высевах исходных взвесей культур.

В процессе отработки методов контроля следует шире использовать методы статистической обработки данных при определении количественных величин для показателей (определение средних величин, средних квадратичных отклонений, вычисление коэффициента вариации, определение доверительных интервалов и статистической значимости разницы средних величин на контрольной и опытных средах).

3.5. Тест-культуры микроорганизмов, их применение

Тест-культура микроорганизмов – это культура микроорганизмов, типичная по набору признаков, характеризующих их родовую (видовую, типовую) принадлежность, и используемая для моделирования свойств определенного микроорганизма (группы микроорганизмов) при бактериологических или иммунологических исследованиях.

Выбор тест-штаммов для контроля и оценки соответствующей питательной среды определяется требованиями в соответствии с нормативными документами или согласно рекомендациям организации-производителя конкретных питательных сред (прил. 1).

Рекомендуемые для контроля штаммы хранят в лиофилизированном или замороженном состоянии в холодильнике отдельно по группам патогенности. Испытательная лаборатория должна вести учет тест-штаммов. Вскрытие ампул (флаконов) и восстановление культур из лиофилизированного состояния проводится с использованием жидкой и плотной питательных сред, принятых для определенной группы микроорганизмов в соответствии с прилагаемой к упаковке инструкцией. Рекомендуемые для контроля штаммы должны проверяться на отсутствие диссоциации по соответствующим тестам (см. ниже). В случае необходимости проводят изучение культурально-морфологических и биохимических свойств. Тест-штаммы должны находиться в типичной для данного микроорганизма форме. В случае, если обнаруживается более 25 % полиморфных колоний, культура не может быть ис-

пользована для контроля питательных сред. Восстановленную культуру пересевают на соответствующую среду хранения, после чего пробирки запаивают. Полученные таким образом исходные культуры тест-штаммов хранят при 4–6 °С и используют по мере необходимости.

Для получения рабочей культуры исходную культуру тест-штамма из запаянной пробирки высевают на такое количество пробирок с соответствующей средой для последующего хранения, которое позволит обеспечить необходимый контроль питательной среды. Рабочую культуру хранят при 4–6 °С не более 3–6 мес в условиях, предохраняющих культуру от высыхания. Для посева на испытываемые среды используют культуры тест-штаммов, прошедшие не более 2-х пассажей на питательных средах.

Проверка тест-штаммов на диссоциацию включает:

- визуальный просмотр колоний на чашках и в микроскопе в «косонаправленном» свете;
- кипячение пробы 2-х млрд. взвеси микробных тел агаровой культуры в физиологическом растворе на водяной бане в течение 1 ч. Взвесь культуры должна быть гомогенной;
- эмульгирование агаровой культуры на стекле в 0,85 % и в 4 % растворах NaCl, а также в растворе трипофлавина 1:1000 (для культур, не содержащих поверхностных К-антигенов). Культура не должна хлопкаться;
- проведение реакции агглютинации на стекле с адсорбированными агглютинирующими специфическими сыворотками.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один или несколько правильных ответов.

1. ЭЛЕКТИВНЫЕ (СЕЛЕКТИВНЫЕ) ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ
 - 1) культивирования отдельных конкретных видов бактерий
 - 2) изучения биохимической активности микроорганизмов
 - 3) длительного хранения и транспортировки
 - 4) культивирования большого количества микроорганизмов

2. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ

- 1) культивирования отдельных конкретных видов бактерий
- 2) изучения биохимической активности микроорганизмов
- 3) длительного хранения и транспортировки
- 4) культивирования большого количества микроорганизмов

3. ОСНОВНЫМИ ТРЕБОВАНИЯМИ К РОСТОВЫМ КАЧЕСТВАМ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) содержание всех необходимых для роста питательных веществ
- 2) оптимальная рН
- 3) стерильность
- 4) прозрачность

4. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ

- 1) по физико-химическим показателям
- 2) по биологическим показателям
- 3) по органолептическим показателям
- 4) визуально

5. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ОЦЕНИВАЮТ ПО

- 1) минимальному времени инкубации посевов (в часах), достаточном для выявления роста микроорганизмов и их характерных признаков
- 2) отсутствию проявления атипичных их свойств (тинкториальных, культуральных, морфологических, физиолого-биохимических, серологических, фаголизабельных и др.)
- 3) максимальному разведению (10^{-1} – 10^{-9}) стандартизованной до 10 ЕД тестовой культуры, при котором на всех засеянных чашках Петри (пробирках) обнаруживается рост
- 4) степени подавляющего воздействия на посторонние патогенные и непатогенные микроорганизмы, определяя минимальное разведение, при котором полностью отсутствует рост посторонних микроорганизмов

6. ПОКАЗАТЕЛЬ ИНГИБИЦИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ОЦЕНИВАЮТ ПО

- 1) минимальному времени инкубации посевов (в часах), достаточном для выявления роста микроорганизмов и их характерных признаков
- 2) отсутствию проявления атипичных их свойств (тинкториальных, культуральных, морфологических, физиолого-биохимических, серологических, фаголизабельных и др.)
- 3) максимальному разведению (10^{-1} – 10^{-9}) стандартизованной до 10 ЕД тестовой культуры, при котором на всех засеянных чашках Петри (пробирках) обнаруживается рост

- 4) степени подавляющего воздействия на постороннюю патогенные и непатогенные микроорганизмы, определяя минимальное разведение, при котором полностью отсутствует рост посторонних микроорганизмов

7. КАЧЕСТВЕННЫЙ КОНТРОЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРОВОДИТСЯ

- 1) при поступлении каждой новой серии питательных сред
- 2) после каждой варки питательных сред
- 3) при необходимости решения вопроса о продлении срока годности питательных сред
- 4) при необходимости решения вопроса о возможности ее дальнейшего использования в случае выявления нарушений условий хранения

8. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ КОНТРОЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРОВОДИТСЯ

- 1) при поступлении каждой новой серии питательных сред
- 2) после каждой варки питательных сред
- 3) при необходимости решения вопроса о продлении срока годности питательных сред
- 4) при необходимости решения вопроса о возможности ее дальнейшего использования в случае выявления нарушений условий хранения

9. СЕРИЯ СРЕДЫ ПРИЗНАЕТСЯ ГОДНОЙ, ЕСЛИ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛУЧЕНЫ

- 1) при проведении всех видов контроля
- 2) при анализе количество не менее трех образцов одной серии среды
- 3) в ходе проведения качественного контроля биологических свойств питательной среды
- 4) в ходе проведения количественного контроля биологических свойств питательной среды

10. ТЕСТ-КУЛЬТУРА МИКРООРГАНИЗМОВ – ЭТО

- 1) культура микроорганизмов, типичная по набору признаков, характеризующих их родовую (видовую, типовую) принадлежность, и используемая для моделирования свойств определенного микроорганизма (группы микроорганизмов) при бактериологических или иммунологических исследованиях
- 2) культура микроорганизмов с одинаковыми культуральными и тинкториальными признаками, используемыми для моделирования свойств определенного микроорганизма (группы микроорганизмов) при бактериологических исследованиях

- 3) культура микроорганизмов, типичная по набору биохимических признаков, используемых для моделирования свойств определенного микроорганизма (группы микроорганизмов) при бактериологических исследованиях
- 4) культура микроорганизмов, типичная по антигенной структуре, используемой для моделирования свойств определенного микроорганизма (группы микроорганизмов) при иммунологических исследованиях

Глава 4

ЧИСТЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЯХ

4.1. Чистые помещения, классификация

Основные требования к чистым помещениям на фармацевтических производствах изложены в ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств» и правилах GMP (Good manufacturing practice for medicinal products).

Для фармацевтических производств очень важно, чтобы место расположения, проект, строительство, монтаж, оснащение и обслуживание помещений и оборудования соответствовали характеру выполняемых работ. Конструкция помещений и оборудования должны минимизировать риск ошибок, предусматривать проведение эффективной уборки и обслуживания с целью предотвращения загрязнения, поскольку все эти факторы влияют, в конечном счете, на качество продукции.

Уборка и дезинфекция помещений должны проводиться в соответствии с письменными инструкциями. Освещение, температурный режим, влажность воздуха и вентиляция должны соответствовать назначению помещения и не оказывать отрицательного влияния на работу оборудования и лекарственные средства во время их изготовления и хранения. В помещения не должны допускаться лица, не имеющие права доступа в них.

К производству стерильных лекарственных средств предъявляются особые требования, которые направлены на сведение к минимуму риска загрязнения микроорганизмами, частицами и пирогенами. Производство стерильной продукции должно быть организовано в чистых помещениях (зонах) с воздушными шлюзами для обеспечения доступа персонала и перемещения оборудования и материалов. В чистых помещениях (зонах) должен

поддерживаться уровень чистоты по соответствующему стандарту, а воздух должен подаваться через фильтры необходимой эффективности.

Чистые помещения (зоны) для производства стерильной продукции классифицируются в соответствии с требованиями к окружающей среде. Для обеспечения соответствия чистых помещений (чистых зон) требованиям, предъявляемым к эксплуатируемому состоянию, проектом должно предусматриваться соответствие заданным классам чистоты воздуха в оснащем состоянии. Оснащенное состояние – состояние, в котором чистое помещение построено и функционирует, технологическое оборудование полностью укомплектовано, но персонал отсутствует. Эксплуатируемое состояние – это состояние чистого помещения, в котором технологическое оборудование функционирует в требуемом режиме с заданным числом работающего персонала.

Чистые помещения и зоны при производстве стерильных лекарственных средств подразделяются на четыре типа:

А – локальная зона для проведения операций, представляющих высокий риск для качества продукции (зоны наполнения, укупорки; зоны, где ампулы и флаконы находятся в открытом состоянии и выполняются соединения частей оборудования в асептических условиях). Как правило, в таких зонах используют однонаправленный (ламинарный) поток воздуха, обеспечивающий в незамкнутой чистой зоне однородную скорость 0,36–0,54 м/с. В закрытых изолирующих устройствах и перчаточных боксах допускается использовать однонаправленный поток воздуха с меньшей скоростью.

В – зона, непосредственно окружающая зону А и предназначенная для асептического приготовления и наполнения.

С и **Д** – чистые зоны для выполнения менее ответственных стадий производства стерильной продукции.

Локальные чистые зоны. Одним из эффективных способов снижения затрат при создании комплексов чистых помещений является зонирование чистого помещения на локальные участки, которые могут отличаться друг от друга как классом чистоты воздушной среды, так и функциональным назначением (только защита продукта, либо защита как продукта, так и окружающей среды). Таким образом, внутри чистого помещения низкого

класса чистоты над критичными местами технологического процесса могут быть созданы чистые зоны с более высоким классом чистоты, чем помещение, где они размещены.

Чистая зона – это локальная пространственная конструкция, построенная и используемая таким образом, чтобы свести к минимуму поступление, выделение и удержание частиц внутри зоны.

Чистая зона конструктивно выполняется как самостоятельное изделие по принципу «помещение в помещении». **Основное назначение чистых зон** – поддержание в локальном рабочем пространстве заданных параметров воздушной среды и защита продукта от воздействия окружающей среды.

Чистая зона может использоваться как в «чистом», так и в обычном помещении. Компактность чистых зон позволяет размещать их практически в любом помещении. По уровню чистоты воздуха зоны соответствуют чистым помещениям, но являются значительно более экономичным решением. Чистые зоны мобильны – их можно использовать там, где это необходимо в данный момент (сборно-разборные конструкции модульного типа).

В зависимости от требований к конечному продукту или препарату существуют рекомендации по использованию различных чистых помещений, зон (табл. 7).

Таблица 7

Примеры операций, выполняемых в различных зонах

Зона	Примеры операций для продукции, подлежащей финишной стерилизации
A	Наполнение продуктом, когда его нельзя подвергать риску загрязнения
C	Приготовление растворов, когда их нельзя подвергать риску загрязнения. Наполнение продуктом
D	Приготовление растворов и подготовка первичной упаковки, материалов и др. для последующего наполнения
Зона	Примеры операций для асептического приготовления
A	Асептическое приготовление и наполнение
C	Приготовление растворов, подлежащих фильтрации
D	Операции с материалами после мойки

Существуют различные требования к максимально допустимой концентрации аэрозольных частиц в зависимости от типа зоны (табл. 8). Следует проводить текущий контроль чистых помещений и чистых зон в период их эксплуатации.

Точки отбора проб для текущего контроля выбирают на основе анализа риска и результатов, полученных при аттестации или испытании чистых помещений. Контроль концентрации частиц в зонах А должен проводиться в течение всего времени выполнения критических процессов. При превышении значений нормативов должны подаваться сигналы тревоги.

Таблица 8

Максимально допустимая концентрация аэрозольных частиц для зон разного типа

Зона	Максимально допустимое количество частиц в 1 м ³ воздуха, при размере частиц, равном или большем			
	в оснащённом состоянии		в эксплуатируемом состоянии	
	0,5 мкм	5,0 мкм	0,5 мкм	5,0 мкм
А	3520	20	3520	20
В	3520	29	352000	2900
С	352000	2900	3520000	29000
Д	3520000	29000	Не регламентируется	Не регламентируется

Рекомендуется использовать такой контроль и для зон В, но периодичность контроля может быть увеличена. При превышении допустимых пределов также должны подаваться сигналы тревоги. При текущем контроле зон С и Д в эксплуатируемом состоянии следует использовать метод анализа рисков.

Соответствие концентрации частиц в оснащённом состоянии заданным требованиям (табл. 8) должно достигаться после короткого времени восстановления 15–20 мин при отсутствии персонала после завершения работы.

Требования к другим параметрам, например к температуре и влажности, зависят от продукта и характера выполняемых операций. Обеспечение требований к этим параметрам не должно влиять на выполнение требований к чистоте.

В асептическом производстве необходимо проводить микробиологический контроль с использованием методов седимен-

тации на чашки, отбора проб в объеме воздуха и с поверхностями (например, смывы и контактные пластины).

В асептическом производстве для снижения риска микробного загрязнения продукции из окружающей среды используются **изолирующие технологии** (изоляторы и передаточные устройства), которые позволяют свести к минимуму влияние человека на технологические зоны. Процесс передачи материалов внутрь и наружу изолятора является одним из наиболее сильных потенциальных источников загрязнений. Изолятор предназначен для проведения операций, представляющих высокий риск для качества продукции.

Подготовка компонентов первичной упаковки и других материалов и приготовление большинства продуктов должна проводиться, по крайней мере, в зоне D, чтобы обеспечить достаточно низкий уровень загрязнения микроорганизмами и частицами перед стадиями фильтрации и стерилизации. При повышенном риске загрязнения микроорганизмами (например, когда продукт является хорошей питательной средой для микроорганизмов, или он должен храниться в течение длительного времени до стерилизации, или процесс проводят, в основном, в незакрытом оборудовании) технологические операции следует проводить в зоне C.

Наполнение продуктами, подлежащими финишной стерилизации, должно проводиться, по крайней мере, в зоне C.

При повышенном риске загрязнения продукта от окружающей среды, например, если операции наполнения проходят медленно, или упаковки имеют широкое горло, или их необходимо держать открытыми более нескольких секунд до герметизации, наполнение должно проводиться в зоне A, находящейся, по крайней мере, в зоне C. Приготовление и наполнение мазями, кремами, суспензиями и эмульсиями перед финишной стерилизацией следует, как правило, проводить в зоне C.

Для асептического производства операции с компонентами первичной упаковки и другими материалами после мойки должны проводиться, по крайней мере, в зоне D. Операции со стерильными исходными материалами и компонентами, если на последующих стадиях процесса не предусмотрена их стерилизация или фильтрация через фильтры, удерживающие микроорганизмы, должны проводиться в зоне A, находящейся в зоне B.

Приготовление растворов, которые в ходе технологического процесса подлежат стерилизующей фильтрации, должно проводиться в зоне С. Если фильтрация не предусмотрена, приготовление материалов и продуктов должно проводиться в зоне А, находящейся в зоне В.

Операции по переработке и наполнению приготовленных в асептических условиях продуктов следует проводить в зоне А, находящейся в зоне В.

Транспортирование частично закрытых первичных упаковок, например, при лиофильной сушке, должно до завершения укупорки проводиться либо в зоне А, находящейся в зоне В, либо выполняться в герметичных передаточных устройствах, перемещаемых в зоне В.

Приготовление и наполнение стерильных мазей, кремов, суспензий и эмульсий должно проводиться в зоне А, находящейся в зоне В, в том случае, когда продукт находится в открытом виде и не подлежит последующей фильтрации.

Персонал. В чистых зонах допускается нахождение только минимального необходимого количества персонала. Это особенно важно для асептического производства. Проверки и контрольные операции следует, по возможности, проводить, находясь за пределами чистых зон. Весь персонал (в т. ч. персонал, занятый очисткой и техническим обслуживанием), работающий в таких зонах, должен проходить систематическое обучение по вопросам производства стерильных продуктов, включая гигиену и основы микробиологии.

Не допускается вход в зоны стерильного производства персонала, работающего с материалами из тканей животных или культурами микроорганизмов, которые не используются в текущем технологическом процессе.

Персонал, занятый в производстве стерильных препаратов, должен знать порядок оповещения руководства (службы качества) о любых факторах, которые могут привести к повышению уровня загрязнения сверх допустимой нормы. В чистых зонах персоналу запрещается носить наручные часы и ювелирные украшения, а также применять косметику. Переодевание и мытье следует выполнять в соответствии с инструкциями, чтобы свести к минимуму риск загрязнения одежды, предназначенной для чистых зон, и внесения загрязнения в чистые зоны.

Одежда и ее качество должны соответствовать технологическому процессу и типу зоны. Ее нужно носить так, чтобы обеспечить защиту продукта от загрязнений. К одежде, предназначенной для зон различных типов, предъявляются следующие требования:

- Зона D: головной убор должен закрывать волосы. Борода (при ее наличии) также должна быть закрыта специальной маской. Следует носить защитный костюм общего назначения, соответствующую обувь или бахилы, надеваемые поверх обуви.
- Зона C: головной убор должен закрывать волосы. Борода и усы (при их наличии) также должны быть закрыты. Следует носить костюм (комбинезон или куртка – брюки), плотно облегающий запястья, с воротником-стойкой и соответствующую обувь или бахилы. Одежда и обувь не должны выделять волокон или частиц.
- Зоны A и B: головной убор должен полностью закрывать волосы, а также бороду и усы (при их наличии). Края головного убора должны быть убраны под воротник костюма. Следует носить маску, чтобы предотвратить распространение капель, стерильные, неопудренные резиновые или полимерные перчатки и стерильные (или дезинфицированные) бахилы. Нижняя часть штанов должна быть заправлена внутрь бахил, а рукава одежды – в перчатки. Защитная одежда не должна выделять волокон или частиц и должна удерживать частицы, отделяющиеся от тела.

Наружная одежда не должна попадать в комнаты для переодевания, ведущие в зоны B и C. Каждый работник в зонах A и B должен быть обеспечен чистой стерильной одеждой на каждую смену. Во время работы перчатки следует регулярно дезинфицировать. Маски и перчатки следует менять, по крайней мере, каждую смену.

При обработке и обращении с одеждой для чистых помещений должно быть исключено накопление загрязнений, которые могут от нее впоследствии отделиться. Желательно иметь отдельные участки для подготовки такой одежды (прачечные). При неправильной подготовке одежды могут повреждаться волокна ткани, и увеличивается риск отделения частиц.

Для того чтобы свести к минимуму отделение частиц или микроорганизмов или их накопление, обеспечить возможность многократной обработки моющими и дезинфицирующими средствами все открытые поверхности в чистых зонах должны быть гладкими, непроницаемыми, без трещин и изломов. Чтобы уменьшить накопление пыли и облегчить очистку, в помещении не должно быть труднодоступных для очистки мест.

Запрещается устанавливать раковины и сливы в зонах А и В, используемых для асептического производства. В других зонах следует предусматривать разрыв струи между оборудованием и канализационной трубой (воронкой). При удалении стоков в чистых помещениях более низких классов следует предусматривать трапы (гидрозатворы) для предотвращения обратного потока.

Комнаты для переодевания должны проектироваться по принципу воздушных шлюзов. Они должны обеспечивать физическое разделение различных этапов переодевания, чтобы свести к минимуму загрязнение технологической одежды частицами и микроорганизмами, и эффективное обтекание помещений потоком отфильтрованного воздуха. Зона перед выходом из комнаты (помещения) для переодевания в оснащенной состоянии должна иметь тот же класс чистоты, что и зона, в которую она ведет. В некоторых случаях для входа в чистые зоны и выхода из них целесообразно иметь отдельные комнаты (помещения) для переодевания. Устройства для мытья рук следует, как правило, устанавливать только в передней части комнаты (помещения) для переодевания.

Обе двери воздушного шлюза не должны быть одновременно открыты. Для предотвращения открывания более чем одной двери одновременно следует предусмотреть систему блокировки или оповещения (визуальную и/или звуковую).

Система вентиляции должна поддерживать положительный перепад давления по отношению к окружающим зонам более низкого класса и эффективное обтекание воздухом контролируемой зоны. Соседние помещения различных классов должны иметь перепад давления 10–15 Па.

4.2. Передаточные, воздушные шлюзы и ламинарные боксы

Воздушный шлюз – это замкнутое помещение с двумя или более дверями, расположенное между помещениями различных классов чистоты и служащее для предотвращения проникновения механических частиц и микроорганизмов в соседние помещения.

Двери современных шлюзов оснащены смотровыми окошками и электромагнитными замками. Включение цикла очистки в шлюзе приводит к возникновению мощного воздушного потока, прошедшего очистку НЕРА-фильтрами. Шлюзы могут быть оснащены системой слежения за блокировкой дверей, лампами дневного света и индикаторными лампочками. Шлюзы могут быть оснащены режимами блокировки. Система блокировки предотвращает открытие обеих дверей одновременно, сохраняя тем самым целостность чистого помещения. Для повышения безопасности шлюз может быть оснащён функцией обнаружения нарушения порядка прохождения шлюза. Сообщения об ошибках отображаются на дисплее. Дисплей также отображает текущее состояние и отсчет продолжительности очистки шлюза.

Ламинарные боксы представляют собой специальное оборудование, применяемое для оснащения помещений с особыми требованиями к чистоте воздуха и физической изоляции микроорганизмов. По сути, ламинарный бокс – это устройство в виде шкафа, оборудованного прозрачной панелью, ультрафиолетовыми лампами, осветителями и системой стерилизации воздуха при помощи механического и электрического фильтрования. Подача стерильного воздуха осуществляется в виде ламинарного потока (равномерного, без завихрений, движения воздуха).

Следует различать ламинарные боксы (укрытия) и боксы биологической (микробиологической) безопасности.

Ламинарные боксы (укрытия) являются основным оборудованием, используемым для создания беспылевой абактериальной воздушной среды. Ламинарные боксы обеспечивают защиту исключительно продуктов, помещенных в рабочую зону, от внешнего и перекрестного загрязнений, и не обеспечивают защиту ни персонала, ни окружающей среды.

Термин «**боксы биологической безопасности**» обозначает специальное оборудование, оснащенное НЕРА-фильтром и пред-

назначенное для защиты оператора или одновременной защиты оператора и продукта от веществ, представляющих биологическую опасность. Этот термин может быть применим только к тому оборудованию, которое отвечает установленным требованиям для класса I, класса II или класса III, регламентирующими конструкцию, скорости и распределение воздушных потоков, системы вытяжки. Существуют специальные международные стандарты для боксов биологической безопасности:

- американский стандарт NSF 49:2002, (сокр. US);
- европейский стандарт EN 12469:2000, (сокр. EN);
- австралийский стандарт AS 2252;
- японский стандарт JIS K 3800:2000.

Боксы биологической безопасности используются для физической изоляции (удержания и контролируемого удаления из рабочей зоны) микроорганизмов с целью предотвращения возможности заражения персонала и контаминации воздуха рабочей зоны и окружающей среды. Согласно европейскому стандарту EN 12469:2000 различают три класса боксов биологической безопасности.

Выбор ламинарного бокса зависит только от требований к чистоте воздушной среды в рабочей зоне бокса, в то время как выбор бокса микробиологической безопасности основывается на следующих факторах:

- степень риска, сопутствующая работе с используемым в эксперименте агентом;
- возможность образования аэрозолей при применении конкретной лабораторной методики;
- необходимость предохранения эксперимента от воздушной контаминации.

Боксы I класса биологической безопасности характеризуются наиболее простой конструкцией, это бокс с передним окном, через которое оператор может производить манипуляции внутри бокса, сконструированный таким образом, чтобы обеспечить защиту оператора. Схема работы такого бокса следующая: через окно в ламинар поступает воздух, по восходящему потоку он поднимается вверх и подвергается фильтрации. В ходе проводимых микробиологических работ внутри рабочего пространства бокса образуется аэрозоль, содержащий потенциально опасные агенты. Этот аэрозоль захватывается воздушным потоком, посту-

пающим в рабочую зону бокса, и проходит через специальную систему фильтрации.

Таким образом, воздушный поток, выходящий из бокса, является очищенным от всех частиц. Система фильтрации обычно представляет собой комбинацию предфильтра и НЕРА-фильтра. Несмотря на то, что боксы биологической безопасности I класса эффективно защищают оператора и окружающую среду от агентов, представляющих биологическую опасность, они не защищают продукт, с которым проводится работа в боксе от возможного загрязнения, привносимого воздухом из внешней среды. Таким образом, результаты исследования могут быть искажены возможным загрязнением и/или перекрестным загрязнением, поэтому часто боксы биологической безопасности I класса считаются устаревшими. В настоящее время использование таких боксов ограничено.

Боксы I класса биологической безопасности применяются для работы с патогенными агентами, опасными или потенциально опасными для здоровья человека и/или окружающей среды, для изоляции оборудования и/или процедур, при которых возможно образование аэрозолей. Принцип его действия основан на принудительном удалении опасных веществ из рабочей зоны потоком воздуха, очистке удаляемого воздуха из боксов биологической безопасности системой фильтрации и выбросе воздуха во внешнюю среду.

Следует отметить, что ламинарный бокс I класса защиты в отечественном исполнении существенно отличается принципом работы от MSC class 1 согласно мировой классификации. В нем применяются воздушные нисходящие потоки, направленные **извне** бокса, что не совпадает с мировыми стандартами, согласно которым в основе работы бокса первого класса защиты лежит принудительный забор из помещения воздуха через окно оператора и последующее его удаление через систему фильтров. Соответственно, воздушные потоки направлены из внешней воздушной среды **внутри** бокса.

Бокс биологической безопасности класс II – это бокс с передним окном, через которое оператор может производить манипуляции внутри бокса. Бокс сконструирован таким образом, чтобы обеспечить защиту оператора, при этом чтобы риск загрязнения продукта и перекрестной контаминации был низок, а

удаление контаминации, создаваемой внутри бокса, контролировалось с помощью профильтрованного внутреннего воздушного потока и высокоэффективной фильтрации удаляемого воздуха. Обычным способом достижения этих условий является создание однонаправленного нисходящего воздушного потока внутри ламинарного бокса и воздушной завесы в переднем окне.

Эта завеса называется воздухозабором или входящим потоком. Как известно, воздухозабор препятствует возможности выброса аэрозоля потенциально опасных агентов из рабочей зоны во внешнюю среду. Однако, в отличие от боксов биологической безопасности I класса, входящий поток в боксах биологической безопасности II класса поступает не сразу в рабочую зону, а уходит в решетку воздухозабора, расположенную рядом с оператором. Таким образом, предотвращается возможное загрязнение продукта, привносимое из внешней среды.

Бокс такого класса обеспечивает защиту человека от патогенных микроорганизмов, передающихся воздушно-капельным путем. Широко применяется в микробиологических, фармацевтических, научно-исследовательских и других типах лабораторий.

Основное различие между боксами биологической безопасности II класса заключается, в основном, в процентном соотношении выходящего и рециркулирующего воздуха. Кроме того, боксы биологической безопасности II класса могут иметь разные системы вывода выходящего потока. Одни боксы могут возвращать воздух непосредственно в лабораторию, другие должны быть подключены к внешней вытяжке.

Несмотря на эти различия, все боксы биологической безопасности II класса, как и боксы биологической безопасности I класса, защищают и оператора и окружающую среду от агентов, представляющих потенциальную биологическую угрозу. Кроме того, боксы биологической безопасности II класса защищают продукт от возможного загрязнения и подходят для работы с микроорганизмами 1, 2 и 3 уровнем биологической безопасности.

Боксы биологической безопасности II класса, тип А – это самый распространенный тип боксов биологической безопасности. В них выходящий воздух составляет 30 % общего воздушно-го потока, а 70 % общего забранного воздуха поступает на рециркуляцию в рабочую зону, создавая нисходящий поток. Во время эксплуатации боксов типа А в них создаются зоны повышенного

давления, а выходящий воздух поступает непосредственно назад в лабораторию. НЕРА-фильтры эффективно очищают выходящий воздух от различных аэрозолей, но они не задерживают химические испарения. Если в ходе работы наряду с биологически опасными агентами используются токсические химические вещества, эти боксы использовать не рекомендуется.

В боксах биологической безопасности II класса типа A1 зоны повышенного давления непосредственно граничат с окружающей средой, а в боксах типа A2 зоны повышенного давления дополнительно окружены специальными зонами пониженного давления. В случае непредвиденной протечки воздух из контрольной зоны повышенного давления, содержащий потенциально опасные вещества, не попадет наружу, а будет задержан зоной низкого давления. Поэтому в настоящее время боксы биологической безопасности II класса типа A1 считаются устаревшими, а боксы типа A2 – максимально безопасными для работы.

Таким образом, сейчас тип А боксов биологической безопасности II класса – это боксы типа A2, в которых 70 % воздуха из зоны повышенного давления поступает на рециркуляцию в виде нисходящего потока, а 30 % воздуха проходит очистку НЕРА-фильтром и выходит наружу.

Боксы биологической безопасности II класса, тип В. Главное отличие боксов биологической безопасности типа В от типа А состоит в том, что боксы типа В должны быть обязательно подключены к внешней вытяжке с внешним вентилятором. Собственный вентилятор бокса типа В создает только нисходящий поток, а входящий поток воздуха через решетку воздухозабора, создающий динамический барьер для защиты оператора, обеспечивается внешним вентилятором. При отсутствии внешнего вентилятора воздух, содержащий потенциально опасные микробиологические агенты, будет поступать из рабочей зоны прямо на оператора. Во всех боксах биологической безопасности II класса типа В2 может быть дополнительно усилена функция защиты окружающей среды. Между НЕРА-фильтром, очищающим воздух на выходе, и конечной точкой выхода воздуха по системе вытяжных воздуховодов в окружающую среду может быть установлена дополнительная система очистки воздуха от химических соединений.

Боксы биологической безопасности II класса типа В, главным образом, рекомендуются при микробиологической работе, в которой используются летучие химические соединения. Однако, независимо от наличия в работе химических веществ, этот тип боксов характеризуется повышенным уровнем биологической безопасности по сравнению с классом А. Поскольку в боксах типа В выходящий воздух подается непосредственно во внешнюю вытяжку, существует дополнительная гарантия безопасности оператора в случае непредвиденного нарушения работы НЕРА-фильтра на выходе.

Боксы биологической безопасности II класса, тип В1. В боксах этого типа 30 % воздуха из контрольной зоны направляется на рециркуляцию, а 70 % – на выход. В боксах типа В1 можно пренебречь рециркуляцией, если проводить все манипуляции у задней стенки рабочей зоны. Однако, из-за существующей рециркуляции, проведение работ с использованием летучих химических соединений в данном типе бокса не рекомендуется.

Боксы биологической безопасности II класса, тип В2. В боксах биологической безопасности II класса типа В2 рециркуляция воздуха отсутствует. И поток воздуха забора и нисходящий поток проходят очистку НЕРА-фильтром на выходе без рециркуляции. Поскольку в боксах этого типа рециркуляция отсутствует полностью, они рекомендуются для проведения микробиологических работ с использованием токсических химических веществ. В общем, именно боксы типа В2 являются наиболее безопасными среди всех боксов биологической безопасности II класса. Система вытяжной вентиляции всего выходящего потока является дополнительной гарантией безопасной работы в случае непредвиденного сбоя в системе нисходящего потока и/или НЕРА-фильтрации на выходе.

Бокс биологической безопасности класс III – это бокс, в котором рабочая зона полностью изолирована от внешней среды, а оператор отделен от рабочего места физическим барьером и может проводить манипуляции в рабочей камере бокса только через перчатки, механически соединенные с боксом. Профильтрованный воздух постоянно подается в бокс, а удаляемый воздух, очищенный минимум двойными высокоэффективными фильтрами, через собственную вытяжную систему выводится во внешнюю среду.

Боксы такого типа обычно оснащены герметичной изоляцией рабочей камеры от внешней среды; высокоэффективными системами фильтрации воздуха, как подаваемого в рабочую камеру, так и удаляемого из бокса. В рабочей камере бокса поддерживается отрицательное давление относительно атмосферного (не менее 200 Па), для контроля на задней панели бокса установлен манометр. Боксы оснащаются шлюзами проходного типа с блокирующимися дверями для передачи предметов в рабочую камеру бокса и удаления предметов из бокса, а также УФ-лампами для обработки рабочей камеры и шлюза.

В случае подключения бокса биологической безопасности III класса к внешней вытяжке, микробиологическая работа в нем может проводиться с использованием токсических веществ.

Бокс применяется при работе с особо опасным микробиологическим материалом, вирусами, бактериями (согласно СП 1.3.1285-2003 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности»); при работе с химическими веществами, требующими контроля состава атмосферы; при работе с радиоизотопами, канцерогенами; при сборке электронных компонентов, а также в фармацевтике, криминалистике, в органическом синтезе.

HEPA и ULPA-фильтры. Главный компонент бокса биологической безопасности – это современные высокоэффективные фильтры из борсиликатного микроволоконного стекла, сложенного в пачку тонкими, толщиной с бумагу, листами. Существует две основных модели таких фильтров:

- HEPA-фильтры (High Efficiency Particulate Air), современные модели которых обеспечивают эффективность очистки не менее 99,95 % для частиц размером 0,3 мкм;
- ULPA-фильтры (Ultra Low Penetration Air), современные модели которых обеспечивают эффективность очистки не менее 99,999 % для частиц размером 0,1–0,2 мкм.

Все боксы биологической безопасности подлежат обязательной сертификации (валидации), которая проводится только квалифицированными специалистами испытательной лаборатории, проверяющими и оценивающими работу бокса, функционирование и безопасность всех систем согласно валидационным протоколам. Рекомендованные сроки проведения валидации: при

первой установке бокса в лаборатории и затем регулярно, с периодичностью раз в год.

При оценке эффективности работы бокса проверяется его герметичность, возможность утечки в НЕРА-фильтрах, профиль скорости нисходящего потока, скорость потока у открытого пространства, соотношение разреженного давления и мощности воздушных потоков, тестируются воздушные потоки в рабочей зоне, проверяется работа системы сигнализации и блокираторов. Дополнительно проверяется возможность утечки в электросети, тестируются интенсивность освещения ламп дневного света и УФ-ламп, уровень шума и вибрации.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один правильный ответ.

1. ПРОИЗВОДСТВО СТЕРИЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ ДОЛЖНО БЫТЬ ОРГАНИЗОВАНО В

- 1) специальных лабораториях с микробиологическим контролем
- 2) помещениях, оснащенных вентиляционными системами
- 3) чистых помещениях (зонах) с воздушными шлюзами для обеспечения доступа персонала и перемещения оборудования и материалов

2. ОСНАЩЕННОЕ СОСТОЯНИЕ – СОСТОЯНИЕ, В КОТОРОМ

- 1) технологическое оборудование функционирует в требуемом режиме с заданным числом работающего персонала
- 2) чистое помещение построено и функционирует, технологическое оборудование полностью укомплектовано, но персонал отсутствует
- 3) чистое помещение и технологическое оборудование находятся на стадии разработки

3. ЭКСПЛУАТИРУЕМОЕ СОСТОЯНИЕ – ЭТО СОСТОЯНИЕ ЧИСТОГО ПОМЕЩЕНИЯ, В КОТОРОМ

- 1) технологическое оборудование функционирует в требуемом режиме с заданным числом работающего персонала
- 2) чистое помещение построено и функционирует, технологическое оборудование полностью укомплектовано, но персонал отсутствует
- 3) чистое помещение и технологическое оборудование находятся на стадии разработки

4. ЧИСТЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ ТИПА А – ЭТО

- 1) локальная зона для проведения операций, представляющих высокий риск для качества продукции
- 2) зона, предназначенная для асептического приготовления и наполнения
- 3) зона для выполнения менее ответственных стадий производства стерильной продукции

5. ЧИСТЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ ТИПА В – ЭТО

- 1) локальная зона для проведения операций, представляющих высокий риск для качества продукции
- 2) зона, предназначенная для асептического приготовления и наполнения
- 3) зона для выполнения менее ответственных стадий производства стерильной продукции

6. ЧИСТЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ ТИПА С – ЭТО

- 1) локальная зона для проведения операций, представляющих высокий риск для качества продукции
- 2) зона, предназначенная для асептического приготовления и наполнения
- 3) зона для выполнения менее ответственных стадий производства стерильной продукции

7. ОПЕРАЦИЯ АСЕПТИЧЕСКОГО ПРИГОТОВЛЕНИЯ И НАПОЛНЕНИЯ ПРОВОДИТСЯ В ЗОНЕ

- 1) А
- 2) В
- 3) С
- 4) D

8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ, ПОДЛЕЖАЩИХ ФИЛЬТРАЦИИ, ПРОВОДИТСЯ В ЗОНЕ

- 1) А
- 2) В
- 3) С
- 4) D

9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И НАПОЛНЕНИЕ МАЗЯМИ, КРЕМАМИ, СУСПЕНЗИЯМИ И ЭМУЛЬСИЯМИ ПЕРЕД ФИНИШНОЙ СТЕРИЛИЗАЦИЕЙ, ПРОВОДИТСЯ В ЗОНЕ

- 1) А
- 2) В
- 3) С
- 4) D

10. ЗАМКНУТОЕ ПОМЕЩЕНИЕ С ДВУМЯ ИЛИ БОЛЕЕ ДВЕРЯМИ, РАСПОЛОЖЕННОЕ МЕЖДУ ПОМЕЩЕНИЯМИ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ ЧИСТОТЫ И СЛУЖАЩЕЕ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ПРОНИКНОВЕНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ И МИКРООРГАНИЗМОВ В СОСЕДНИЕ ПОМЕЩЕНИЯ – ЭТО

- 1) ламинарный бокс
- 2) чистая зона
- 3) укрытие
- 4) воздушный шлюз

Глава 5

МИКРОФЛОРА ВОЗДУХА И МЕТОДЫ ЕЕ ИЗУЧЕНИЯ

5.1. Микрофлора воздуха помещений и возможные пути ее загрязнения

Загрязнение воздуха закрытых помещений является следствием физиологических обменных процессов человека, бытовых действий и других факторов, а также определяется составом приточного атмосферного воздуха и веществами-загрязнителями.

Наибольшее количество микроорганизмов содержится в воздухе закрытых помещений при большом скоплении людей, плохой вентиляции, при нарушении санитарного режима и личной гигиены.

Согласно требованиям мониторинг состояния окружающей среды, в том числе на фармацевтических предприятиях, должен выявлять не только микробную загрязненность воздуха но и вероятные пути его загрязнения, обеспечивая при этом возможность принятия превентивных мер.

Микробиологический мониторинг – один из наиболее важных видов лабораторного контроля процесса фармацевтического производства, предоставляющий информацию о качестве окружающей среды асептического технологического процесса и позволяющий предотвратить выпуск потенциально загрязненного продукта, а также предупредить возможность такового загрязнения в будущем за счет выявления неблагоприятных тенденций.

Оценка микробиологического статуса чистой зоны является ценным способом эффективного контроля состояния производственной среды и напоминает обслуживающему персоналу о важности соблюдения условий асептики.

Контроль за состоянием окружающей среды является только одной составляющей процесса обеспечения стерильных условий производства.

Другие его элементы включают:

- правильно спроектированный комплекс чистых помещений;
- эффективную обработку воздуха;
- уборку и дезинфекцию;
- строгое соблюдение персоналом требований техники асептического процесса;
- подбор соответствующей технологической одежды для работы в чистой зоне;
- соблюдение правил и режимов стерилизации материалов, предназначенных для использования в асептических условиях;
- адекватный мониторинг других контролируемых параметров (таких как направление и скорость воздушного потока и давление воздуха в помещении).

Существует много путей загрязнения чистой зоны. Наиболее вероятным источником микробного загрязнения в контролируемой чистой зоне является персонал. Загрязнение может происходить в раздевалке, где сотрудники надевают технологическую стерильную одежду. Если процедура переодевания происходит с нарушениями, микроорганизмы могут проникать в чистую зону с поверхности спецодежды, перчаток, бахил. Одежда, предназначенная для ношения в чистой зоне, должна быть хорошо подогнана и изготовлена из материала, не выделяющего волокна или частицы пыли. Персонал должен быть обучен асептической технике с тем, чтобы не допускать загрязнения стерильных перчаток и технологической одежды.

Другим возможным источником загрязнения микроорганизмами, которые не могут распространяться путем передачи через твердые поверхности, является вода. Согласно нормативным требованиям, в чистых и во вспомогательных зонах чистого помещения, необходимо использовать воду фармацевтической категории, что должно контролироваться и проверяться микробиологическими методами.

Причинами микробного загрязнения также могут быть нарушения воздушного потока, перемещения воздушных масс и неправильная эксплуатация воздушных фильтров (HEPA). В высокоэффективных воздушных фильтрах не должно быть нарушений

герметизации в области крепления прокладок, рамок и ткани. При интенсивном перемещении воздушные массы могут подхватывать частицы слущенного эпидермиса или пыли, поэтому проект чистого помещения или зоны должен предусматривать такое направление воздушного потока, которое обеспечивает удаление загрязняющих частиц с продукта, из зоны расфасовки и других контролируемых зон. Надлежащий проект чистого помещения гарантирует однонаправленный воздушный поток без турбулентности или застойных зон.

Цель программы микробиологического мониторинга окружающей среды заключается в выявлении изменений показателя количества колониеобразующих единиц (КОЕ) или выявлении видов микроорганизмов, не укладывающихся в нормативные показатели.

К микроорганизмам, которые наиболее часто могут быть выделены из воздуха асептического производства, относятся такие бактерии, как стафилококк и разновидности микрококка (грамположительные кокки). Кроме этого, обнаруживаются переносимые по воздуху бактериальные (например, виды *Bacillus*) и грибковые (например, виды *Aspergillus* или *Penicillium*) споры, реже – грамотрицательные кокки (например, виды *Enterobacter*).

5.2. Методы микробиологического контроля воздуха и нормы допустимого количества микроорганизмов в помещениях различных классов чистоты

Существует два основных метода забора проб воздуха для определения микробного загрязнения: активный и пассивный.

Активный отбор проб воздуха рассматривается как количественный метод, поскольку позволяет определить количество жизнеспособных микроорганизмов в определенном объеме воздуха (например, выраженное в КОЕ/м³). Возможны различные способы активного отбора проб воздуха, включая использование фильтрующих и центрифужных импакторов, щелевого пробоотборника с агаром, вакуумных проб с различных поверхностей, метода фильтрации или жидкостных импинджеров, а также ручных пробоотборников.

В щелевом пробоотборнике чашка с агаром (обычно диаметром 140 мм) устанавливается на вращающийся стенд под воздухозаборником с четырьмя перпендикулярными щелями в нем. Воздух втягивается через эти щели насосом, присоединенным к устройству посредством гибкого шланга. При этом воздух со всеми содержащимися в нем частицами контактирует с поверхностью агара во вращающейся чашке. В комбинированных переносных устройствах насос находится в корпусе прибора. Чашка с агаром располагается в верхней части устройства, которое имеет перфорированную крышку, через отверстия в которой втягивается воздух. Воздух вместе со взвешенными частицами контактирует с поверхностью агара перед выходом через заднюю стенку прибора.

Пассивный отбор проб воздуха осуществляется посредством расположения чашек Петри с питательным агаром в исследуемых зонах для экспонирования поверхности агара в течение установленного времени. В 1981 году Ассоциация производителей препаратов для парентерального введения (PDA) рекомендовала только 30-ти минутную экспозицию, однако позднее другие руководства советовали увеличить ее продолжительность до 4 часов. Смысл последнего предложения заключается в том, что большая продолжительность экспозиции повышает чувствительность метода.

Использование седиментационных чашек сравнительно недорого, не требует никакого дополнительного оборудования. А также, при их применении менее вероятно возникновение нарушений воздушного потока в чистой зоне, чем при активном отборе воздушных проб (табл. 9).

Таблица 9

Преимущества и ограничения в применении
седиментационного метода

Преимущества	Ограничения
Простота использования	Отбор только быстро оседающих больших частиц
Не требует процесса посева	Влияние температуры на эффективность сбора

Различные типы питательной среды могут быть использованы для проращивания плесени, грибов, всего спектра микроорганизмов или отдельного вида	Сильное влияние скорости и направления воздушного потока по отношению к поверхности среды на результаты теста
Очень экономичен	Неопределенность объема отобранной пробы

Расположение точек отбора проб воздуха устанавливается в процессе первичной или повторной аттестации чистого помещения или чистой зоны (табл. 10).

Ключевыми точками для отбора проб при текущем мониторинге являются:

- зоны наиболее высокой вероятности контаминации продукта;
- зоны наибольшего риска скопления микроорганизмов при нормальном рабочем процессе (накопление пыли на поверхностях с электростатическими свойствами, более холодных поверхностях; дверные ручки и т. д.);
- труднодоступные зоны для уборки и дезинфекции;
- точки смежных зон А, В (100);
- потенциальные источники контаминации;
- зоны возмущения воздушного потока.

Таблица 10

Примеры точек отбора проб, которые могут считаться наиболее существенными

Система	Точка отбора пробы
Воздух (линия розлива)	Около наполняемых емкостей
Воздух помещения	Точки входа и выхода вентиляционной системы, зона манипуляций с продуктом
Вода	Кран водопользования или наполнительной емкости
Поверхность (помещение)	Рабочий стол
Поверхность (оборудование)	Поверхности, контактирующие с продуктом
Оператор линии розлива	Руки в перчатках
Сжатый воздух	Наиболее удаленная от компрессора точка
Ламинарный поток	Около объектов, создающих возмущение потока

Ключевыми точками для отбора проб при текущем мониторинге являются:

- зоны наиболее высокой вероятности контаминации продукта;
- зоны наибольшего риска скопления микроорганизмов при нормальном рабочем процессе (накопление пыли на поверхностях с электростатическими свойствами, более холодных поверхностях; дверные ручки и т. д.);
- труднодоступные зоны для уборки и дезинфекции;
- точки смежных зон А, В (100);
- потенциальные источники контаминации;
- зоны возмущения воздушного потока.

Частота отбора проб зависит от установленного класса чистоты для данного помещения и от вида обработки, которой подвергается продукт далее в процессе его производства.

Зоны класса А должны проверяться каждую рабочую смену, зоны класса В также могут проверяться каждую смену или ежедневно, в то время как вспомогательные зоны могут проверяться с меньшей периодичностью, например: зоны класса С – два раза в неделю, зоны класса D – еженедельно.

Для сравнительного анализа состояний производственной среды, отбор проб должен проводиться в одно и то же, фиксированное в плане время, т. е. приходится на равнозначную по интенсивности технологического процесса временную точку.

Выбор питательной среды для проведения микробиологического мониторинга воздуха является одним из важных факторов. Питательная среда должна поддерживать рост широкого спектра микроорганизмов, включая дрожжи и грибы.

Средой для контроля микробной загрязненности воздуха является среда № 1 (питательный агар) (по ГФ изд. X III) для бактерий и среда № 2 (агар Сабуро) для дрожжей и грибов. Посевы на среде № 1 инкубируются при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С, на агаре Сабуро – $22,5 \pm 2,5$ °С. Перед исследованиями, разлитые в чашки Петри или на пластины, питательные среды необходимо выдерживать в термостате при температуре от 30 до 35 °С в течение 24 ч для подтверждения их стерильности. Проросшие чашки бракуют. Ростовые свойства питательных сред должны быть проверены соответствующими тест-штаммами для среды № 1 и среды № 2 по ГФ изд. XIII. Полученные значения сравнивают с контролем (табл. 11).

Рекомендуемые предельные значения допустимого микробного загрязнения чистых зон в эксплуатируемом состоянии

Зона	Рекомендуемые предельные значения микробного загрязнения*			
	В воздухе, КОЕ/м	Седиментация на чашку диаметром 90 мм, КОЕ за 4 ч**	Контактные пластины диаметром 55 мм, КОЕ/пластина	Отпечаток перчатки (5 пальцев), КОЕ/перчатка
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Примечание: * указаны средние значения,

** допускается экспонирование отдельных седиментационных пластин менее 4 ч.

Анализ результатов текущего контроля должен давать постоянную оценку соответствия асептического процесса установленному уровню, т. е. удалось ли достичь установленного класса чистоты для данного помещения. Программа корректирующих мероприятий при превышении установленного уровня действия должна быть разработана каждым производителем индивидуально, с учетом конкретных производственных условий, документально оформлена. Протоколы заполняются результатами предусмотренных дополнительных контролей, выводы проведенных исследований подписываются ответственными лицами. Уровни тревоги и действия должны периодически пересматриваться в соответствии с модернизацией процессов или потоков и технологий.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один правильный ответ.

1. НАИБОЛЕЕ ВЕРОЯТНЫМИ ИСТОЧНИКАМИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОЗДУХА В ЧИСТОЙ ЗОНЕ ЯВЛЯЮТСЯ
 - 1) верхняя одежда персонала
 - 2) личные вещи
 - 3) технологический персонал
 - 4) вода для инъекций

2. НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ИЗ ВОЗДУХА ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ВЫДЕЛЯЮТ МИКРООРГАНИЗМЫ

- 1) микрококки
- 2) нейссерии
- 3) вибрионы
- 4) спириллы

3. ПРЕИМУЩЕСТВОМ СЕДИМЕНТАЦИОННОГО МЕТОДА ПОСЕВА ВОЗДУХА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) отбор быстро оседающих больших частиц
- 2) влияние температуры на эффективность отбора
- 3) простота использования
- 4) сложность использования

4. ОГРАНИЧЕНИЯМИ ПРИМЕНЕНИЯ СЕДИМЕНТАЦИОННОГО МЕТОДА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) отбор быстро оседающих больших частиц
- 2) экономичность
- 3) простота использования
- 4) сложность использования

5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ЧИСТОТУ ВОЗДУХА ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ЗОНЫ А КОНТРОЛИРУЮТ

- 1) каждую рабочую смену
- 2) один раз в день
- 3) один раз в неделю
- 4) по мере необходимости

6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ЧИСТОТУ ВОЗДУХА ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ЗОНЫ В КОНТРОЛИРУЮТ

- 1) каждую рабочую смену
- 2) один раз в день
- 3) один раз в неделю
- 4) по мере необходимости

7. ДЛЯ КОНТРОЛЯ МИКРОБНОЙ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ВОЗДУХА ПРИМЕНЯЕТСЯ СРЕДА

- 1) Эндо
- 2) Плоскирева
- 3) Сабуро
- 4) питательный агар

8. ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ГРИБКОВ В ВОЗДУХЕ ПРИМЕНЯЕТСЯ СРЕДА

- 1) Эндо
- 2) Плоскирева
- 3) Сабуро
- 4) питательный агар

9. В ЗОНЕ А ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ВОЗДУХА СЕДИМЕНТАЦИОННЫМ МЕТОДОМ ДОПУСКАЕТСЯ

- 1) > 1 КОЕ
- 2) < 1 КОЕ
- 3) до 10 КОЕ
- 4) до 100 КОЕ

10. В ЗОНЕ В ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ВОЗДУХА СЕДИМЕНТАЦИОННЫМ МЕТОДОМ ДОПУСКАЕТСЯ

- 1) > 1 КОЕ
- 2) < 1 КОЕ
- 3) до 5 КОЕ
- 4) до 10 КОЕ

Глава 6

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЯХ

6.1. Требования к санитарному состоянию чистых помещений

Основной целью программы оценки микробиологического состояния производственной среды является постоянная гарантия стабильности асептических условий производства лекарственных препаратов, выявление начальных отклонений и выработка корректирующих действий до возникновения ситуаций, приводящих к появлению нестерильной продукции.

Поэтому необходим качественный и количественный контроль асептических условий (класса чистоты рабочих зон).

Программа микробиологического мониторинга окружающей среды наряду с исследованием бактериальной контаминации воздуха должна охватывать и оценку бактериальной загрязненности критических поверхностей, рук и одежды персонала, работающего на фармацевтическом производстве. Критическими поверхностями являются поверхности, непосредственно контактирующие со стерильным материалом.

Объекты микробиологического мониторинга:

- технологическое оборудование;
- рабочие поверхности столов;
- поверхности шкафов;
- передаточные шлюзы;
- руки персонала в перчатках;
- одежда персонала;
- контейнеры, в которых хранится продукт.

Частота отбора проб зависит от класса чистоты помещения:

- зоны класса А – каждую рабочую смену;
- зоны класса В – каждую смену или ежедневно;

- зоны класса С – 2 раза в неделю;
- зоны класса D – еженедельно.

Перечисленные ниже (табл. 12) точки отбора проб выбираются каждым предприятием индивидуально, с учетом конкретных производственных условий.

Таблица 12

Примеры точек отбора проб,
которые могут считаться наиболее существенными

Система	Точка отбора пробы
Вода	Кран водопользования или наполнительной емкости
Поверхность (помещение)	Рабочий стол
Поверхность (оборудование)	Поверхности, контактирующие с продуктом
Оператор линии розлива	Руки в перчатках
Технологический персонал	Халаты, бахилы, шлемы

Для сравнительного анализа состояний производственной среды, отбор проб должен проводиться в одно и то же, фиксированное в плане время, т. е. приходится на равнозначную по интенсивности технологического процесса временную точку.

Следующие временные точки (табл. 13) для отбора проб являются обязательными.

Таблица 13

Временные точки для отбора проб

Контроль элементов среды	Время
Технологическая одежда	До начала или после окончания работы
Поверхности	Перед работой
Руки оператора	Перед выполнением асептических манипуляций

Дополнительно, могут проводиться исследования по окончании работы для оценки бактериальной нагрузки за рабочую смену.

6.2. Микробиологический контроль оборудования чистых помещений

Контроль микробной контаминации поверхностей: может проводиться методом смыва и контактных пластинок.

Контактные чашки применяют для взятия проб с плоских поверхностей оборудования, ограждающих конструкций, рабочих столешниц и т. п. Эти специально разработанные чашки с агаром имеют куполообразную поверхность, которую осторожно прижимают к поверхности для переноса с нее искомым микроорганизмов на поверхность агара. Этот метод считается количественным, поскольку он позволяет подсчитать число жизнеспособных микроорганизмов на определенной площади поверхности.

Для взятия проб с нелинейных или труднодоступных поверхностей прибегают к помощи тампонов. Забор пробы с площади исследуемой поверхности осуществляют увлажненным тампоном. Затем этот тампон может быть использован для непосредственной инокуляции чашки Петри со средой или для погружения в растворитель или транспортную среду, которые затем используются для посева на чашку Петри.

При использовании любого из этих двух методов в состав питательных сред могут быть включены нейтрализующие компоненты, призванные противодействовать остаточным количествам антисептиков и моющих средств, которые могут оставаться на исследуемых поверхностях.

1. Метод смыва с поверхностей: смывы с поверхностей проводят стерильным ватным тампоном, укрепленном на стеклянном или металлическом держателе, вмонтированном в ватно-марлевую пробку пробирки. В пробирке должно содержаться приблизительно 2 мл стерильной воды для инъекций. Увлажненным тампоном протирают исследуемую поверхность. Исследуемая поверхность крупного оборудования соответствует 100 см^2 , с мелкого оборудования берут смыв со всей площади. Репрезентативной считается проба, снятая с поверхности площадью от 24 до 30 см^2 . После взятия пробы тампоном проводят несколько раз по поверхности питательной среды в двух параллельных чашках Петри со средой для бактерий (питательный агар) и со средой для грибов среда Сабуро). Чашки инкубируют, после чего проводят подсчет колоний на двух параллельных чашках и определяют среднее арифметическое.

2. Метод контактных пластин: контактные пластины – агаризованная питательная среда, разлитая на специальные пластины или в чашки Петри таким образом, чтобы поверхность агара выступала над краем чашки Петри. Стерильная поверхность пита-

тельной среды накладывается на исследуемую поверхность. После инкубации в соответствии со сроками и температурой для используемых сред проводят подсчет колоний и микроскопируют окрашенные по Граму мазки. Метод контактных пластин подходит для тестирования гладких и ровных поверхностей (рабочий стол, стены, пол или одежда персонала).

В чистых помещениях исследуемые объекты не должны содержать микроорганизмов.

6.3. Микробиологический контроль технологической одежды и рук персонала

Поверхность рук является потенциальным источником загрязнения, поэтому следует периодически осуществлять исследование рабочих перчаток, которое проводится путем прижатия всех пальцев рук, включая большие, к поверхности агара в чашке Петри; после этого перчатки заменяются чистым комплектом. В конце смены может быть протестирована и рабочая одежда с использованием контактных чашек или тампонов.

Для определения микробной контаминации перчаток персонала отпечатки пяти пальцев каждой руки (в перчатках) делают на поверхность плотной питательной среды для бактерий и для грибов (параллельно). Чтобы касание было полным, рекомендуется сделать скользящее движение пальцами по всей поверхности агара. Чашки инкубируют и проводят подсчет выросших колоний микроорганизмов.

Определение микробной контаминация одежды персонала обычно проводят на предплечьях комбинезона с помощью контактных пластин. Также проверяются бахилы. Можно применять метод смыва тампоном. Для этого делают смывы увлажненным тампоном с 4 участков площадью по 25 см² каждый на нижней части двух рукавов, верхней передней поверхности комбинезона (халата) и шлеме. Чашки инкубируют и проводят подсчет выросших колоний микроорганизмов. В посевах перчаток и технологической одежды персонала, работающего в чистых помещениях микроорганизмов не должно быть.

Все выявленные в процессе проведения мониторинга микроорганизмы подлежат обязательной макроскопической и микроскопической идентификации. Идентификация дает возможность

предположить источник контаминации, основываясь на преимущественном распространении микроорганизмов во внешней среде. При обнаружении споровых бактерий или грибов необходимо проводить дополнительную дезинфекцию помещений. При наличии на месте всех элементов программы надлежащего контроля за состоянием окружающей среды производитель может быть уверен в соблюдении требований, предъявляемых к асептическому технологическому процессу.

К питательным средам, наиболее часто используемым в процессе мониторинга окружающей среды, относятся триптоново-соевый агар (TSA) – универсальная среда, пригодная для культивирования широкого спектра микроорганизмов, а также декстрозный агар Сабуро (SDA) – идеальная среда для роста дрожжей и плесневых грибов. Другие используемые ключевые питательные среды включают: агар R2A; агар Мак-Конки (для бактерий группы кишечной палочки); агар XLD (для сальмонелл); цетримидный агар (для *Pseudomonas aeruginosa*); солевой агар с маннитом (для стафилококков); агар DCA (для кишечной флоры); агар Байрд-Паркера (для *Staphylococcus aureus*).

В настоящее время популярны готовые к использованию питательные среды фабричного изготовления, поскольку они обеспечивают унифицированные характеристики продукта. Предполагается контроль качества применяемых питательных сред со стороны фармацевтических компаний с использованием количественной методологии и низкого уровня инокулята. Поэтому предпочтительно, чтобы готовая к применению питательная среда была протестирована подобным образом и обеспечивалась соответствующей сопроводительной документацией.

Готовые питательные среды обычно выпускаются в чашках Петри диаметром 90 или 140 мм или в контактных чашках. Коммерчески доступен целый ряд стерилизованных облучением продуктов, пригодных для использования в чистых зонах. Существует также непроницаемая изолирующая наружная упаковка, которая позволяет оставлять чашки, применяемые для контроля окружающей среды, в локальной зоне в момент ее обработки стерилизующими средствами (например, паровой фазой перекиси водорода).

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один правильный ответ.

1. ОТБОР ПРОБ В ЗОНЕ А ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ОБОРУДОВАНИЯ ПРОВОДИТСЯ
 - 1) каждую смену
 - 2) 1 раз в день
 - 3) 1 раз в неделю
 - 4) по мере необходимости

2. ОТБОР ПРОБ В ЗОНЕ В ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ОБОРУДОВАНИЯ ПРОВОДИТСЯ
 - 1) каждую смену
 - 2) ежедневно
 - 3) еженедельно
 - 4) по мере необходимости

3. ОТБОР ПРОБ В ЗОНЕ С ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ОБОРУДОВАНИЯ ПРОВОДИТСЯ
 - 1) 1 раз в день
 - 2) 1 раз в неделю
 - 3) 2 раза в неделю
 - 4) по мере необходимости

4. ОТБОР ПРОБ В ЗОНЕ Д ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ОБОРУДОВАНИЯ ПРОВОДИТСЯ
 - 1) 1 раз в день
 - 2) 1 раз в неделю
 - 3) 2 раза в неделю
 - 4) по мере необходимости

5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ ЗА РАБОЧУЮ СМЕНУ ПРОВОДЯТСЯ
 - 1) до начала работы
 - 2) в процессе работы
 - 3) по окончании работы
 - 4) еженедельно

6. КОНТРОЛЬ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ОБОРУДОВАНИЯ ПРОВОДИТСЯ МЕТОДАМИ
 - 1) прямого посева и смывов
 - 2) прямого посева и контактных пластинок
 - 3) смывов и контактных пластинок
 - 4) прямого посева и серийных разведений

7. ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ОДЕЖДЫ ПЕРСОНАЛА СМЫВЫ БЕРУТ С ПЛОЩАДИ

- 1) 4 участка по 5 см²
- 2) 4 участка по 10 см²
- 3) 4 участка по 25 см²
- 4) 1 участок 100 см²

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ПЕРЧАТОК ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПЕРСОНАЛА ПРОВОДЯТ НА СРЕДАХ

- 1) Сабуро и Эндо
- 2) питательный агар и Эндо
- 3) питательный агар и Плоскирева
- 4) питательный агар и Сабуро

9. ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ОДЕЖДЫ ПЕРСОНАЛА СМЫВЫ БЕРУТ С ПЛОЩАДИ

- 1) 5 см²
- 2) 10 см²
- 3) 25 см²
- 4) 100 см²

10. ПЕРЧАТКИ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКУЮ ОДЕЖДУ ПЕРСОНАЛА, РАБОТАЮЩЕГО В ЗОНЕ А, КОНТРОЛИРУЮТ НА

- 1) общее микробное число и грибы
- 2) общее микробное число и кишечную палочку
- 3) общее микробное число и сальмонеллы
- 4) общее микробное число и спирохеты

Глава 7

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВОДЫ ОЧИЩЕННОЙ И ВОДЫ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ

7.1. Характеристика и правила забора воды очищенной и воды для инъекций. Показатели микробиологического контроля

В настоящее время особое внимание уделяется совершенствованию различных методов контроля лекарственных средств. Это связано с повышением требований к качеству фармацевтической продукции и обеспечением безопасности при ее использовании. Разработка и внедрение современных методов микробиологического контроля является составной частью проблемы перехода к организации производства в соответствии с требованиями Правил правильного производства (ОСТ 42-510-98) – национальные Российские GMP.

Вода является одним из основных продуктов, используемых фармацевтической промышленностью. Она может использоваться в качестве вспомогательного вещества при производстве лекарственных препаратов, для промывки оборудования, материалов первичной упаковки.

Основными потенциальными источниками микробного загрязнения воды для фармацевтических целей является источник воды и используемое оборудование. Другим источником бактериального загрязнения является система хранения и распределения. При неправильно спроектированной системе и отсутствии периодической санитарной обработки трубопроводов и накопительных емкостей может происходить увеличение количества микроорганизмов, что является причиной контаминации следующего далее оборудования водоподготовки.

В зависимости от целей применения в фармации требуется вода различных уровней качества: вода очищенная, вода для инъекций.

Вода очищенная используется для:

- изготовления неинъекционных лекарственных средств;
- получения пара;
- санитарной обработки;
- мытья посуды (за исключением финишного ополаскивания);
- в лабораторной практике.

Для получения воды очищенной регламентированы следующие методы получения: дистилляция, ионный обмен, обратный осмос, ультрафильтрация.

Обработку аппаратов для получения воды очищенной проводят горячим паром в течение 20–30 мин, а первые порции воды, полученной в течение 15–20 мин, сливают. Для обеззараживания трубопроводов используют острый пар из автоклава.

Получение и хранение воды очищенной должно производиться в специально оборудованном для этой цели помещении. Воду используют свежеприготовленной или хранят в закрытых емкостях из материалов не изменяющих ее свойства и защищающих от микробиологических загрязнений не более 3 сут.

Вода для инъекций используется для:

- приготовления стерильных лекарственных средств;
- финишного ополаскивания материалов первичной упаковки.

В производстве воды для инъекций вода очищенная является исходной. Для получения воды для инъекций используют следующие методы: дистилляция, обратный осмос.

Соответственно этому, вода для инъекций должна удовлетворять всем требованиям к качеству воды очищенной, а также быть апиrogenной.

Получение воды для инъекций должно осуществляться в дистилляционном помещении асептического блока, где запрещается выполнять какие либо работы не связанные с перегонкой воды. Воду для инъекций используют свежеприготовленной или хранят при температуре от 5 °С до 20 °С или от 85 °С до 95 °С в закрытых емкостях изготовленных из материалов не изменяющих свойства воды, защищающих от попадания механических включений и микробиологических загрязнений, не более 24 часа.

Основными санитарно-показательными микроорганизмами для воды являются сапрофитные бактерии, указывающие на поступление в воду органических веществ, бактерии – обитатели кишечника человека и теплокровных животных, такие как *E. coli* и *P. aeruginosa*, *S. aureus*. Размножение сапрофитной микрофлоры в системе предварительной подготовки воды для фармацевтических целей может явиться причиной ее вторичного загрязнения. При этом увеличение количества сапрофитов создает дополнительные условия для накопления индикаторных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов в воде. Особое значение это имеет при ежедневном контроле воды в одной и той же точке. Возрастание количества общего микробного числа является сигналом для поиска причины загрязнения.

Для исследования воды на микробиологическую чистоту исследуют общее микробное число бактерий (общее количество микроорганизмов в 1 мл воды), что является косвенным показателем, так как характеризует общее содержание микроорганизмов в воде без их качественной характеристики, а также микроорганизмы *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

В основе микробиологического контроля воды очищенной лежат методы мембранной фильтрации и прямого посева. В 1 мл воды очищенной (ангро) допускается не более 100 аэробных бактерий. В 100 мл не допускается наличие *E. coli* и *P. aeruginosa*, *S. Aureus*.

Для достоверности результатов пробу воды целесообразно отбирать непосредственно из пробоотборного крана (пробоотборника) без полимерных (силиконовых и пр.) шлангов и насадок. Первоначально место отбора (кран или место подсоединения шланга) с помощью распылителя обрабатывают 70 % этиловым спиртом, в некоторых случаях (пробоотборник из нержавеющей стали) используют фламбирование с помощью спиртовки. Сливают воду до 10 л воды при полностью открытом кране. Затем отбирают пробу для микробиологического испытания в стерильную емкость в количестве не менее 1 л.

7.2. Методы микробиологического контроля и нормы допустимого количества микроорганизмов в воде очищенной и в воде для инъекций

Для определения общего числа аэробных бактерий образец тестируемой воды тщательно перемешивают и вносят по 1 мл в две стерильные чашки Петри. В каждую добавляют по 8–10 мл расплавленной и охлажденной до 45 °С среды № 1 (Г.Ф. XIII изд.). Содержимое чашек быстро перемешивают и оставляют до застывания. После застывания чашки переворачивают и инкубируют в течение 24 ч при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С. Подсчитывают все выросшие колонии. Результат выражают средним числом КОЕ в 1 мл исследуемой пробы воды.

Для определения колиформных бактерий проводят мембранную фильтрацию, используя стерильные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Для получения достоверных результатов проводят 3-х кратную мембранную фильтрацию по 100 мл воды. После чего фильтры переносят на заранее разлитый по чашкам Петри агар Эндо. Если анализируемая вода стабильно соответствует нормативам, допустима фильтрация 300 мл воды через один фильтр. Для положительного контроля среды используют посев тест-культуры микроорганизма *Escherichia coli* ATCC 25922 на агар Эндо. Чашки Петри с фильтрами инкубируют в течение 24 ч при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С.

Результат считается отрицательным, если на фильтрах не выросли колонии или колонии имеют нетипичный вид (неровные края, шероховатая поверхность) для *E. coli*. Если отмечается рост колоний: темно-красных, красных с металлическим блеском, с красным центром, выпуклых, блестящих, подсчитывают число колоний каждого типа и проводят идентификацию. Для этого каждую колонию микроскопируют и при выявлении грамотрицательных палочек отсевают на скошенную среду № 1 (Г.Ф. XIII изд.) для получения чистой культуры. В качестве подтверждающих тестов используют оксидазный тест, образование кислоты и газа при ферментации глюкозы.

Таким образом, полученные грамотрицательные палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидаза, ферментирующие глюкозу и редуцирующие нитраты, относятся к общим колиформным бактериям и их наличие в питьевой воде недопустимо.

Для выделения синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) проводят 3-х кратную мембранную фильтрацию по 100 мл очищенной воды, после чего фильтры переносят на заранее разлитую в чашки Петри среду № 9 (цетримидный агар) (Государственная фармакопея XIII изд.). Если анализируемая вода стабильно соответствует нормативам, то допустима фильтрация 300 мл воды через один фильтр. Для положительного контроля среды используют посев тест-микроорганизмов *P. aeruginosa* АТСС 9027 на среду № 9 (цетримидный агар). Чашки Петри с фильтрами инкубируют в течение 72 ч при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С.

Результат считается отрицательным, если на фильтрах вообще не выросли колонии или колонии имеют нетипичный вид. Если отмечается рост зеленоватых, голубо-зеленых, флюоресцирующих колоний, их идентифицируют. В качестве подтверждающих тестов используют окраску по Граму, цитохромоксидазную реакцию и рост при 42 °С в течение 48–72 ч.

Выделенные микроорганизмы относятся к *P. aeruginosa* при наличии сине-зеленого пигмента-пиоционина, грамотрицательной окраске, положительной цитохромоксидазной реакции и росте на питательной среде при 42 °С в течение 48–72 ч.

Для определения в воде *S. aureus* проводят мембранную фильтрацию, используя стерильные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Для получения достоверных результатов проводят 3-х кратную мембранную фильтрацию по 100 мл воды. Фильтры помещают на желточно-солевой агар и инкубируют при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С в течение 24 ч. Подсчитывают блестящие выпуклые колонии белого, палевого, золотистого цвета, окруженные радужной с перламутровым блеском зоной.

При необходимости подтвердить принадлежность таких бактерий к *Staphylococcus aureus* подозрительные колонии пересевают на желточно-солевой агар, микроскопируют, определяют плазмокоагулазную активность. При наличии мелких грамположительных кокков, располагающихся в виде гроздей, и коагулировании плазмы дают положительный ответ.

Определение эндотоксинов и пирогенов. Источниками бактериальных эндотоксинов и пирогенов на производстве лекарственных средств являются многие факторы, в том числе, и вода. Поэтому особое внимание уделяется проверке отсутствия эндо-

токсинов и пирогенов в воде на разных этапах ее получения. На фармацевтических производствах устанавливают содержание эндотоксинов и пирогенов в воде для инъекций, используемой для производства парентеральных препаратов, и в воде очищенной, используемой в производстве субстанций для последующего приготовления парентеральных препаратов.

Существует два основных метода определения эндотоксинов:

1. Определение пирогенности на кроликах – установление всех пирогенов (см. главу 8).
2. ЛАЛ тест (Limulus Amebocyte Lysate Test) – устанавливает эндотоксины (см. главу 8).

В воде очищенной допускается не более 100 КОЕ микроорганизмов при отсутствии *E. coli* и *P. aeruginosa*, *S. aureus*, эндотоксинов менее 0,25 ЕЭ/мл.

В воде для инъекций допускается не более 10 КОЕ в 100 мл, *E. coli* и *P. aeruginosa*, *S. aureus* не должно быть, эндотоксинов менее 0,25 ЕЭ/мл. Вода для инъекций должна быть апиrogenной.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один правильный ответ.

1. ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ВОДА
 - 1) дистиллированная
 - 2) водопроводная
 - 3) очищенная
 - 4) для инъекций
2. ВОДУ ОЧИЩЕННУЮ В СПЕЦИАЛЬНО ОБОРУДОВАННОМ ПОМЕЩЕНИИ ХРАНЯТ НЕ БОЛЕЕ
 - 1) 3 сут
 - 2) 5 сут
 - 3) 10 сут
 - 4) 14 сут
3. ДЛЯ САНИТАРНОЙ ОБРАБОТКИ ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ИСПОЛЬЗУЮТ ВОДУ
 - 1) дистиллированную
 - 2) водопроводную

- 3) очищенную
- 4) для инъекций

4. ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ИСПОЛЬЗУЮТ ВОДУ

- 1) дистиллированную
- 2) водопроводную
- 3) очищенную
- 4) для инъекций

5. ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ВОДЫ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ ИСХОДНОЙ ЯВЛЯЕТСЯ ВОДА

- 1) дистиллированная
- 2) водопроводная
- 3) очищенная
- 4) для инъекций

6. ВОДУ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ В СПЕЦИАЛЬНО ОБОРУДОВАННОМ ПОМЕЩЕНИИ ХРАНЯТ НЕ БОЛЕЕ

- 1) 12 ч
- 2) 24 ч
- 3) 36 ч
- 4) 48 ч

7. ОБЩЕЕ МИКРОБНОЕ ЧИСЛО ВОДЫ – ЭТО КОЛИЧЕСТВО МИКРООРГАНИЗМОВ В ОБЪЕМЕ

- 1) 1 мл
- 2) 10 мл
- 3) 100 мл
- 4) 1000 мл

8. В 1 МЛ ВОДЫ ОЧИЩЕННОЙ ДОПУСКАЕТСЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НЕ БОЛЕЕ

- 1) 1 КОЕ
- 2) 10 КОЕ
- 3) 100 КОЕ
- 4) 1000 КОЕ

9. НАЛИЧИЕ ПОТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ОПРЕДЕЛЯЮТ В ОБЪЕМЕ ВОДЫ

- 1) 1 мл
- 2) 10 мл
- 3) 100 мл
- 4) 1000 мл

10. В 1 мл воды для инъекций допускается микроорганизмов не более

- 1) 1 КОЕ
- 2) 10 КОЕ
- 3) 100 КОЕ
- 4) 1000 КОЕ

Глава 8

КОНТРОЛЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

8.1. Методы испытания стерильности

Основные правила контроля стерильности лекарственных препаратов изложены в ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность Государственной Фармакопеи. Данная фармакопейная статья распространяется на методы испытания на стерильность различных лекарственных средств (ЛС) – препаратов для инъекций, инфузий, глазных капель, пленок, фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, включая биологические лекарственные препараты и их растворители, которые в соответствии с нормативной документацией или фармакопейными статьями должны быть стерильными.

Согласно ОФС.1.2.4.0003.15 испытание на стерильность проводят в асептических условиях в ламинарных боксах или чистых помещениях класса А. Меры, предотвращающие контаминацию, не должны оказывать губительного влияния на микроорганизмы, которые могут содержаться в испытуемых образцах иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП). Условия проведения испытания регулярно контролируют в соответствии с соблюдением надлежащих правил производства и лабораторной практикой.

Существует два основных метода испытания на стерильность: метод прямого посева и метод мембранной фильтрации. Метод мембранной фильтрации используют во всех случаях, когда природа препарата, его физико-химические свойства позволяют фильтровать его через мембранные фильтры. Метод прямого посева используют для испытания на стерильность ЛС, не обладающих антимикробным действием или антимикробное дей-

ствие которых можно устранить разведением или инактивированием, а также для препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

При испытании на стерильность параллельно проводятся соответствующие отрицательные контроли.

Проверка пригодности методики испытания (определение антимикробного действия). Проверку пригодности методики испытания на стерильность следует проводить в следующих случаях:

- при проведении испытания на стерильность нового препарата;
- при внесении любых изменений в экспериментальные условия испытания;
- в случае изменения состава препарата или при изменениях в технологии его производства.

Устранение антимикробного действия препарата. При необходимости устранения антимикробного действия препарата используют следующие методы:

1. Увеличивают разведение препарата, взяв больший объем растворителя или питательной среды (но не более 200 мл). Для ИЛП допускается только разбавление питательной средой. Экспериментально установленное соотношение объемов питательной среды и посевного материала, обеспечивающее нейтрализацию антимикробного действия препарата, должно соблюдаться при испытании препарата на стерильность.

2. Применяют метод мембранной фильтрации с последующим промыванием фильтров, если препарат растворим в водных разбавителях или в изопропилмиристате (ИПМ).

3. Вместо стандартного разбавителя можно использовать стерильную нейтрализующую жидкость, промышленного производства или приготовленную в лаборатории, следующего состава:

- Твина-80 – 30,0 г
 - Лецитина яичного – 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 очищенной – 1000 мл
- pH $7,0 \pm 0,2$

4. Используют неспецифические инактиваторы. Для инактивации консервантов, входящих в состав ряда лекарственных препаратов, в разбавитель или в питательные среды до стерилизации вносят следующие неспецифические инактиваторы: 3 % твина-80 или 0,3 % лецитина (яичного или соевого) от объема среды. В случае, если в препарате имеется более двух консервантов различной химической структуры, в среду вносят 3 % твина-80, 0,3 % лецитина, 0,1 % L-гистидина и 0,5 % натрия тиосульфата одновременно. Если разведение в вышеприведенном растворе не инактивирует антимикробные свойства ЛС, увеличивают концентрацию твина-80 или лецитина.

Для нейтрализации действия других консервантов, входящих в состав ИЛП, инактиваторы не используются, а основным способом устранения их действия является разведение питательной средой. Посев испытуемого препарата в питательную среду проводят в соотношении 1:20, с учетом результатов определения антимикробного действия препарата.

Применяют специфические инактиваторы, нейтрализующие антимикробное действие ЛС, но не угнетающие рост микроорганизмов.

Для инактивации пенициллинов и цефалоспоринов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды перед их применением, асептически вносят стерильный раствор β -лактамазы в количестве, указанном в фармакопейной статье или нормативной документации.

Ингибирующее действие β -лактамазы на пенициллины и цефалоспорины необходимо определять, внося в среды с ферментом и антибиотиком от 50 до 100 КОЕ *S. aureus*. Типичный рост тест-штамма в питательной среде служит подтверждением того, что концентрация фермента β -лактамазы достаточна.

Для инактивации сульфаниламидных препаратов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды, если необходимо, до стерилизации вносят парааминобензойную кислоту (ПАБК) из расчета 0,05–0,1 г/л среды.

8.2. Исследование стерильности лекарственных средств

Отбор образцов для испытания. При проведении испытания на стерильность число контролируемых первичных упаковок определяется с учетом общего количества единиц в серии. Отбирают образцы препарата, как указано в таблице 14. Для посева на соответствующую питательную среду используют образец в количестве, приведенном в таблице 15.

Таблица 14

Количество единиц препарата для проведения испытания на стерильность в зависимости от объема серии

Количество единиц (ампул, флаконов и др.) в серии*	Минимальное количество единиц (ампул, флаконов и др.) для посева на каждую питательную среду**
<i>Парентеральные лекарственные средства:</i>	
Не более 100	10 % или 4
От 100 до 500	10
Более 500	2 % или 20
Парентеральные лекарственные средства большого объема (более 100)	2 % или 10
Антибиотики, твердые формы, ангро***, (более 5 г)	6
<i>Неинъекционные лекарственные средства (в том числе глазные):</i>	
Не более 200	5 % или 2
Более 200	10
<i>Твердые формы, ангро***:</i>	
Не более 4 упаковок	Каждую
Свыше 4, но не более 50	20 % или 4
Свыше 50	2 % или 10

Примечание: * если количество единиц в серии неизвестно, то используют максимальное количество, указанное в колонке;

** если содержимого одной емкости ЛС (кроме ИПП) достаточно для инокулирования двух питательных сред, то в этой колонке приводится количество образцов, необходимых для испытания на стерильность на двух питательных средах;

*** термин для обозначения формы лекарственных средств «ангро» происходит от французского *Un gros*, что означает в данном случае «в большом количестве» или «в большой таре».

Таблица 15

Минимальное количество испытываемого препарата для посева на питательные среды

Количество препарата в первичной упаковке	Минимальное количество препарата для посева на каждую питательную среду
<i>Жидкие</i>	
Менее 1 мл	весь объем первичных упаковок, объединенных до 1 мл
1 – 40 мл	½ содержимого, но не менее 1 мл
40 – 100 мл	20 мл
более 100 мл	10 % содержимого, но не менее 20 мл
Антибиотики (жидкости)	1 мл
Другие препараты, растворимые в воде или ИППМ	содержимое упаковки, но не менее 200 мг
Нерастворимые препараты, мази и кремы, поддающиеся эмульгированию или суспендированию	содержимое упаковки, но не менее 200 мг
<i>Твердые</i>	
Менее 50 мг	все содержимое
50 – 300 мг	½ содержимого, но не менее 50 мг
300 мг – 5 г	150 мг
более 5 г	500 мг

Метод мембранной фильтрации. При определении стерильности ЛС, обладающих выраженным антимикробным действием, и ЛС в емкостях вместимостью более 100 мл, предпочтительным является метод мембранной фильтрации. Исключения составляют препараты с антимикробным действием, нерастворимые в водных разбавителях или ИПМ.

Процедура испытания на стерильность методом мембранной фильтрации состоит из следующих основных стадий: смачивание мембран, подготовка образцов и фильтрация содержимого всех емкостей через мембранные фильтры, отмывка мембранных фильтров соответствующим стерильным раствором, добавление питательной среды и инкубирование посевов.

Испытание выполняют с использованием фильтрационных установок открытого или закрытого типа, позволяющих в асептических условиях переносить и фильтровать испытуемый препарат через мембранные фильтры (внешний диаметр 47 мм; диаметр пор 0,45 мкм), способные улавливать микроорганизмы. Фильтрационная установка открытого типа должна быть смонтирована таким образом, чтобы испытуемый образец можно было внести и профильтровать в условиях асептики. После окончания фильтрации мембрану асептически переносят в питательную среду. При использовании закрытой стерильной системы с мембраной, смонтированной в канистру, после фильтрации питательную среду вносят непосредственно в канистру на мембрану. Фильтры из нитратцеллюлозы используют для водных, масляных и слабых спиртовых растворов, фильтры из ацетатцеллюлозы – для концентрированных спиртовых растворов и кислот. Гидрофобный край фильтра и низкая сорбционная способность обеспечивают эффективную отмывку мембраны и сводят к минимуму адсорбцию препарата, обладающего антимикробным действием.

Для препаратов, не обладающих антимикробным действием, можно использовать фильтры без гидрофобного края, смачивая их перед фильтрацией используемым разбавителем.

Если испытуемый препарат не обладает антимикробным действием, в ходе испытания возможно исключить процедуру промывания фильтров.

Испытание водных растворов ЛС. Определенный объем препарата, стерильно отобранный из всех образцов, перемешивают и асептически переносят на один или несколько предвари-

тельно смоченных фильтров. Фильтры асептически снимают с фильтродержателя и помещают в среды или заливают их в емкости с фильтродержателями. При использовании замкнутой системы канистры заполняют равным объемом среды.

Испытание жидких препаратов, не смешивающихся с водой, проводят также, как и для водных растворов ЛС. При испытании вязких жидкостей к общей пробе перед фильтрацией асептически добавляют достаточное количество подходящего стерильного растворителя для увеличения скорости фильтрации.

Пробоподготовка мазей, кремов, растворимых в ИПМ, и растворов в маслах. Мази на жировой основе и эмульсии типа «вода в масле» растворяют в ИПМ, предварительно простерилизованном методом фильтрации (мембрана с диаметром пор 0,22 мкм). Стерильный разбавитель (растворитель) и, если необходимо, испытуемый препарат, непосредственно перед фильтрацией нагревают до температуры не более 44 °С. Первоначально через мембрану пропускают стерильный ИПМ в количестве 5 мл. Затем фильтруют раствор препарата в ИПМ. Для максимальной эффективности процесса во время фильтрации над фильтром постоянно должен быть слой раствора. После фильтрации мембрану промывают тремя порциями жидкости № 2 по 100 мл каждая. Испытание проводят на питательных средах с добавлением 1 г/л твина-80.

Если в состав испытуемого препарата входит вазелин, для промывания фильтров используют жидкость № 3. Перед началом фильтрации через фильтр пропускают 5,0 мл стерильного ИПМ. Для максимальной эффективности процесса во время фильтрации над фильтром постоянно должно быть небольшое количество теплого раствора. После фильтрации образца фильтр промывают тремя порциями жидкости № 3 по 100 мл каждая. Фильтры помещают в питательные среды, как указано ранее.

Если препарат представляет собой раствор в масле, фильтр и установка перед применением должны быть тщательно высушены.

Испытание препаратов в шприц-тюбиках. Содержимое каждого шприц-тюбика переносят в установки для мембранной фильтрации или собирают общую пробу в стерильную пробирку для последующего переноса на фильтр.

Испытание твердых форм лекарственных средств для инъекций (кроме антибиотиков). Препарат разводят, как указа-

но в инструкции по применению, и проводят испытание согласно методике для водных растворов ЛС.

Испытание стерильных аэрозольных препаратов. Требуемое количество препарата в аэрозольной упаковке асептически переносят в стерильную колбу нажатием на шток распылительного клапана. Если возможно, удаляют пропеллент путем испарения. Добавляют в колбу жидкость № 2 и осторожно перемешивают. Испытание проводят согласно методике для водных растворов ЛС.

Жидкости для промывания мембранных фильтров при испытании лекарственных средств, обладающих антимикробным действием. Для промывания фильтров можно использовать любую стерильную жидкость, не подавляющую рост микроорганизмов:

- 0,9 % раствор натрия хлорида рН $7,0 \pm 0,2$ (после стерилизации).

- Жидкость № 1: растворяют 1 г ферментативного пептона в 1000 мл воды, фильтруют или центрифугируют для осветления, разливают в сосуды и стерилизуют; рН $7,0 \pm 0,2$.

При фильтрации образцов пенициллинов или цефалоспоринов (если необходимо) к жидкости № 1 добавляют валидированное количество β -лактамазы, указанное в фармакопейной статье и нормативной документации, достаточное для инактивации остаточного антимикробного действия антибиотика на фильтре.

- Жидкость № 2: добавляют 1 мл твина-80 к 1000 мл жидкости № 1, разливают в сосуды и стерилизуют; рН $7,0 \pm 0,2$.

- Жидкость № 3: растворяют 5 г ферментативного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твина-80 в 1000 мл воды, разливают во флаконы и стерилизуют; рН $7,0 \pm 0,2$.

При испытании ИЛП промывку мембранных фильтров можно проводить любым стерильным раствором, не подавляющим рост микроорганизмов, использованным при определении антимикробного действия препарата, например: 0,9 % раствор натрия хлорида (рН $7,0 \pm 0,2$) или жидкость № 1.

Проверка пригодности метода мембранной фильтрации при испытании ЛС, обладающих антимикробным действием. Фильтруют объем испытуемого образца, используя для одного фильтра то же количество единиц (ампул, флаконов и т. д.), что и в испытании на стерильность. Фильтр промывают, как минимум,

три порциями соответствующей жидкости по 100 мл каждая. В последнюю порцию жидкости для промывания вносят по 1 мл приготовленных взвесей тест-штаммов микроорганизмов (каждого в отдельности) с концентрацией 100 КОЕ/мл.

Фильтр помещают в емкость со 100 мл соответствующей питательной среды или добавляют среду в канистру замкнутой системы. Посевы инкубируют при соответствующей температуре в течение не более 3 сут для бактерий и 5 сут для грибов.

В ходе учета результатов определяют визуально в проходящем свете наличие роста тест-штаммов микроорганизмов. В случае обнаружения роста считают, что антимикробное действие полностью инактивировано и проводят испытание на стерильность, используя то же количество препарата, аналогичный объем жидкости для промывания и те же питательные среды.

Если рост тест-штаммов микроорганизмов отсутствует, делают вывод, что антимикробное действие препарата не инактивировано. Испытание повторяют, увеличивая объем жидкости для промывания фильтра (но не более 500 мл) или используют другие способы нейтрализации.

Метод прямого посева. Метод прямого посева используют для испытания на стерильность ЛС, не обладающих антимикробным действием, или тех препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

В том случае, если препарат обладает антимикробным действием в условиях испытания, его нейтрализуют путем добавления подходящих инактиваторов или увеличивая объем питательной среды. Добавляемый инактиватор в заданной концентрации не должен подавлять рост тест-штаммов. При необходимости инактиватор можно добавлять и в питательную среду.

Испытуемые образцы засевают непосредственно в питательные среды в соотношении 1:10 или 1:20. Соотношение количества испытуемого материала и используемой питательной среды должно быть определено при проверке антимикробного действия препарата.

Для ИЛП, вызывающих помутнение питательной среды (препараты, содержащие сорбент, микробные клетки и др.), когда визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов или возникают сомнения при учете результатов, посев производят по указанной выше схеме, а на 5–7 сут произ-

водят пересев на свежую питательную среду. Все посе́вы выдерживают при адекватной температуре до окончания инкубации (14 сут со дня первичного посева).

Испытание нефилтрующих жидкостей. Из определенного количества флаконов, ампул и т. д. асептически отбирают объем препарата, достаточный для посева на питательные среды в соотношении 1:10. После посева аккуратно перемешивают среду, исключая аэрацию.

Испытание мазей, кремов и растворов в маслах. От каждой испытуемой серии отбирают необходимое количество единиц.

Растворы в маслах. Готовят эмульсию препарата в разведении 1:10, помещая в стерильную колбу, содержащую соответствующий стерильный разбавитель, стеклянные бусы диаметром 5–6 мм, и, при необходимости, определенное количество твина-80. Посевы растворов в маслах ежедневно аккуратно перемешивают.

Мази и кремы. Тубы (флаконы) перед испытанием дезинфицируют, вскрывают их асептически и первую порцию препарата удаляют, не исследуя.

Мази и кремы, легко эмульгируемые в воде. Готовят разведение ЛС 1:10, помещая образец в стерильную колбу с соответствующим стерильным разбавителем (например, раствором 0,9 % натрия хлорида или жидкостью № 1) и стеклянными бусами диаметром 5–6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры 40 °С и энергично встряхивают в течение 5–15 минут до получения гомогенной эмульсии, которую высевают в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро.

Мази и кремы, трудно смешиваемые с водой. Готовят разведение препарата 1:10, помещая в стерильную колбу с соответствующим стерильным разбавителем (например, раствором 0,9 % натрия хлорида или жидкостью № 3), твином-80 в количестве 50 % от массы навески и стеклянными бусами диаметром 5–6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры 40 °С (в исключительных случаях до температуры 45 °С), энергично встряхивают в течение 5–15 мин (максимально 30 мин), до получения гомогенной эмульсии, которую затем высевают в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро.

Испытание твердых форм. ЛС в виде порошка переносят в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро и осторожно перемешивают. Если в образец добавлен стерильный растворитель, то испытанию на стерильность подвергают полученную суспензию.

Условия инкубации посевов. Посевы инкубируют не менее 14 сут при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С в жидкой тиогликолевой среде и при температуре $22,5 \pm 2,5$ °С в жидких соево-казеиновой среде или среде Сабуро (независимо от метода посева).

При испытании ИЛП возможно использование только тиогликолевой среды и инкубирование посевов при двух температурных режимах $32,5 \pm 2,5$ °С и $22,5 \pm 2,5$ °С.

Учет и интерпретация результатов испытания. Во время инкубации периодически просматривают посевы. Наличие роста микроорганизмов определяют визуально в проходящем свете. Если испытуемое ЛС вызывает помутнение питательной среды и визуально нельзя определить наличие или отсутствие микробного роста, через 14 сут после начала испытания переносят не менее 1 мл помутневшей среды в пробирки с аналогичной стерильной средой. Инкубируют исходные и повторные посевы. Общее время инкубации должно составлять не менее чем 14 ± 4 сут от начала испытания.

Для ИЛП, вызывающих помутнение питательной среды, пересев на аналогичную питательную среду производится на 5–7 сут с последующей инкубацией 14 сут со дня первичного посева. При отсутствии роста микроорганизмов, считают, что испытуемый препарат соответствует требованиям испытания на стерильность. При обнаружении роста микроорганизмов, определяемого визуально по наличию мутности, осадка, хлопьев и других изменений среды и подтверждаемого микроскопическим исследованием, считают, что испытуемый препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность. В этом случае проводят расследование причин несоответствия.

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

- получены неудовлетворительные результаты микробиологического контроля окружающей среды (воздушной среды, по-

- верхностей и рук персонала и др.) при проведении испытания на стерильность;
- выявлены ошибки, допущенные в ходе испытания;
 - обнаружен рост микроорганизмов в отрицательном контроле (контроль стерильного растворителя/разбавителя или питательной среды);
 - питательная среда нестерильна и/или её ростовые свойства неудовлетворительны;
 - выявлены ошибки в ходе процесса стерилизации материалов.

Если результаты испытания признаны недостоверными (в случае обнаружения ошибок в ходе анализа), тест повторяют на том же количестве образцов, что и первоначально, исключая препараты ИЛП, повторное испытание которых проводят на удвоенном количестве образцов. Если в результате повторного испытания не обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат соответствует требованиям испытания на стерильность. Если в результате повторного испытания обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность. Если в ходе расследования доказана правильность выполнения теста на стерильность, считают, что препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность.

8.3. Питательные среды, применяемые для контроля стерильности

Для испытания на стерильность используют жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро. Тиогликолевую среду применяют для выявления аэробных и анаэробных бактерий. Жидкую соево-казеиновую среду – для выявления грибов и аэробных бактерий. Жидкую среду Сабуро используют для выявления грибов. При испытании на стерильность ИЛП не рекомендуется использовать жидкую среду Сабуро. При испытании на стерильность ИЛП, в том числе, содержащих ртутные консерванты, допустимо использование только тиогликолевой среды в качестве универсальной для выявления аэробных и анаэробных бактерий и грибов (при условии предварительного определения её ростовых и нейтрализующих свойств с использованием тест-

микроорганизмов). Инкубацию посевов осуществляют при двух температурных режимах.

Приготовление питательных сред. Питательные среды готовят в лаборатории, используя сухие питательные среды промышленного производства или отдельные компоненты. Допускается применение сред, готовых к использованию, с сертификатом производителя. Приготовленные в лаборатории питательные среды проверяют на стерильность и определяют их ростовые свойства.

Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Тиогликолевая среда:

- L-цистина – 0,5 г
 - Натрия хлорида – 2,5 г
 - Глюкозы моногидрата – 5,5 г
 - Агара микробиологического (влажность не более 15 %) – 0,75 г
 - Дрожжевого экстракта (водорастворимого) – 5,0 г
 - Панкреатического гидролизата казеина – 15,0 г
 - Натрия тиогликолята – 0,5 г или кислоты тиогликолевой – 0,3 г
 - Раствора резазурина натрия (1:1000), свежеприготовленного – 1,0 мл
 - Воды очищенной – 1000,0 мл
- pH после стерилизации $7,1 \pm 0,2$.

Добавляют в воду очищенную L-цистин, агар микробиологический, натрия хлорид, глюкозу, водорастворимый дрожжевой экстракт и панкреатический гидролизат казеина и нагревают до полного растворения. После этого вносят натрия тиогликолят или тиогликолевую кислоту и, если необходимо, доводят pH среды 1M раствором натрия гидроксида до необходимого значения. Добавляют раствор резазурина, перемешивают, разливают в пробирки соответствующего объема и стерилизуют.

Жидкая соево-казеиновая среда:

- Панкреатического гидролизата казеина – 17,0 г
 - Папаинового гидролизата соевой муки – 3,0 г
 - Натрия хлорида – 5,0 г
 - Калия фосфата двузамещенного – 2,5 г
 - Глюкозы – 2,5 г
 - Воды очищенной – 1000,0 мл
- pH после стерилизации $7,3 \pm 0,2$

Компоненты растворяют в воде (если необходимо – при нагревании). Охлаждают при комнатной температуре. Если требуется, добавляют 1М раствор натрия гидроксида, чтобы после стерилизации значение рН среды было $7,3 \pm 0,2$. Фильтруют для получения прозрачной среды, разливают в пробирки и стерилизуют.

Жидкая среда Сабуро:

- Пептона ферментативного – 10,0 г
 - Глюкозы моногидрата – 40,0 г
 - Воды очищенной – 1000,0 мл
- рН после стерилизации $5,6 \pm 0,2$

Пептон и глюкозу добавляют в воду очищенную и полностью растворяют при слабом нагревании. Охлаждают до комнатной температуры и доводят рН до требуемого значения. Если необходимо, фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют.

Стерильность питательных сред. После стерилизации не менее 5 % емкостей от каждой партии питательной среды помещают в термостат и инкубируют в течение как минимум 14 сут для контроля стерильности параллельно с посевом испытуемого образца на стерильность. Рост микроорганизмов должен отсутствовать.

Определение ростовых свойств питательных сред. Ростовые свойства сред определяют для каждой серии питательной среды, выпущенной промышленностью и имеющей номер, и для каждой партии среды, изготовленной в лаборатории.

Каждый вид микроорганизма в количестве 10–100 КОЕ/мл вносят в отдельную порцию испытуемой среды (в 2 пробирки). Инкубируют в соответствии с условиями. Если в течение необходимого времени инкубации в инокулированных средах визуально отмечается рост микроорганизмов, среду считают пригодной для использования.

Подготовка тест-штаммов микроорганизмов. Используют тест-штаммы бактерий и грибов из специализированных коллекций, которые должны быть типичными по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам (табл. 16). Число пассажей рабочих культур не должно превышать пяти.

Таблица 16

Тест-штаммы микроорганизмов, используемые для определения ростовых свойств питательных сред и проверки антимикробного действия препарата

Пита- тельные среды	Тест-штаммы микроорганизмов	Условия инкубации		
		Температура	Время	
Жидкая тиоглико- левая сре- да	Аэробные бактерии:	32,5 ± 2,5 °С	3 сут	
	<i>Bacillus subtilis</i> ГКПМ 010011, АТСС 6633 или <i>Bacillus cereus</i> ГКПМ 010014, АТСС 10702			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ГКПМ 201108, АТСС 6538			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ГКПМ 190155, АТСС 9027		2 сут	
	<i>Alcaligenes faecalis</i> 415 ГКПМ 300205			
	Анаэробные бактерии:			
	<i>Clostridium sporogenes</i> 272 ГКПМ 300524, АТСС 19404			
	<i>Clostridium novyi</i> 198 ГКПМ 242484		3 сут	
	Грибы:		22,5 ± 2,5 °С	5 сут
	<i>Candida albicans</i> NCTC885-653, АТСС 10231			
Жидкая соево- казеиновая среда	Аэробные бактерии:	32,5 ± 2,5 °С	3 сут	
	<i>Bacillus subtilis</i> ГКПМ 010011, АТСС 6633 или <i>Bacillus cereus</i> ГКПМ 010014, АТСС 10702			

Питательные среды	Тест-штаммы микроорганизмов	Условия инкубации	
		Температура	Время
Жидкая соево-казеиновая среда	Грибы:	22,5 ± 2,5 °С	5 сут
	<i>Candida albicans</i> NCTC 885-653, ATCC 10231		
Жидкая среда Сабуро	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642, ATCC 16404	22,5 ± 2,5 °С	5 сут
	Грибы:		
Жидкая среда Сабуро	<i>Candida albicans</i> NCTC 885-653, ATCC 10231	22,5 ± 2,5 °С	5 сут
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642, ATCC 16404		

Перед испытанием культуры аэробных бактерий высевают на скошенный соево-казеиновый агар или другую адекватную плотную питательную среду; культуры грибов *C. albicans* и *A. brasiliensis* – на скошенный агар Сабуро; культуры анаэробов *Clostridium novyi* и *C. sporogenes* – на среды для анаэробных микроорганизмов (например, жидкую тиогликолевую) и инкубируют при соответствующей температуре.

Приготовление инокулята. Выросшие культуры тест-штаммов бактерий (в том числе, *C. sporogenes*, выращенную в анаэробных условиях) и *C. albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида. Готовят взвесь каждого тест-штамма, соответствующую 10 ЕД по оптическому стандартному образцу мутности. Концентрацию клеток *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis* доводят до 1×10^7 КОЕ/мл; *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. sporogenes*, *A. faecalis* – до 1×10^9 КОЕ/мл. Культуру *C. novyi*, выращенную на жидкой среде культивирования для анаэробных микроорганизмов (2 пересева), после центрифугирования 3000 об/мин в течение 20 мин разводят стерильной жидкостью следующего состава:

- натрия хлорид – 8,5 г
 - кислота тиогликолевая – 0,3 мл
 - вода очищенная – 1000 мл
- pH $7,2 \pm 0,2$ после стерилизации.

Для смыва конидий *A. brasiliensis* используют стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида, содержащий 0,05 % твина-80. Количество конидий в 1 мл смыва определяют с помощью камеры Горяева или посевом подходящего разведения на агар Сабуро.

Стандартизованные взвеси бактерий и грибов доводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида методом последовательных десятикратных разведений до концентрации 10–100 КОЕ/мл для посева в жидкие и полужидкие питательные среды для определения их ростовых свойств.

Для подтверждения полученной концентрации инокуляты бактерий, в том числе, *C. sporogenes* (при условии инкубации последнего в анаэроостате), высевают на соево-казеиновый агар (специализированную среду для клостридий) по 0,1 мл из взвеси с концентрацией 10^3 КОЕ/мл, *C. novyi* – на специальную среду для клостридий. Инокуляты грибов высевают на агар Сабуро.

Определение нейтрализующих свойств тиогликолевой среды.

При проведении испытаний ИЛП, содержащих мертиолят (тиомерсал), для определения нейтрализующих свойств тиогликолевой среды используют тест-штамм *Alcaligenes faecalis* 415. Предварительно перед посевом культуры в каждую пробирку в середину столбика с тиогликолевой средой вносят по 0,5 мл свежеприготовленного 0,01 % раствора тиомерсала, разведенного стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида.

Тиогликолевую среду признают пригодной по нейтрализующим свойствам, если не позднее 5 суток инкубации посевов при температуре $32,5 \pm 2,5$ °C визуально обнаруживается рост тест-штамма *A. faecalis* 415.

Хранение питательных сред. Приготовленные в лаборатории среды хранят при температуре от 2 до 25 °C в защищенном от света месте в течение не более 1 мес. или в течение иного срока, подтвержденного в ходе валидационных испытаний.

В случае, если при хранении тиогликолевой среды, содержащей резазурин, верхний слой среды (более 1/3 объема) окрасится в розовый цвет, среду можно регенерировать нагреванием на ки-

пящей водяной бане в течение 10–15 мин до исчезновения розовой окраски с последующим быстрым охлаждением. Если окраска не исчезает после нагревания, среду считают непригодной к применению. Регенерацию среды можно проводить только один раз.

Питательные среды промышленного производства, готовые к использованию, хранят в плотно закупоренных емкостях при условии сохранения их стерильности и ростовых свойств в течение срока годности.

Сухие питательные среды промышленного производства хранят в соответствии с инструкцией по применению и уничтожают по истечении срока годности, указанного производителем.

8.4. Определение пирогенности в стерильных лекарственных препаратах и в воде для инъекций

Пирогенные вещества (ПВ) – это продукты жизнедеятельности и распада микроорганизмов, токсины, погибшие микробные клетки, которые вызывают лихорадочное состояние организма при внутрисосудистом введении.

Впервые в 1865 г. Бильрот обнаружил повышение температуры у собак при парентеральном введении дистиллированной воды. В 1876 г. появился термин «пироген» применительно к веществам, выделенным из гниющего мяса. В 1923 г. Ф.Б. Сайберт выделил ПВ из растворов, установил их термостабильность и первым обосновал использование кроликов для изучения пирогенной реакции.

По происхождению пирогены подразделяют на экзогенные (инфекционной и неинфекционной природы) и эндогенные (клеточно-тканевые).

По химическому составу ПВ представляют собой липополисахаридные или липополисахаридно-протеиновые комплексы наружных мембран грамотрицательных бактерий, так называемые бактериальные эндотоксины.

Пирогены – термостабильные вещества, они разрушаются только при нагревании в суховоздушных стерилизаторах при температуре 250 °С в течение 30 минут. При воздействии пара под давлением (t 120 °С автоклавированием) в растворах ПВ разрушаются только через 5 часов. Следовательно, освободиться от

пирогенов в воде и инъекционных растворах при помощи термической стерилизации практически невозможно. Предупреждение образования пирогенов сводится к соблюдению асептических условий при изготовлении лекарственных препаратов, а также к использованию апиrogenных лекарственных веществ.

Согласно ГФ XIII (ОФС.1.2.4.0005.15 «Пирогенность»), испытание пирогенности проводят на здоровых кроликах одного пола массой 2–3,5 кг и имеющих исходную ректальную температуру 38,5–39,5 °С. Каждый кролик должен содержаться в отдельной клетке на полноценном пищевом рационе. В помещениях, где находятся животные, поддерживают постоянную температуру воздуха. В течение недели до опыта кролики не должны терять в массе. За 18 часов до испытания животных лишают корма без ограничения в воде. Во время опыта кролики не получают ни корма, ни воды.

Ректальную температуру у кроликов измеряют с точностью до 0,1 °С медицинским ртутным или электронным термометром с термочувствительным датчиком. Термометр или датчик вводят в прямую кишку на глубину 5–7,5 см за внутренний сфинктер. Перед введением опытных растворов, у каждого кролика дважды (с интервалом не менее 30 мин) измеряют температуру тела. В случаях изменения температуры у кроликов более чем на +0,2 °С животных исключают из опыта. За исходную температуру принимают величину последнего результата измерения.

В случае отсутствия указаний в частной Фармакопейной статье для определения пирогенности отбирают от серии до 1000 единиц – 1 флакон или ампулу, от 1000 до 10000 штук и свыше – 2 и 3 единицы препарата соответственно.

Для разведения испытуемых лекарственных средств, если растворитель не указан в фармакопейной статье, используют 0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций. Подогретые до 37 °С испытуемые растворы вводят в ушную вену (если в фармакопейной статье не указан другой путь введения) 3 кроликам в объемах, предусмотренных соответствующими частными статьями. Лекарственное средство считают апиrogenным, если у 1 из 3 кроликов наблюдалось повышение температуры не более чем на 0,5 °С, а сумма повышения температуры у 3 кроликов меньше или равна 1,2 °С. В противном случае, введение испытуемых растворов проводят повторно. Препарат считается апиrogenным, ес-

ли сумма повышений температуры у всех 6 кроликов меньше или равна 2,8 °С. Если сумма повышения температуры больше 2,8, но меньше 4,3 °С или более, чем у 1 животного зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 °С, то введение испытуемых растворов проводят повторно. Лекарственное средство считается апиrogenным, если полученный результат меньше или равен 4,5 °С, а индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 °С отмечено не более, чем у 2 из 9 кроликов. Если сумма повышения температуры больше 4,5, но меньше 6,0 °С или зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 °С более, чем у 2 животных, введение испытуемых растворов продолжают. Лекарственное средство признают апиrogenным, если полученный результат меньше или равен 6,6 °С, а индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 °С отмечено не более, чем у 3 из 12 кроликов.

Данный метод имеет ряд существенных недостатков: необходимость содержать большое количество экспериментальных животных в строго регламентированных условиях, значительные колебания чувствительности кроликов к пирогенам, отсутствие количественной характеристики пирогенной реакции, высокая стоимость анализа.

Стерильные лекарственные средства, а также вода для инъекций должны быть апиrogenны.

8.5. Определение эндотоксинов в стерильных лекарственных препаратах и в воде для инъекций

Эндотоксины представляют собой обязательные компоненты наружной части клеточной мембраны всех грамотрицательных микроорганизмов, которые освобождаются в окружающую среду лишь при их разрушении.

Реакция лизата амёбоцитов с эндотоксином была открыта в США в 1964 году. Поскольку первые исследования были проведены на мечехвостах вида *Limulus polyphemus*, препарат, полученный из их крови, был назван Лизат амёбоцитов *Limulus* (*Limulus amoebocyte lysate*), сокращенно ЛАЛ-реактив и, соответственно, ЛАЛ-тест.

ЛАЛ-тест для определения пирогенности лекарственных препаратов является активно развивающимся в настоящее время

способом контроля качества лекарственных средств. В основе этого теста лежит способность лизата амебоцитов (клеток крови) мечехвоста специфически реагировать с эндотоксинами грамотрицательных бактерий. В результате реакции эндотоксина и лизата происходит помутнение прозрачной реакционной смеси или образование твердого геля, что и служит индикатором присутствия эндотоксина.

Кровь, точнее гемолимфа, мечехвостов имеет голубую окраску, которую ей придает пигмент гемоцианин, выполняющий кислородтранспортную функцию. В крови содержится только один тип клеток – амебоциты или гранулярные гемоциты. Свертывание крови происходит в два этапа: первый – слипание или агглютинация клеток; второй – гелирование гемолимфы. На первом этапе происходит разрушение клеток и высвобождение в плазму различных компонентов коагуляционной системы – способного свертываться белка (коагулогена) и ферментов. После этого происходит свертывание крови, в результате чего образуется гель. В отсутствие эндотоксинов коагуляции не происходит.

Получение ЛАЛ-реактива:

- сбор крови в раствор антикоагулянта. Забор крови проводят в асептических условиях из сердца мечехвоста введением в него иглы большого диаметра;
- отделение амебоцитов от плазмы центрифугированием;
- отмывание амебоцитов;
- лизирование амебоцитов;
- очистка лизата;
- повышение чувствительности лизата;
- сублимационная сушка.

Правила определения эндотоксинов ЛАЛ-тестом регламентируются ГФ XIII (ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины»).

Существуют 3 основных способа для определения наличия эндотоксина:

- гель-тромб метод, в котором результаты оцениваются визуально по образованию геля;
- турбидиметрический метод, основанный на помутнении реакционной смеси после расщепления субстрата, содержащегося в ЛАЛ-реактиве;

- хромогенный метод, основанный на появлении окрашивания, возникающего в результате введения в реакционную смесь хромогенного субстрата взамен коагулогена.

Гель-тромб метод наиболее широко используемый.

ЛАЛ-тест проводят в асептических условиях, смешивая в пробирке 0,1 мл испытуемого раствора с 0,1 мл лизата. Смесь инкубируют при 37 °С в течение от 15 до 90 мин при рН от 6,0 до 8,0, не подвергая ее встряхиванию. При наличии пирогенных эндотоксинов грамотрицательных бактерий образуется гель, который обнаруживается, по увеличению вязкости смеси, потере ею текучести. При повороте пробирки на 180° гель остается в первоначальном положении.

В настоящее время согласно фармакопейным требованиям разрешается проведение анализа шестью различными методами, каждый из них может быть использован для проведения контрольных анализов:

Метод А. Качественный гель-тромб тест.

Метод В. Количественный гель-тромб тест.

Метод С. Кинетический турбидиметрический тест.

Метод D. Кинетический хромогенный тест.

Метод Е. Хромогенный тест по конечной точке.

Метод F. Турбидиметрический тест по конечной точке.

К достоинствам ЛАЛ-теста можно отнести:

- простота выполнения, экономичность;
- воспроизводимость, надежность;
- возможность получения количественной характеристики эндотоксинов;
- высокая чувствительность, позволяющая в определенных условиях обнаруживать до 1 мг эндотоксина. Метод в 5–10 раз чувствительнее, чем тест на кроликах;
- возможность определения пирогенности лекарственных препаратов, которые нельзя испытывать на кроликах (препараты седативного действия, короткоживущие изотопы).

В стерильных лекарственных препаратах и воде для инъекций допускается эндотоксинов менее 0,25 ЕЭ/мл.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один правильный ответ.

1. ПРОВЕРКУ ПРИГОДНОСТИ МЕТОДИКИ ИСПЫТАНИЯ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ СЛЕДУЕТ ПРОВОДИТЬ В СЛЕДУЮЩИХ СЛУЧАЯХ
 - 1) при проведении испытания на стерильность нового препарата
 - 2) при внесении любых изменений в экспериментальные условия испытания
 - 3) в случае изменения состава препарата или при изменениях в технологии его производства
 - 4) во всех вышеперечисленных случаях
2. ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ПЕНИЦИЛЛИНОВ И ЦЕФАЛОСПОРИНОВ ИСПОЛЬЗУЮТ
 - 1) 3 % раствор твина-80
 - 2) раствор β -лактамазы
 - 3) 0,3 % раствор лецитина
 - 4) 0,1 % раствор L-гистидина
3. ПРИ ИСПЫТАНИИ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГРИБОВ ИСПОЛЬЗУЮТ
 - 1) жидкую среду Сабуро
 - 2) тиогликолевую среду
 - 3) кровяной агар
 - 4) сывороточный агар
4. УНИВЕРСАЛЬНОЙ СРЕДОЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ ПРИ ИСПЫТАНИИ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) жидкая среда Сабуро
 - 2) тиогликолевая среда
 - 3) кровяной агар
 - 4) сывороточный агар
5. ПРИ ПРОВЕРКЕ ПРИГОДНОСТИ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ ПОСЕВЫ ИНКУБИРУЮТ В ТЕЧЕНИЕ
 - 1) не более 3 сут для бактерий и 5 сут для грибов
 - 2) в течении 7 сут
 - 3) не более суток
 - 4) 10 сут для бактерий и грибов
6. ПИРОГЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА – ЭТО
 - 1) вирусы
 - 2) живые бактерии
 - 3) вещества, вызывающие лихорадку
 - 4) вещества, вызывающие интоксикацию

7. ПИРОГЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА БЫВАЮТ

- 1) живыми и убитыми
- 2) простыми и сложными
- 3) экзогенными и эндогенными
- 4) естественными и искусственными

8. ИСПЫТАНИЕ НА ПИРОГЕННОСТЬ ПРОВОДЯТ НА

- 1) мышах
- 2) крысах
- 3) кроликах
- 4) собаках

9. В ОСНОВЕ ЛАЛ-ТЕСТА ЛЕЖИТ

- 1) реакция клеток крови и индикаторов среды
- 2) реакция лизата амебоцитов и медиаторов воспаления
- 3) реакция клеток крови и эндотоксинов грамположительных бактерий
- 4) реакция лизата амебоцитов и эндотоксинов грамотрицательных бактерий

10. ПРИ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ЛАЛ-ТЕСТА ПРОИСХОДИТ

- 1) выделение газа
- 2) образование геля
- 3) изменение рН среды в кислую сторону
- 4) изменение рН среды в щелочную сторону

11. НЕДОСТАТКОМ БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ИСПЫТАНИЯ НА ПИРОГЕННОСТЬ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) отсутствие точного результата теста
- 2) невозможность проведения испытаний на животных
- 3) отсутствие качественной характеристики пирогенности
- 4) отсутствие количественной характеристики пирогенности

12. ДОСТОИНСТВОМ ЛАЛ ТЕСТА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) использование минимального количества животных
- 2) использование минимального количества реактивов
- 3) возможность определения пирогенности воды для инъекций
- 4) возможность определения пирогенности лекарственных препаратов седативного действия

Глава 9

КОНТРОЛЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ЧИСТОТУ

9.1. Требования к качеству лекарственных средств

Проведение контроля лекарственных препаратов на микробиологическую чистоту регламентировано ОФС.1.2.4.0002.15 Государственной Фармакопеи. ОФС.1.2.4.0002.15 распространяется на методы определения микробиологической чистоты в **нестерильных лекарственных средствах (НЛС)**, в том числе в лекарственных средствах (ЛС), содержащих живые микроорганизмы, а также вспомогательные вещества и полупродукты. НЛС (субстанции, различные формы препаратов – таблетки, капсулы, гранулы, растворы, суспензии, сиропы, мази, суппозитории и др., а также вспомогательные вещества) могут быть контаминированы микроорганизмами. В НЛС допускается лимитированное количество микроорганизмов при отсутствии определенных видов, представляющих опасность для здоровья человека.

В табл. 17 и 18 приведены требования к качеству лекарственных средств (препаратов и субстанций), а также вспомогательных веществ, используемых в производстве лекарственных препаратов.

Таблица 17

Микробиологическая чистота лекарственных препаратов

Категория	Препараты	Рекомендуемые требования
1	Препараты, в том числе биологические лекарственные средства, включая инъекционные лекарственные препараты (ИЛП), к которым предъявляется требование «Стерильность»	Препараты должны быть стерильными

Категория	Препараты	Рекомендуемые требования
2	<ul style="list-style-type: none"> • Для применения местно, наружно, интравагинально • Для введения в полости уха, носа • Респираторно • Трансдермальные пластыри <p>За исключением тех лекарственных препаратов или ИЛП, которые должны быть стерильными</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) препарата или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу) • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) препарата или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу) • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл) препарата или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу) • Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл) препаратов, используемых респираторно • Отсутствие <i>Candida albicans</i> в 1 г (мл) интравагинальных препаратов
3	<p>А. Для приема внутрь или введения ректально За исключением тех лекарственных препаратов и ИЛП, которые должны быть стерильными</p> <p>Б. Для приема внутрь – из сырья природного происхождения (животного, растительного или минерального), уровень микробной загрязненности которого невозможно снизить в процессе предварительной обработки. Исключением являются лекарственные растительные средства и ИЛП, содержащие живые микроорганизмы, относящиеся к категориям 4 и 5</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г (мл) <ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^4 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Энтеробактерий, устойчивых к желчи, – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Salmonella spp.</i> в 10 г (мл) • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл)

Категория	Препараты	Рекомендуемые требования
4	Лекарственные растительные препараты и лекарственное растительное сырье А. Применяемые в виде настоев и отваров, приготовленных с использованием кипящей воды	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^7 КОЕ в 1 г • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г • <i>Escherichia coli</i> – не более 10^2 КОЕ в 1 г
	Б. Приготовленные без использования кипящей воды	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^5 КОЕ в 1 г • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^4 КОЕ в 1 г • Энтеробактерий, устойчивых к желчи – не более 10^3 КОЕ в 1 г • Отсутствие <i>Escherichia coli</i> – в 1 г • Отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> в 25 г
5	ИЛП, содержащие живые микроорганизмы	
	<i>5.1. Вакцины</i>	
	А. Для инъекций	Не допускается присутствие микроорганизмов-контаминантов (определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность»)
Б. Для внутрикожного введения и накожного скарификационного (нанесения)	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов – не более 50 КОЕ в 1 мл • Отсутствие энтеробактерий в 1 мл • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 мл • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 мл 	

Категория	Препараты	Рекомендуемые требования
5	ИЛП, содержащие живые микроорганизмы	
	<i>5.1. Вакцины</i>	
	В. Для приема внутрь (таблетки)	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в единице препарата (г) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов менее 10 КОЕ в единице препарата (г) • Отсутствие бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i> в единице препарата (г) • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в единице препарата (г) • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в единице препарата (г) (определение проводят в соответствии с ФС или нормативной документацией)
5	<i>5.2. Бактериофаги</i>	
	А. Растворы для приема внутрь и ректально	Не допускается присутствие микроорганизмов-контаминантов (определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность»)
	Б. Для приема внутрь (таблетки), местно и наружно (мазь)	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных бактерий – не более 10^2 КОЕ в 1 г • Менее 10 дрожжевых и плесневых грибов в 1 г • Отсутствие бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i> в 1 г • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г

Категория	Препараты	Рекомендуемые требования
5	ИЛП, содержащие живые микроорганизмы	
	<i>5.3. Пробиотики</i>	
	<p>А. Для приема внутрь, интравагинально (лиофилизаты, суспензии, порошки)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Отсутствие бактерий-контаминантов в единице препарата/г (мл) • Отсутствие дрожжевых и плесневых грибов в единице препарата/г (мл) • Для колисодержащих препаратов – отсутствие в единице препарата/г (мл) БОЕ-бактериофага
<p>Б. Для приема внутрь, интравагинально, ректально (таблетки, капсулы, суппозитории)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных бактерий – не более 10^2 КОЕ в единице препарата (г) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – менее 10 КОЕ в единице препарата (г) • Отсутствие энтеробактерий в единице препарата (г) • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в единице препарата (г) • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в единице препарата (г) • Для колисодержащих препаратов – отсутствие в единице препарата (г) БОЕ бактериофага (для препаратов с содержанием <i>E. coli</i> не менее 10^{10} КОЕ допускается не более 10 БОЕ бактериофага) 	

Категория	Препараты	Рекомендуемые требования
6	ИЛП, содержащие инактивированные микроорганизмы, антигены и антитела, белки, пептиды, гликопротеины и др., в которых допускаются микроорганизмы-контаминанты	
	1. Для приема внутрь, интраназально	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 50 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие энтеробактерий в 1 г (мл) • Отсутствие <i>E. coli</i> в 1 г (мл) • Отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл) • Менее 10 дрожжевых и плесневых грибов в 1 г (мл)
	2. Для введения ректально	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10² КОЕ в 1 г • Отсутствие бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i> в 1 г • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г • Менее 10 дрожжевых и плесневых грибов в 1 г

Микробиологическая чистота субстанций и вспомогательных веществ
для производства лекарственных препаратов

Категория	Субстанции, вспомогательные материалы	Рекомендуемые нормы
1.2.	Субстанции для производства	
	А. Стерильных лекарственных препаратов, которые не подвергаются стерилизации	Субстанции должны быть стерильными
	Б. Стерильных лекарственных препаратов, которые подвергаются стерилизации; Нестерильных лекарственных препаратов, относящихся к категории 2	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл)
2.2.	Субстанции синтетического происхождения для производства нестерильных лекарственных препаратов	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г (мл)
3.2.	Субстанции природного происхождения (растительного, животного или минерального) для производства нестерильных лекарственных препаратов	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^4 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г (мл) • Отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> в 25 г (мл) • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл) • Энтеробактерий, устойчивых к желчи, не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)

Категория	Субстанции, вспомогательные материалы	Рекомендуемые нормы
4.2.	Субстанции для производства Вспомогательные вещества (мука пшеничная, крахмал, тальк и т.д.)	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Escherichia coli</i> – в 1 г (мл) • Отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> в 25 г (мл) • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл) • Энтеробактерий, устойчивых к желчи, – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)
5.2.	Субстанции для производства биологических лекарственных препаратов, включая ИЛП: А. Для производства стерильных лекарственных препаратов, которые не подвергаются стерилизации Б. Для производства стерильных лекарственных препаратов, которые подвергаются стерилизации	<p>Субстанции должны быть стерильными</p> <ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие энтеробактерий в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл) • Менее 10 дрожжевых и плесневых грибов в 1 г (мл)

Категория	Субстанции, вспомогательные материалы	Рекомендуемые нормы
6.2.	Субстанции для производства биологических лекарственных препаратов, включая ИЛП:	
	<p>В. Для производства ИЛП, содержащих живые микроорганизмы:</p> <ul style="list-style-type: none"> • в которых не допускаются микроорганизмы-контаминанты (живые вакцины (инъекционные препараты), бактериофаги, растворы для приема внутрь и ректально); • в которых лимитируются микроорганизмы-контаминанты (живые вакцины для приема внутрь (таблетки); бактериофаги (таблетки)) 	<p>Не допускается присутствие микроорганизмов-контаминантов (определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность»)</p>
	<p>Г. Для производства ИЛП-пробиотиков, содержащих живые микроорганизмы, в которых допускаются микроорганизмы-контаминанты (таблетки, капсулы, суппозитории)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Отсутствие посторонних аэробных бактерий в 200 мг • Менее 10 дрожжевых и плесневых грибов в 200 мг
	<p>Д. Для производства ИЛП, содержащих инактивированные микроорганизмы, антигены и антитела, белки, пептиды, гликопротеины и др.</p>	<p>Субстанции должны быть стерильными</p>

Испытание лекарственных средств на микробиологическую чистоту проводят в асептических условиях. Испытание включает способы подготовки различных лекарственных форм, отбор образцов для анализа, методы количественного определения жизнеспособных микроорганизмов, выявление и идентификацию отдельных видов бактерий, наличие которых недопустимо или ограничено в лекарственных средствах, а также питательные сре-

ды, растворы и реактивы, необходимые для проведения испытаний.

Для инкубации посевов на питательных средах для бактерий стандартной температурой культивирования является $32,5 \pm 2,5$ °С, для грибов – $22,5 \pm 2,5$ °С.

Для проведения испытания (определение антимикробного действия ЛС, качества питательных сред, биохимического тестирования выделенных микроорганизмов) необходимо использовать **тест-штаммы микроорганизмов**, депонированные в официальных отечественных и зарубежных коллекциях. Тест-штаммы микроорганизмов, используемые в испытаниях, приведены в табл. 19.

Таблица 19

Тест-штаммы микроорганизмов,
используемых в испытаниях

Название микроорганизма	Номер штамма
<i>Bacillus subtilis</i>	ГКПМ 010011, АТСС 6633
<i>Bacillus cereus</i>	ГКПМ 010014, АТСС 10702
<i>Escherichia coli</i>	ГКПМ 240533, АТСС 25922, АТСС 8739
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>abony</i>	ГКПМ 100329, ИНЕ 103/39, NCTC 6017, СІР 80.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ГКПМ 190155, АТСС 9027
<i>Staphylococcus aureus</i>	ГКПМ 201108, АТСС 6538
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ГКПМ 202001, АТСС 14990 ГКПМ 202004, АТСС 12228
<i>Candida albicans</i>	ГКПМ 303903, ГКПМ 303901, РКПГУ401/NCTC 885-653, АТСС 10231, NCPF 3179
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ВКМ F1119, АТСС 9642, АТСС 16404, NCPF 2275

Тест-микроорганизмы в лиофилизированном виде в ампулах, в пробирках на полужидком агаре хранят при температуре от 2 до 8 °С. Культуры микроорганизмов на дисках хранят при температуре не выше минус 20 °С. Допускается использование микроорганизмов, прошедших не более 5 пассажей от исходной культуры.

9.2. Отбор образцов лекарственных средств

От каждой исследуемой серии ЛС для проведения испытания отбирают необходимое количество образцов в соответствии с категорией препарата из достаточного числа разных упаковок (не менее 3–10). Для аэрозолей на основе жидких или твердых веществ отбирают 10 контейнеров, для трансдермальных пластырей – 10 пластырей. Для других лекарственных средств количество образцов зависит от формы ЛС.

Твердые лекарственные формы:

- 10 г образца – для определения общего числа бактерий и грибов в 1 г препарата, для испытания на отсутствие *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli*;

- 25 г образца – для определения бактерий рода *Salmonella*;

- 10 г образца – для количественного определения энтеробактерий, устойчивых к желчи.

Таблетки, драже, гранулы, порошки и др.:

- 10 г образца измельчают (в случае необходимости) и переносят в 100 мл буферного раствора. Далее проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

Капсулы:

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

Мягкие лекарственные формы:

• 10 г препарата – для определения общего числа бактерий и грибов, для теста на отсутствие *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* в 1 г препарата;

• 10 г образца – для теста на отсутствие или количественного определения в 1 г препарата энтеробактерий, устойчивых к желчи.

Мази, линименты, кремы, суппозитории, легко смешиваемые с водой: 10 г образца помещают в стерильную колбу, содержащую 100 мл буферного раствора и стерильные стеклянные бусы диаметром 5–6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры не выше 40 °С и энергично встряхивают до получения гомо-

генной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

Мази, линименты, кремы, суппозитории, трудно смешиваемые с водой: 10 г образца смешивают со стерильным твином-80, количество которого не должно быть более 1/2 объема образца (в данном случае 5 г). Смесь нагревают на водяной бане или в термостате до температуры не выше 40 °С (в исключительных случаях – до температуры 45 °С) и осторожно перемешивают. При этом время нагрева не должно превышать 30 мин. Добавляют необходимое количество предварительно нагретого до соответствующей температуры стерильного фосфатного буферного раствора со стеклянными бусами. Смесь осторожно перемешивают для получения гомогенной эмульсии в разведении 1:10, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

Жидкие лекарственные формы:

- 10 мл образца исследуют для определения общего числа микроорганизмов и грибов в 1 мл препарата, для теста на отсутствие *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*;
- 25 мл образца – для испытания на отсутствие бактерий рода *Salmonella*;
- 10 мл образца – для количественного определения энтеробактерий, устойчивых к желчи.

Растворы, суспензии, сиропы, микстуры: переносят 10 мл образца в 90 мл буферного раствора, перемешивают и проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

Растворы в маслах, эмульсии: помещают 10 мл образца в стерильную колбу, содержащую 90 мл буферного раствора с твином-80 в количестве не более 5 % и стеклянные бусы. Смесь нагревают на водяной бане до температуры не выше 40 °С и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

Аэрозоли:

Аэрозоли на основе спиртов и твердых веществ.

Переносят 3 г образца (после испарения пропеллента) в 30 мл буферного раствора, перемешивают и проводят количественное и качественное определение микроорганизмов. Не ме-

нее 1 г образца, применяемого респираторно, используют для испытания на отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи.

Аэрозоли на основе масел.

Переносят 3 г образца (после испарения пропеллента) в стерильную емкость с 30 мл буферного раствора с твином-80 в количестве не более 5% и стерильные стеклянные бусы. Смесь нагревают на водяной бане до температуры не выше 40 °С и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов. Не менее 1 г образца, применяемого респираторно, используют для испытания на отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи.

Трансдермальные пластыри. При отборе трансдермальных пластырей используют образец, состоящий из 10 единиц. С каждого из 10 пластырей снимают защитную пленку, пользуясь стерильными инструментами. При необходимости пластырь разрезают стерильными ножницами на более мелкие фрагменты, которые переносят в колбу вместимостью 1000 мл, содержащую 500 мл стерильного буферного раствора и стеклянные бусы (условное разведение 1:50). Колбу нагревают на водяной бане до температуры не выше 40 °С, энергично встряхивают в течение 30 мин.

Используют по 50 мл полученного смыва для количественного определения микроорганизмов методом мембранной фильтрации и испытания на отсутствие *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

Если известно, что пластырь обладает антимикробным действием, в разбавитель добавляют подходящий инактиватор (твин-80 и/или лецитин).

В случае если смыв с трансдермальных пластырей нельзя использовать для определения методом мембранной фильтрации, применяют метод прямого посева на питательные среды, используя разведение 1:50.

Лекарственные растительные препараты. К лекарственным растительным препаратам (ЛРП) относятся препараты, произведенные или изготовленные из одного вида лекарственного растительного сырья или нескольких видов такого сырья и реализуемые в расфасованном виде во вторичной (потребительской) упаковке (пачки, пакеты, брикеты и пр.).

От каждой контролируемой серии лекарственного растительного препарата отбирают объединенную пробу, из которой выделяют образец для определения микробиологической чистоты – минимум 5 невскрытых потребительских упаковок общей массой не менее 50 г.

Перед испытанием потребительские упаковки вскрывают с помощью стерильных инструментов, отбирают из них пробу в равных количествах, перемешивают и переносят в стерильную емкость.

Для количественного определения аэробных микроорганизмов и грибов образец массой 10 г (плоды, кора, корни и корневища, почки и др.) или 2 г (трава, листья, цветки и другие с большим коэффициентом водопоглощения) переносят в стерильную колбу. При массе образца 10 г в колбу помещают 100 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Колбу с исследуемым образцом встряхивают на качалке или аппарате для встряхивания в течение не менее 15 мин. Полученный смыв считают разведением 1:10. При массе образца 2 г в колбу добавляют 200 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Полученный смыв считают разведением 1:100.

Если образец плохо смачивается, в колбу прибавляют поверхностно-активное вещество – стерильный твин-80 в количестве 0,1 % от объема раствора.

Из полученных смывов ЛРП, соответствующих разведениям 1:10 или 1:100, готовят последовательные десятикратные разведения в том же разбавителе.

9.3. Методы количественного определения аэробных микроорганизмов

В зависимости от природы ЛС и его физико-химических свойств используют один из вариантов чашечного агарового метода (глубинный, двухслойный, поверхностный, модифицированный глубинный), метод мембранной фильтрации или пробирочный метод наиболее вероятных чисел.

Чашечные агаровые методы. Для культивирования микроорганизмов используют агаризованные питательные среды: соево-казеиновый агар или агар Сабуро с глюкозой. Для каждого

разведения образца используют не менее 2 чашек Петри с определенной средой.

Глубинный метод. В стерильную чашку Петри диаметром 90 мм вносят 1 мл испытуемого образца, приготовленного для анализа. Добавляют 15–20 мл расплавленной и охлажденной до температуры $42,5 \pm 2,5$ °С стерильной агаризованной питательной среды и быстро перемешивают вращательными движениями. При большем диаметре чашек Петри количество среды соответственно увеличивают до 20–25 мл. После застывания агара чашки переворачивают и инкубируют посе́вы.

Двухслойный метод. Расплавленную агаризованную стерильную питательную среду вносят в количестве 15–20 мл в стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и оставляют до застывания. При большем диаметре чашки Петри количество среды соответственно увеличивают. Поверхность агара в чашке подсушивают.

В пробирку с 4 мл соответствующей расплавленной и охлажденной до температуры $42,5 \pm 2,5$ °С питательной среды вносят 1 мл образца, приготовленного для анализа, быстро перемешивают содержимое пробирки. Затем содержимое пробирки выливают на поверхность застывшего и подсушенного агара в чашке Петри, равномерно распределяя верхний слой среды вращательными движениями. После застывания чашку переворачивают и помещают в термостат для инкубации.

Поверхностный метод. Расплавленные и охлажденные до температуры $42,5 \pm 2,5$ °С стерильные питательные среды вносят в количестве 15–20 мл в каждую стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и оставляют до застывания. При большем диаметре чашек Петри количество среды соответственно увеличивают. Поверхность агара в чашках подсушивают в термостате или ламинарном шкафу.

Образец, приготовленный для анализа, наносят стерильной пипеткой на агар в количестве 0,1 мл и равномерно распределяют шпателем по поверхности среды. Чашки переворачивают и помещают в термостат для инкубации.

Модифицированный глубинный метод. Образец, приготовленный для анализа, в количестве 1,0 мл вносят в стерильную чашку Петри диаметром 90 мм. Добавляют 7–10 мл расплавленной и охлажденной до температуры $42,5 \pm 2,5$ °С питательной

среды и быстро перемешивают вращательными движениями. После застывания агара чашки переворачивают и инкубируют.

Учет и интерпретация результатов, полученных чашечными агаровыми методами. Посевы просматривают ежедневно. Подсчет колоний производят через 48–72 ч (предварительный результат) и через 5 сут (окончательный результат).

Для получения достоверных результатов отбирают чашки, в которых число колоний бактерий не превышает 250, а колоний грибов – 50. Если при учете результатов 2 последующих разведений число колоний на чашках находится в указанных выше пределах, рассчитывают результаты из меньшего разведения.

Если в среднем на чашках выросло более 250 колоний бактерий или более 50 колоний грибов, делают ряд дальнейших последовательных разведений образца, выбирая приемлемое для посева значение.

Если на соево-казеиновом агаре дополнительно обнаружены колонии грибов, то их суммируют с числом бактерий и определяют общее число аэробных микроорганизмов, которое установлено для каждой категории ЛС.

Если на питательной среде отсутствует рост микроорганизмов, результаты отмечают в протоколе испытания следующим образом: при посеве ЛС в разведении 1:10 – «В 1 г (или в 1 мл) лекарственного средства содержится менее 10 бактерий (или грибов)»; при посеве ЛС в разведении 1:100 – «В 1 г (или в 1 мл) лекарственного средства содержится менее 100 бактерий (или грибов)» и т. д.

Количество микроорганизмов (N) в 1 г или в 1 мл рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{\sum c}{n} \cdot d \cdot 10,$$

где: c – количество колоний на всех чашках Петри,

n – число чашек Петри,

d – коэффициент разведения образца,

10 – коэффициент пересчета при проведении посева на чашку в объеме 0,1 мл.

Метод мембранной фильтрации. Метод мембранной фильтрации используют для количественного и качественного определения микроорганизмов в ЛС, обладающих или не обладающих антимикробным действием, в частности для растворов и водорас-

творимых ЛС, а также для жиросодержащих препаратов, растворимых в изопропилмиристате (ИПМ).

Установка для мембранной фильтрации должна иметь конструкцию, из которой легко извлекается фильтр, с последующим его переносом на питательные среды. Используют мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,45 мкм, способные эффективно задерживать микроорганизмы, что необходимо подтвердить валидацией. Материал мембраны следует выбирать таким образом, чтобы компоненты исследуемого препарата не влияли на эффективность его работы. Фильтры из нитрата целлюлозы используют для водных, масляных и разбавленных спиртовых растворов (менее 30 %), из ацетата целлюлозы – для спиртовых растворов (более 30 %), кислот, щелочей. Мембранную фильтрацию проводят в асептических условиях с помощью вакуума.

Образец, как правило, растворяют в буферном растворе в соотношении 1:10. В воронку фильтровальной установки вносят сначала промывную жидкость (примерно 5 мл) для смачивания фильтра. Добавляют количество раствора препарата, соответствующее 1 г испытуемого образца, и немедленно фильтруют. В случае наличия антимикробного действия ЛС для отмывания мембраны используют 0,9 % раствор натрия хлорида или описанные ниже жидкости (№ 1, № 2, № 3), для чего через фильтр пропускают не менее 3 порций по 100 мл подходящей стерильной промывной жидкости. При необходимости к промывной жидкости могут быть добавлены поверхностно-активные вещества (например, твин-80) или инактиваторы антимикробного действия. Через 1 мембрану можно пропускать не более 500 мл промывной жидкости.

Для того чтобы определить, полностью ли отмыты мембраны от фильтруемого препарата, обладающего антимикробным действием, после фильтрации раствора в последнюю порцию промывной жидкости вносят по 1 мл взвеси тест-штаммов микроорганизмов культур, соответствующих категории испытуемого образца. Количество вносимого каждого в отдельности микроорганизма не должно превышать 100 КОЕ в 1 мл.

Рост тест-штаммов на фильтрах подтверждает отсутствие антимикробного действия лекарственного средства. В случае, если антимикробное действие сохраняется, используют специфические или неспецифические инактиваторы или увеличивают объем

промывной жидкости. Смыв с трансдермальных пластырей пропускают через мембранные фильтры по 50 мл (соответствует 1 пластырю) через каждую мембрану. По окончании процесса фильтрации мембраны переносят на соответствующие питательные среды, разлитые в чашки Петри или флаконы с жидкими питательными средами. Чашки с фильтрами переворачивают. Посевы на чашках и во флаконах инкубируют в стандартных условиях.

Подсчет колоний производят через 48–72 ч (предварительные результаты) и через 5 сут (окончательные результаты). Отбирают чашки, в которых число колоний бактерий на фильтрах не превышает 100, а грибов – 50, и рассчитывают число микроорганизмов на 1 г (1 мл) образца или на 1 пластырь. Если на фильтре большее количество микроорганизмов, то делают ряд последовательных разведений образца и выбирают подходящее.

Жидкости для промывания фильтров. Для промывания фильтров можно использовать любую стерильную жидкость, не подавляющую рост микроорганизмов:

- 0,9 % раствор натрия хлорида рН ($7,0 \pm 0,2$) (после стерилизации);

- жидкость № 1: растворяют 1 г ферментативного пептона в 1000 мл воды очищенной, фильтруют или центрифугируют для осветления, разливают в сосуды и стерилизуют; рН ($7,0 \pm 0,2$);

- жидкость № 2: добавляют 1 мл твина-80 к 1000 мл жидкости № 1, разливают во флаконы и стерилизуют. Величина рН после стерилизации ($6,9 \pm 0,2$). Жидкость № 2 применяют, если в составе препарата имеется масло;

- жидкость № 3: растворяют 5 г мясного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твина-80 в 1000 мл воды очищенной. Разливают во флаконы и стерилизуют; рН после стерилизации ($6,9 \pm 0,2$).

Метод наиболее вероятных чисел (НВЧ). Метод НВЧ используют при испытании ЛС с низким уровнем микробной контаминации, а также в тех случаях, когда нельзя применить другие методы. Метод НВЧ менее чувствителен и точен по сравнению с чашечным агаровым методом или методом мембранной фильтрации, и его используют только для определения общего числа бактерий, так как результаты, полученные при определении общего числа грибов, особенно плесневых, считают недостоверными.

Исследуемый образец готовят в виде раствора, суспензии или эмульсии в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000, используя подходящий растворитель. Жидкую питательную среду разливают в 12 стерильных пробирок по 9 мл в каждой. Пробирки ставят в штатив в 4 ряда по 3 пробирки в ряду.

В первый ряд пробирок вносят по 1 мл испытуемого образца в разведении 1:10, во второй ряд – по 1 мл в разведении 1:100, в третий ряд – по 1 мл в разведении 1:1000. В пробирки четвертого ряда вносят по 1 мл разбавителя, который используют для растворения, суспендирования или эмульгирования образца. Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение не более 3 сут.

Отмечают число пробирок в первом, втором и третьем рядах, в которых визуально наблюдают рост микроорганизмов. Среда в пробирках четвертого ряда (контроль разбавителя) должна оставаться стерильной. Полученное трехзначное число соответствует наиболее вероятному количеству жизнеспособных микроорганизмов в 1 г или в 1 мл лекарственного средства (табл. 20).

Таблица 20

Наиболее вероятное число микроорганизмов

Количество пробирок в каждом ряду, в которых наблюдают рост			НВЧ микроорганизмов в 1 г (мл) препарата
Количество препарата в пробирке, г (мл)			
0,1	0,01	0,001	
0	0	0	менее 3
0	0	1	3
0	1	0	3
0	1	1	6,1
0	2	0	6,2
0	3	0	9,4
1	0	0	3,6
1	0	1	7,2
1	0	2	11
1	1	0	7,4
1	1	1	11
1	2	0	11
1	2	1	15
1	3	0	16
2	0	0	9,2

2	0	1	14
2	0	2	20
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	3	0	29
2	3	1	36
3	0	0	23
3	0	1	38
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	более 1100

9.4. Определение отдельных видов микроорганизмов

Энтеробактерии, устойчивые к желчи Испытание на отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи (качественный метод)

Для восстановления жизнеспособности микроорганизмов используют предварительную инкубацию образца в жидкой питательной среде. С этой целью 10 г или 10 мл исследуемого образца переносят в 100 мл соево-казеинового бульона, перемешивают и инкубируют при температуре $(22,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ в течение 2 ч, но не более 5 ч. После инкубации снова перемешивают содержимое флакона, в котором проводилось восстановление жизнеспособности микроорганизмов (гомогенат А), и переносят 10 мл (количество, соответствующее 1 г или 1 мл образца) в 100 мл среды обогащения (бульон Моссея). Посевы инкубируют в течение 24–

48 ч в стандартных условиях. При появлении роста делают пересев бактериологической петлей на агар Мосселя, которую инкубируют в течение 18–24 ч. Если на агаре Мосселя выявлены типичные колонии энтеробактерий, по морфологическим и тинкториальным свойствам представляющие собой грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие цитохромоксидазой, считают, что исследуемый образец контаминирован энтеробактериями, устойчивыми к желчи.

Количественное определение энтеробактерий, устойчивых к желчи. Для посева используют 3 пробирки с 9 мл бульона Мосселя в каждой. Гомогенат А в количестве 1 мл (соответствует 0,1 г или 0,1 мл образца) вносят в первую пробирку, тщательно перемешивают и переносят 1 мл (соответствует 0,01 г или 0,01 мл образца) во вторую пробирку, снова перемешивают и переносят 1 мл (соответствует 0,001 г или 0,001 мл образца) в третью пробирку, меняя пипетку после каждого шага. Посевы инкубируют в течение 24–48 ч.

Для подтверждения отсутствия энтеробактерий, устойчивых к желчи, делают пересев бактериологической петлей из каждой пробирки с видимым ростом на агар Мосселя и инкубируют чашки Петри в течение 18–24 ч. Проводят микроскопическое исследование обнаруженных на плотной среде колоний. Выявление грамотрицательных палочковидных неспорообразующих бактерий свидетельствует о присутствии в ЛС энтеробактерий, устойчивых к желчи. Наиболее вероятное количество устойчивых к желчи энтеробактерий в 1 г или 1 мл образца определяют по таблице 21.

Таблица 21

Интерпретация результатов

Количество испытуемого образца			НВЧ бактерий в 1 г (мл) образца
0,1 г (мл)	0,01 г (мл)	0,001 г (мл)	
1 мл гомогената А	1 мл гомогената А в разведении 1:10	1 мл гомогената А в разведении 1:100	
+	+	+	более 10^3
+	+	-	от 10^2 до 10^3
+	-	-	от 10^1 до 10^2
-	-	-	менее 10^1

Примечание: (+) - наличие роста; (-) - отсутствие роста

Бактерии *Escherichia coli*
Испытание на отсутствие бактерий *E. coli*
(качественный метод)

10 г исследуемого образца, растворенного или разбавленного стерильным фосфатно-буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (соответствует 1 г или 1 мл испытуемого ЛС) в 100 мл соево-казеинового бульона. Перемешивают и инкубируют в течение 18–24 ч. При наличии роста 1 мл содержимого флакона переносят в 100 мл бульона Мак-Конки и инкубируют 24–48 ч при температуре $(43 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

При обнаружении роста в бульоне бактериологической петлей делают пересев на агар Мак-Конки. Посевы инкубируют в течение 18–48 ч (агар Мак-Конки). Если после инкубации на плотных питательных средах выявлены колонии, типичные для *E. coli*, их микроскопируют. При обнаружении в мазках мелких грамотрицательных палочек отдельные типичные колонии пересевают в пробирки на скошенный соево-казеиновый агар и инкубируют в течение 18–24 ч для накопления чистой культуры микроорганизма.

Для идентификации выделенных бактерий используют биохимические тесты на цитохромоксидазу, индол и способность утилизировать натрия цитрат. Для этого из пробирок с чистой культурой делают пересевы на агар Симмонса и соево-казеиновый бульон. Через 18–24 ч инкубации отмечают рост бактерий или его отсутствие на агаре Симмонса. Утилизацию цитрата устанавливают по смещению рН среды в щелочную сторону (изменению цвета среды с зеленого на синий). Наличие индола определяют по появлению красного кольца на поверхности соево-казеинового бульона при добавлении реактива Ковача.

Если в ходе исследования обнаруживают типичные грамотрицательные палочки, не содержащие фермент цитохромоксидазу, не утилизирующие натрия цитрат и образующие индол, считают, что ЛС контаминировано бактериями *E. coli*.

Количественное определение бактерий *E. coli*. Количественное определение *E. coli* проводят также, как и количественное определение энтеробактерий, устойчивых к желчи, делая пересев из гомогената А в пробирки с бульоном Мак-Конки. При обнаружении роста в пробирках из каждой пробирки делают пе-

ресев бактериологической петлей на агар Мак-Конки и инкубируют в стандартных условиях в течение 18–48 ч.

При обнаружении на указанных средах типичных колоний бактерий, по морфологическим и тинкториальным свойствам представляющих собой грамотрицательные палочки, которые не содержат фермент цитохромоксидазу, не утилизируют натрия цитрат и образуют индол, делают вывод, что ЛС контаминировано бактериями *E. coli*. Наиболее вероятное количество клеток *E. coli* в 1 г или в 1 мл испытуемого образца определяют по табл. 21.

Бактерии рода *Salmonella*

Испытание на отсутствие бактерий рода *Salmonella*

Переносят 10 (25) г или 10 (25) мл исследуемого образца в 100 (225) мл соево-казеинового бульона, перемешивают и инкубируют в течение 18–24 ч. После перемешивания 0,1 мл переносят в 10 мл накопительного бульона для бактерий рода *Salmonella* – среду Раппопорта-Вассилиадиса и инкубируют в стандартных условиях в течение 18–24 ч. По окончании инкубации делают пересев бактериологической петлей на одну из 2-х плотных диагностических сред: ксилоза-лизин-дезоксихолат агар или висмут-сульфитный агар, которые затем инкубируют в течение 48 ч.

При выявлении на указанных средах колоний, типичных для бактерий рода *Salmonella*, проводят микроскопическое исследование. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек характерные колонии пересевают на скошенный трехсахарный агар с солями железа, нанося большое количество культуры бактериологической петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик, не касаясь дна пробирки. Через 24 ч инкубации в стандартных условиях отмечают изменение цвета среды из красного в желтый в основании столбика питательной среды (ферментация глюкозы). В скошенной части агара цвет среды не изменяется (отсутствие ферментации сахарозы и лактозы). Почернение среды свидетельствует об образовании сероводорода – типичном признаке большинства бактерий рода *Salmonella*. Параллельно проводят определение наличия фермента цитохромоксидазы, а также другие биохимические и серологические тесты в случае необходимости дополнительного подтверждения.

Если в образце обнаружены бактерии, типичные по своим культуральным, морфологическим и тинкториальным свойствам,

не содержащие фермент цитохромоксидазу, не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород, считают, что лекарственное средство контаминировано бактериями рода *Salmonella*.

Бактерии *Pseudomonas aeruginosa*

Испытание на отсутствие бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (соответствует 1 г или 1 мл) в 100 мл соево-казеинового бульона. Перемешивают и инкубируют в стандартных условиях в течение 24–48 ч. После окончания инкубации при наличии роста производят пересев бактериологической петлей на селективную питательную среду для выделения синегнойной палочки (цетримидный агар или цетилпиридиний хлорид (ЦПХ) агар). Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение 24–48 ч. Выделенные колонии микроорганизмов, которые по своим тинкториальным и морфологическим свойствам являются грамотрицательными палочками, пересевают на агар для выявления синезеленого пигмента пиоцианина. Посевы инкубируют в течение 24–48 ч.

Для подтверждения видовой принадлежности выделенных бактерий к *P. aeruginosa* определяют наличие фермента цитохромоксидазы и способность выделенных микроорганизмов расти на соево-казеиновом бульоне при температуре $(42 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 18–24 ч.

При испытании качества трансдермальных пластырей 10 пластырей помещают в 500 мл фосфатного буферного раствора и осторожно встряхивают в течение не менее 15 мин. Полученную жидкость в количестве 50 мл пропускают через стерильный мембранный фильтр из нитрат-целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, который затем переносят в 100 мл соево-казеинового бульона. Посевы инкубируют в течение 24–48 ч. После инкубации при наличии роста производят пересев бактериологической петлей на селективные среды – цетримидный агар или ЦПХ-агар. Дальнейшую идентификацию проводят, как указано выше.

Если в образце обнаружены бактерии, типичные для псевдомонад по своим морфологическим и тинкториальным свойствам, образующие синезеленый пигмент пиоцианин, содержащие

фермент цитохромоксидазу и растущие при температуре $(42 \pm 1) ^\circ\text{C}$, считают, что ЛС контаминировано бактериями *P. aeruginosa*.

Бактерии *Staphylococcus aureus*

Испытание на отсутствие бактерий *Staphylococcus aureus*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (что соответствует 1 г или 1 мл образца) в 100 мл соево-казеинового бульона. Перемешивают и инкубируют в течение 24–48 ч. При наличии роста пересевают петлей на маннитно-солевой агар и инкубируют в стандартных условиях в течение 24–48 ч.

Появление после окончания инкубации типичных золотисто-желтых колоний, окруженных желтыми зонами на среде с маннитом, свидетельствует о росте *S. aureus*, ферментирующем маннит. Проводят микроскопическое исследование типичных колоний. При обнаружении в мазках грамположительных кокков, расположенных в виде виноградных гроздей, производят пересев на соево-казеиновый агар. Инкубируют в стандартных условиях в течение 18–24 ч. Для идентификации проводят тест на наличие коагулазы.

При испытании микробиологической чистоты трансдермальных пластырей 10 пластырей помещают в 500 мл фосфатного буферного раствора и осторожно встряхивают в течение не менее 15 мин. Полученную жидкость в объеме 50 мл пропускают через стерильный мембранный фильтр из нитрата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, который затем переносят в 100 мл соево-казеинового бульона и инкубируют в течение 24–48 ч. После инкубации при наличии роста пересевают петлей на маннитно-солевой агар для выделения *S. aureus*. Посевы инкубируют в течение 48 ч.

Если в образце обнаружены типичные по культуральным, морфологическим и тинкториальным свойствам бактерии, содержащие коагулазу, утилизирующие маннит, считают, что ЛС контаминировано *S. aureus*.

Грибы *Candida albicans*

Испытание на отсутствие грибов *Candida albicans*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (что соответствует 1 г или 1 мл образца) в 100 мл бульона Сабуро, перемешивают и инкубируют в течение 3–5 сут при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$. При наличии роста пересевают бактериологической петлей на агар Сабуро с глюкозой и инкубируют в течение 24–48 ч при той же температуре.

Рост белых круглых, выпуклых, гладких и блестящих колоний может указывать на наличие *Candida albicans*, что подтверждают в ходе дальнейшей идентификации, одним из этапов которой является микроскопическое исследование (окраска по Граму), выявляющее грамположительные дрожжеподобные почкующиеся овальные или округлые клетки размером 4–8 мкм. Для идентификации возможно использовать хромогенную среду, предназначенную для дифференциации *C. albicans* и других видов грибов рода *Candida*.

Если в образце обнаружены типичные по морфологическим и тинкториальным свойствам дрожжеподобные грибы, идентифицированные как *C. albicans*, считают, что ЛС контаминировано указанным видом грибов.

9.5. Питательные среды, применяемые для контроля микробиологической чистоты

Для испытания качества ЛС на микробиологическую чистоту используют питательные среды отечественного или зарубежного производства.

При приготовлении питательных сред в лаборатории необходимо строго придерживаться приведенной рецептуры, а при использовании коммерческих сухих питательных сред – инструкции предприятия-изготовителя. Входящие в состав питательных сред индикаторы и красители добавляют в виде растворов определенной концентрации. Необходимое значение рН питательной среды устанавливают при температуре $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$.

Если нет других указаний в нормативной документации, среды стерилизуют в автоклаве при температуре 121°C в течение 15 мин, при условии валидации процесса стерилизации.

Оценка качества питательных сред. Для каждой серии коммерческой среды (сухой и готовой к использованию), а также для каждой партии среды, изготовленной в лаборатории, проводят определение ростовых, селективных и диагностических свойств.

Основными биологическими критериями качества питательных сред являются их ростовые и селективные свойства, определяемые с помощью микроорганизмов и аттестованных питательных сред. В качестве аттестованных используют готовые к употреблению среды с сертификатом производителя, а также ранее аттестованные в лаборатории среды высокого качества.

Ростовые свойства питательной среды – это способность питательной среды обеспечивать эффективный и типичный рост соответствующих тест-штаммов микроорганизмов.

Селективные свойства – это способность питательной среды подавлять рост сопутствующих микроорганизмов из микробной ассоциации.

Тест-микроорганизмы, штаммы-ассоцианты и условия инкубации для определения ростовых и селективных свойств питательных сред представлены в приложении 2.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один правильный ответ.

1. РЕКОМЕНДУЕМОЕ ТРЕБОВАНИЕ К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЕ ИНЪЕКЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) общее число аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^2 КОЕ в 1 г
- 2) препарат должен быть стерильным
- 3) отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) препарата
- 4) отсутствие *Escherichia coli* в 1 г (мл)

2. РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ – ЭТО

- 1) способность питательной среды обеспечивать эффективный и типичный рост соответствующих тест-штаммов микроорганизмов
- 2) способность питательной среды обеспечивать рост *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) препарата

- 3) способность питательной среды обеспечивать рост *Escherichia coli* в 1 г (мл)

3. СЕЛЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ – ЭТО

- 1) способность питательной среды обеспечивать рост *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) препарата
- 2) способность питательной среды подавлять рост сопутствующих микроорганизмов из микробной ассоциации
- 3) способность питательной среды обеспечивать эффективный и типичный рост соответствующих тест-штаммов микроорганизмов

4. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЕ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ НАРУЖНО – ЭТО

- 1) препараты должны быть стерильными
- 2) общее число аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) препарата
- 3) общее число аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^8 КОЕ в 1 г (мл) препарата
- 4) общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^7 КОЕ в 1 г, общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г

5. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЕ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ВНУТРЬ – ЭТО

- 1) препараты должны быть стерильными
- 2) общее число аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) препарата
- 3) общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл), общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)
- 4) общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^7 КОЕ в 1 г, общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г

6. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ – ЭТО

- 1) препараты должны быть стерильными
- 2) общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^7 КОЕ в 1 г, общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г
- 3) общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл), общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)

7. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЕ СУБСТАНЦИЙ И ВСПОМАГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА СТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ – ЭТО

- 1) субстанции должны быть стерильными
- 2) общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^7 КОЕ в 1 г, общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г
- 3) общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл), общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)

8. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЕ СУБСТАНЦИЙ И ВСПОМАГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА СТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, КОТОРЫЕ НЕ ПОДВЕРГАЮТСЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ, – ЭТО

- 1) субстанции должны быть стерильными
- 2) общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^7 КОЕ в 1 г, общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г
- 3) общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл), общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)

9. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЕ СУБСТАНЦИЙ И ВСПОМАГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА СТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, КОТОРЫЕ ПОДВЕРГАЮТСЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ, – ЭТО

- 1) субстанции должны быть стерильными
- 2) общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)
- 3) общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^8 КОЕ в 1 г (мл), общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^6 КОЕ в 1 г (мл)

10. ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ИЗ КАЖДОЙ ИС-СЛЕДУЕМОЙ СЕРИИ АЭРОЗОЛЕЙ ОТБИРАЮТ

- 1) 10 контейнеров
- 2) 5 контейнеров
- 3) 2 контейнера
- 4) 1 контейнер

Глава 10

КОНТРОЛЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

10.1. Определение антимикробного действия лекарственных средств

Во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту необходимо определить возможность проявления лекарственным средством антимикробного действия в отношении определенных видов микроорганизмов.

В основе метода определения антимикробного действия лежит сравнение интенсивности роста тест-штаммов микроорганизмов в присутствии и без испытуемого препарата.

Приготовление инокулята. 24-часовые бульонные культуры бактерий, выращенные на соево-казеиновом бульоне, и 24–48-часовую культуру *C. albicans*, выращенную на жидкой среде Сабуро (соево-казеиновом бульоне), разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида 1:1000 (*B. cereus*, *C. albicans*) и 1:100000 (*E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) до концентрации около 10^4 КОЕ/мл.

Взвесь спор *B. subtilis* также разводят до концентрации 10^4 КОЕ в 1 мл. Культуру *A. brasiliensis* со скошенного агара Сабуро с глюкозой или со среды № 2 смывают 0,9 % раствором натрия хлорида с 0,05 % раствором твина-80. Определяют количество конидий в 1 мл смыва, используя камеру Горяева или чашечный агаровый метод, и разводят до концентрации 10^4 конидий в 1 мл.

Подготовка образца для определения антимикробного действия. К образцу ЛС добавляют подходящий разбавитель для получения разведения 1:10. В качестве разбавителя используют,

как правило, фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном (рН 7,0), нейтрализующую жидкость или буферный раствор, содержащий не более 5 % твина-80.

Для разведения препаратов с известным антимикробным действием используют нейтрализующую жидкость. Из разведения 1:10 готовят последовательные разведения 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 и т. д.

Методы определения антимикробного действия. Испытание на наличие антимикробного действия проводят одним из описанных ниже методов.

Определение антимикробного действия в условиях испытания на микробиологическую чистоту. Каждое разведение испытуемого препарата в количестве 1 мл вносят в 6 чашек Петри диаметром 90 мм, в 2 из которых прибавляют по 0,2 мл взвеси *B. cereus* (или спор *B. subtilis*), в 2 другие – по 0,2 мл рабочей взвеси культуры *C. albicans*, в 2 последние – 0,2 мл взвеси конидий *A. brasiliensis*. Чашки с бактериями заливают 10–15 мл расплавленного и охлажденного до $42,5 \pm 2,5$ °С соево-казеинового агара, чашки с культурами грибов – тем же количеством агара Сабуро.

По 1 мл каждого разведения препарата вносят в пробирки с 10 мл жидких сред – бульона Мосселя и соево-казеинового бульона. Затем по 1 мл взвеси тест-штаммов *E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* (каждый штамм отдельно) вносят в пробирку со средой, соответствующей потребностям микроорганизма. В контрольные чашки и пробирки вместо разведений препарата вносят такое же количество растворителя. Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение 48 ч для бактерий и 5 сут – для грибов.

Метод репликаций рекомендуется использовать для определения антимикробного действия водонерастворимых (суспензии, эмульсии и др.) или окрашенных лекарственных средств.

В стерильные чашки Петри вносят по 1 мл каждого разведения исследуемого препарата. В контрольные чашки вносят по 1 мл разбавителя, используемого для получения разведений. В чашки Петри, как в эксперименте, так и в контроле, добавляют по 10–15 мл расплавленного и охлажденного до температуры $42,5 \pm 2,5$ °С соево-казеинового агара, в другие – такое же количество агара Сабуро и тщательно перемешивают. После застывания ага-

ра чашки подсушивают в термостате или ламинарном шкафу для удаления конденсата с поверхности среды, на которую затем бактериологической петлей, пипеткой или репликатором наносят рабочую взвесь каждого тест-штамма бактерий и грибов в виде бляшек. Посевы на средах инкубируют в стандартных условиях в течение 48 ч для бактерий и 5 сут – для грибов.

Учет и интерпретация результатов. После окончания времени инкубации просматривают посевы и отмечают появление типичного роста тест-микроорганизмов в контрольных чашках и пробирках (без препарата) и испытуемых (с различными разведениями препарата). В случаях, затрудняющих учет результатов (помутнение или изменение окраски жидкой среды в результате взаимодействия ЛС с питательной средой), делают пересевы на агаризованные среды.

При наличии роста *E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* на питательных средах делают вывод об отсутствии антимикробного действия исследуемого препарата.

Наличие в испытуемых чашках и пробирках роста тест-микроорганизмов, аналогичного контрольным, обозначают знаком «+», отсутствие роста – знаком «-». Если на средах с препаратом наблюдают уменьшение количества колоний на чашках или отсутствие роста тест-микроорганизмов, делают заключение о наличии у него антимикробного действия. Первое из последовательных разведений препарата, в котором отсутствует антимикробное действие, используют для посева на соответствующую питательную среду.

10.2. Способы устранения антимикробного действия лекарственных средств

Для устранения антимикробного действия ЛС рекомендованы следующие методы:

- увеличение разведения препарата за счет большего объема разбавителя или питательной среды в пределах норм допустимой микробной загрязненности (в качестве разбавителя вместо стандартного фосфатного буферного раствора используют нейтрализующую жидкость лабораторного или промышленного изготовления);

- применение специфических инактиваторов (например, использование β -лактамазы для некоторых β -лактамных антибиотиков и *para*-аминобензойной кислоты (ПАБК) – для сульфаниламидных препаратов), нейтрализующих антимикробное действие препарата, но не угнетающих рост микроорганизмов, контаминирующих ЛС;
- использование неспецифических инактиваторов для препаратов с консервантами. После проведения валидации в буферный раствор и (или) в питательные среды могут быть добавлены твин-80, соевый или яичный лецитин и др.;
- для препаратов, растворимых в воде или в изопропилмиристе (ИПМ), применяется метод мембранной фильтрации с последующим промыванием фильтров.

Инактивация некоторых антибиотиков. Для инактивации пенициллинов и цефалоспоринов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды перед их использованием асептически вносят стерильный раствор β -лактамазы в количестве, указанном в нормативных документах.

Инактивация сульфаниламидных препаратов. Для инактивации сульфаниламидных препаратов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды, если необходимо, до стерилизации вносят ПАБК из расчета 0,05 г/л среды в случае, если антимикробное действие не удастся устранить путем разведения.

Инактивация консервантов, входящих в состав ЛС. Для инактивации консервантов, входящих в состав ряда лекарственных препаратов, в буферный раствор, в котором эмульгируют образец, а также в питательные среды до стерилизации вносят следующие неспецифические инактиваторы: 3 % твина-80 или 0,3 % лецитина (яичного или соевого) от объема среды. В случае, если в препарате имеется более 2 консервантов различной химической структуры, в среду вносят 3 % твина-80, 0,3 % лецитина, 0,1 % L-гистидина и 0,5 % натрия серноватистокислового одновременно. Инактиваторы антимикробного действия лекарственных средств указаны в таблице 23.

Инактиваторы антимикробного действия ЛС

Химические соединения	Инактивирующие вещества или метод
Глутаровый альдегид, ртутьсодержащие соединения	гидросульфит натрия (бисульфит натрия)
Фенолы, спирты, альдегиды, сорбаты	разведение
Альдегиды	глицин
Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), бисбигуаниды, <i>пара</i> -гидроксибензоаты (парабены)	лецитин
ЧАС, йодсодержащие соединения, парабены	полисорбат, твин-80
Химические соединения	Инактивирующие вещества или метод
Ртутьсодержащие соединения	тиогликолят
Ртутьсодержащие соединения, галогены, альдегиды	тиосульфат
Соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА)	ионы Mg(II) или Ca(II)

В случае, если при анализе качества ЛС нельзя использовать метод мембранной фильтрации, а все вышеперечисленные способы устранения его антимикробного действия в отношении конкретного тест-штамма микроорганизма неэффективны, этот вид испытания не проводят.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один правильный ответ.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТОДОМ РЕ-ПЛИКАЦИЙ РЕКОМЕНДУЕТСЯ ПРОВОДИТЬ ДЛЯ
- 1) водонерастворимых препаратов
 - 2) антибиотиков
 - 3) водорастворимых препаратов
 - 4) инъекционных препаратов

2. ДЛЯ УСТРАНЕНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ РЕКОМЕНДОВАНЫ МЕТОДЫ

- 1) увеличение разведения препарата за счет большего объема разбавителя
- 2) применение неспецифических активаторов
- 3) растворение в воде
- 4) нагревание до 600 °С

3. ДЛЯ УСТРАНЕНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ РАСТВОРИМЫХ В ВОДЕ ПРЕПАРАТОВ РЕКОМЕНДОВАНЫ МЕТОДЫ

- 1) растворение в воде
- 2) применение неспецифических активаторов
- 3) мембранной фильтрации с последующим промыванием фильтров
- 4) нагревание до 600 °С

4. ДЛЯ УСТРАНЕНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ СУЛЬФАНИЛАМИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) растворение в воде
- 2) ПАБК
- 3) спирт
- 4) нагревание до 600 °С

5. ДЛЯ УСТРАНЕНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ РТУТЬСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) тиогликолят
- 2) ПАБК
- 3) спирт
- 4) нагревание до 600 °С

6. ДЛЯ УСТРАНЕНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ АЛЬДЕГИДОВ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) тиогликолят
- 2) ПАБК
- 3) спирт
- 4) глицин

7. ДЛЯ УСТРАНЕНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЛЕЙ ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРААЦЕТАТА ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) тиогликолят
- 2) ионы Mg или Ca
- 3) спирт
- 4) твин-80

8. УСТРАНЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТОДОМ
РАЗВЕДЕНИЯ НЕ ПРОВОДЯТ ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ

- 1) фенолов
- 2) спиртов
- 3) ртутьсодержащих соединений
- 4) альдегидов

9. УСТРАНЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ГИДРОСУЛЬФИ-
ТОМ НАТРИЯ НЕ ПРОВОДЯТ ДЛЯ

- 1) глутарового альдегида
- 2) ЭДТА
- 3) ртутьсодержащих соединений

10. УСТРАНЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ
БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ ПРОВОДЯТ

- 1) бетгалактомазой
- 2) спиртом
- 3) растворением в воде
- 4) нагреванием

Глава 11

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

11.1. Вакцины

Вакцины – это препараты, содержащие антигены одного или нескольких возбудителей инфекционных заболеваний, и предназначенные для создания искусственного активного иммунитета с целью профилактики и лечения соответствующего заболевания.

Термин предложил Пастер в честь Дженнера, который в 1796 г. показал, что прививка коровьей оспы – вакцинация (vaccina – коровья) – эффективна для профилактики натуральной оспы.

В настоящее время существуют разнообразные вакцинные препараты:

Живые вакцины готовят из аттенуированных штаммов микроорганизмов, которые получают в основном путем селекции спонтанных мутантов с ослабленной вирулентностью. Для этого микроорганизмы длительное время культивируют в неблагоприятных для них условиях или пассируют на невосприимчивых животных. Например, для получения вакцинного штамма BCG (*Bacillus Calmette, Guerin*) *Mycobacterium tuberculosis* пассировали 13 лет (230 пересевов) на среде с желчью. Антирабическая (против бешенства) вакцина была получена Пастером путем многократного (113 пассажей) пассирования инфекционного агента на кроликах до получения так называемого фиксированного вируса, т. е. вируса с определенным значением вирулентной для кролика дозы и безопасного для человека. В живых вакцинах используют также вакцинные штаммы, полученные путем индуцированных мутаций или генетических рекомбинаций. Такие штаммы требуют длительного контроля ввиду опасности реверсии к исходному вирулентному типу. Живые вакцины использу-

ют для профилактики бактериальных (сибирская язва, туляремия, бруцеллез, туберкулез, чума, сыпной тиф, желтая лихорадка) и вирусных (бешенство, полиомиелит, корь, оспа, грипп, паротит) инфекций.

Убитые корпускулярные (цельноклеточные, цельновирионные) **вакцины** получают из микроорганизмов высокоиммуногенных штаммов, инактивированных физическим (нагревание, ультрафиолетовые лучи) или химическим (фенол, этанол, ацетон, формальдегид) методами. Их используют для профилактики бактериальных (брюшной тиф, коклюш, холера, лептоспирозы, синегнойная инфекция) и вирусных (клещевой энцефалит, бешенство, грипп) инфекций. Для лечения хронических заболеваний используют вакцины из убитых бактерий, выделенных от больного (стафилококков, гонококков, шигелл, бруцелл и др.).

Убитые субъединичные (субвирионные) **вакцины** (химические вакцины) готовят из антигенных фракций микробных клеток. Примерами бактериальных химических вакцин могут служить брюшнотифозная вакцина, содержащая гликоконъюгаты клеточных стенок *Salmonella spp.*, вакцины содержащие капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* и др. Вирусные химические вакцины (против гриппа, герпеса, клещевого энцефалита, бешенства и др.) содержат компоненты поверхностных структур капсида. Преимуществом химических вакцин является относительно низкое содержание балластных веществ, высокая стабильность, малая реактогенность и возможность развития побочного действия. Отсутствие нуклеиновых кислот исключает опасность реверсии к данному типу, потенциально существующую у живых вакцин. Недостаток таких вакцин – более низкая иммуногенность по сравнению с корпускулярными вакцинами из-за быстрого выведения антигена из организма. Для пролонгирования действия в их состав вводят адъюванты – вещества, усиливающие иммунный ответ.

Анатоксины – это обезвреженные, но сохраняющие иммуногенность экзотоксины возбудителей столбняка, дифтерии, анаэробной инфекции, ботулизма, холеры, стафилококковой инфекции и др.

Рибосомальные вакцины обладают высокой протективной активностью при сравнительно низкой токсичности и низкой ти-

поспецифичности, что позволяет получить протективные вакцины широкого спектра действия (против многих сероваров одного вида или даже против нескольких видов одного рода микроорганизмов). Практическое применение эти вакцины находят против заболеваний, вызванных микроорганизмами рода *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus* и *Haemophilus influenzae*.

Генно-инженерные вакцины получают с использованием рекомбинантных клеток. Примером такой вакцины служит препарат, содержащий полипептидный HBs-антиген вируса гепатита В. Ген, кодирующий HBs-антиген, клонирован в дрожжевых клетках, которые синтезируют белок, обладающий протективной активностью. Существенным достоинством таких вакцин является безопасность, поскольку их изготовление не требует контакта с возбудителями заболеваний.

Синтетические вакцины разрабатывают с учетом знания структуры антигенных детерминант возбудителя определенного заболевания, необходимых для создания иммунитета. Их достоинствами являются химическая чистота и безопасность. Примером такой вакцины может служить препарат, содержащий синтетический аналог протеина клеточной мембраны малярийного плазмодия. Этот протеин обеспечивает контакт плазмодия с оболочкой эритроцита, образующиеся к нему антитела препятствуют проникновению возбудителя в эритроциты хозяина.

ДНК-вакцины разрабатываются на основе плазмид, содержащих участки вирусной ДНК. В клетках иммунизированного животного такие плазмиды индуцируют экспрессию антигенов вируса, на которые развивается иммунный ответ. Такие вакцины пока не нашли практического применения ввиду потенциальной опасности злокачественной трансформации клеток организма с участием вакцинной ДНК.

Ассоциированные вакцины содержат антигены различного происхождения. Например, вакцина АКДС включает убитые клетки возбудителя коклюша, дифтерийный и столбнячный анатоксины.

Этапы получения вакцин включают выбор штамма, разработку условий его хранения и культивирования, подготовку посевного материала, накопление биомассы микроорганизмов в специальных биореакторах (ферментаторах), отделение микробных клеток от культуральной среды и последующую их обработку.

Необходимым этапом является стандартизация вакцин и контроль их качества. Бактерии культивируют на питательных средах, состав которых обеспечивает накопление достаточного количества биомассы с сохранением иммуногенной активности и антигенной специфичности штамма. Вакцинные штаммы вирусов выращивают на эмбрионах птиц (кур, уток, перепелок) и на культивируемых клетках человека и животных. Химические вакцины получают путем разрушения бактериальных клеток и (или) экстракцией антигенных компонентов с последующей их очисткой соответствующими физико-химическими методами. Анатоксины получают из культурального фильтрата, обезвреженного формалином (0,4 % формалина, 38 °С, 21–25 дней) с последующей очисткой. Рибосомы выделяют из клеток, разрушенных механическим способом или обработкой ультразвуком, методом ультрацентрифугирования. Вакцинный препарат содержит рибосомы нескольких видов микроорганизмов и пептидогликан *Klebsiella pneumoniae* в качестве адьюванта. Контроль качества вакцинных препаратов осуществляют на всех стадиях их изготовления, включая контроль готовой лекарственной формы, в строгом соответствии с утвержденной нормативно-технической документацией. В процессе изготовления контролируют *отсутствие посторонних микроорганизмов* (живые вакцины) и сохранение свойств (иммуногенность, токсигенность) вакцинной культуры.

При контроле готовых препаратов оценивают:

- растворимость и гомогенность (для сухой вакцины при добавлении растворителя);
- стерильность (инактивированные вакцины и анатоксины);
- безвредность (пробой на животных);
- иммуногенность (вакциной иммунизируют чувствительных животных, после этого их заражают смертельной дозой возбудителя данного заболевания; процент выживших животных указывает на степень иммуногенности);
- переносимость каждой серии вакцины проводят на группе добровольцев из 5 человек, оценивают их общее состояние и местную реакцию;
- правильность этикетирования и упаковки.

Активность анатоксина определяют по его способности реагировать со специфической антитоксической сывороткой в реакции флоккуляции. Вирусные вакцины проверяют не только на от-

сутствие бактерий и грибов, но и посторонних вирусов, поскольку производственные культуры могут быть заражены разными микроорганизмами, в том числе и онкогенными вирусами. Контролируют культуры тканей и питательные среды, предназначенные для накопления вирусного материала. Сбор вируса испытывают на идентичность и определяют титр вируса.

Определение *стерильности* проводят методом посева на питательные среды (см. главу 8).

Определение *отсутствия посторонних микроорганизмов* включает способы подготовки различных лекарственных форм, отбор образцов для анализа, методы количественного определения жизнеспособных микроорганизмов, выявление и идентификацию отдельных видов бактерий, наличие которых недопустимо или ограничено в лекарственных средствах, а также питательные среды, растворы и реактивы, необходимые для проведения испытаний.

Для инкубации посевов на питательных средах для бактерий стандартной температурой является $(32,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$, для грибов – $(22,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$.

Для определения посторонних микроорганизмов от каждой исследуемой серии вакцин для проведения испытания отбирают необходимое количество образцов в соответствии с категорией препарата из достаточного числа разных упаковок (не менее 3–10). В некоторых случаях (при высокой стоимости препарата и/или малом объеме серии) образец может быть уменьшен в отдельных случаях до 2–3 г (мл). Уменьшение количества образца с указанием метода испытания должно быть обосновано и утверждено в нормативной документации в установленном порядке.

Методика определения отсутствия посторонних микроорганизмов прописывается для каждого вида вакцин в Федеральных стандартах и нормативных актах.

11.2. Лечебно-профилактические сыворотки и иммуноглобулины

Различают *сыворотки* антитоксические, которые получают путем иммунизации животных анатоксинами или токсинами микробов, и антимикробные, полученные при многократной иммунизации животных бактериями, эндотоксинами, фильтраатами

бактерий. Наиболее эффективны антитоксические сыворотки, которые быстро обезвреживают экзотоксины в организме больного. Их применяют для лечения дифтерии, скарлатины, столбняка, ботулизма, газовой гангрены и заболеваний, вызванных стафилококками. Антимикробные сыворотки менее эффективны, поэтому их используют реже.

Для получения иммунных антитоксических сывороток иммунизируют здоровое животное, обычно лошадь, токсинами-анатоксинами по специально разработанной схеме. Когда через 10–12 дней в крови животного обнаруживают достаточное количество антител, производят кровопускание и получают сыворотку, которую очищают от балластных белков, консервируют хлороформом (0,75 %) или фенолом (0,5 %).

Сывороточные препараты, полученные при иммунизации лошади, содержат, помимо специфических антител, чужеродные для человека белки. Поэтому при повторном введении таких сывороток могут возникать аллергические реакции типа анафилактического шока или сывороточной болезни. В связи с этим разработаны различные методы очистки и концентрации лечебных антитоксических сывороток. Основным из них, применяемым, является метод «Диаферм-3», включающий ферментативный (пептический) гидролиз, позволяющий освободиться от неспецифических белков сыворотки.

Контролируют стерильность сыворотки, пирогенность, безвредность, специфическую активность.

На бактериальную *стерильность* контролируют высевами из препарата на питательные среды.

Безвредность проверяют на лабораторных животных в соответствии с нормативной документацией по изготовлению сыворотки. Животные должны оставаться здоровыми, без заметной местной и общей реакции в течение 10 дней.

Специфическую активность определяют в реакциях биологической и серологической нейтрализации.

Для получения необходимого лечебного эффекта сыворотку применяют в больших объемах (150–250 мл). Сыворотки вводят чаще внутримышечно. Для десенсибилизации используют метод Безредки. Наибольший терапевтический эффект лечебные сыворотки дают при раннем своевременном введении их больному. Сыворотки против вирусов (если вирус уже проник в клетку)

обычно не оказывают лечебного действия и наиболее эффективны при профилактическом введении лицам, контактировавшим с больными.

Иммуноглобулины применяют для создания искусственного пассивного иммунитета, как для лечения, так и для экстренной профилактики инфекционных заболеваний, особенно у лиц с иммунодефицитами, кроме того, их используют в диагностических целях для определения антигена неизвестного происхождения, т. е. для идентификации микроорганизмов. Иммуноглобулины выделяют из сыворотки или плазмы крови доноров или гипериммунизированных крупных животных.

Нормальные иммуноглобулины (γ-глобулин, поливалентные иммуноглобулины), содержащие антитела различной специфичности, выделяют из плазмы неиммунизированных доноров и сыворотки плацентарной крови. Основным активным компонентом нормальных иммуноглобулинов является IgG, а также небольшие количества IgM и IgA. Каждую серию препарата нормальных иммуноглобулинов изготавливают из смеси плазмы, полученной от большого количества доноров (не менее 5000 человек), что нивелирует индивидуальные различия в содержании антител и обеспечивает стандартность иммунологической активности. Препарат содержит широкий набор антител против возбудителей бактериальных и вирусных инфекций (гепатита, кори, коклюша, полиомиелита, гриппа и др.). Кровь донора собирают в стерильные емкости из полимерного материала, содержащие раствор антикоагулянта (5 %-ный раствор натрия цитрата) для предотвращения свертывания крови. Клетки крови отделяют центрифугированием и возвращают донору, что значительно снижает возможность неблагоприятных для него последствий.

Иммуноглобулины выделяют из плазмы фракционированным осаждением этанолом при температуре ниже 0 °С для предотвращения денатурации белка, лиофильно высушивают, разводят до концентрации 10 %, стерилизуют методом фильтрации и ампулируют. В связи с тем, что требования к препаратам иммуноглобулинов для внутривенного введения существенно возросли, в их производстве используют усовершенствованные технологии: частичное расщепление протеолитическими ферментами, восстановление, алкилирование, дополнительные этапы хроматографической очистки и др.

Все препараты иммуноглобулинов контролируют на стерильность, апиrogenность, содержание белка и безвредность.

Специфические иммуноглобулины выделяют из плазмы или сыворотки крови иммунизированных доноров-добровольцев или животных. Например, противогриппозный иммуноглобулин – из крови доноров, иммунизированных живой гриппозной вакциной; антистафилококковый – из крови доноров, прошедших курс иммунизации стафилококковым анатоксином, или плацентарной крови женщин, иммунизированных в период беременности с профилактической целью.

Для получения некоторых антитоксических и противовирусных иммуноглобулинов (против столбняка, ботулизма, дифтерии, анаэробной инфекции, бешенства, кори, энцефалита и др.) животных (лошадей, овец, коз и др.) многократно иммунизируют возрастающими дозами соответствующего вакцинного препарата. После достижения достаточного титра антител у них берут кровь и из сыворотки выделяют иммуноглобулины по схеме, описанной выше.

11.3. Интерфероны, бактериофаги, аллергены

Интерфероны (ИФН) – это группа белков и гликопротеинов, каждый из которых синтезируется определенными клетками организма и выполняет специфические функции. Известно около 20 природных ИФН, различающихся по структуре и биологическим свойствам: α -ИФН состоит из 12 подвидов, β -ИФН – из 3–4 подвидов, γ -ИФН – из 2–3 подвидов. Рекомбинантные ИФН также имеют разновидности. Продуцентом α -ИФН являются лейкоциты периферической крови человека, которые культивируют на специальной среде в присутствии вируса – интерферогена. Нативный ИФН выделяют из культуральной жидкости осаждением и хроматографией. Метод имеет ограниченное применение из-за необходимости использования большого количества донорской крови. β -ИФН синтезируется в культуре фибробластов (клеток соединительной ткани человека) в присутствии в качестве интерферогена двухцепочечной РНК. γ -ИФН – в культуре иммунных Т- или В-лимфоцитов, в том и другом случае с низким выходом, поэтому производство с использованием культур клеток человека – процесс дорогостоящий. Экономически оправдано получение

ИФН с использованием рекомбинантных культур микроорганизмов: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*. Очистку ИФН проводят методом аффинной хроматографии с использованием моноклональных антител.

Бактериофаги – вирусы, которые проникают в бактериальную клетку, размножаются в ней и лизируют ее с выходом фаговых частиц в окружающую среду.

В медицине бактериофаги используют для лечения и профилактики гнойно-септических и кишечных инфекций, а также в диагностических целях для индикации, видового и внутривидового дифференцирования бактерий.

Лечебно-профилактические бактериофаги, лекарственные средства, содержащие комплексы поликлональных вирулентных вирусов бактерий, которые вызывают гибель соответствующих им видов бактерий за счет внутриклеточного размножения и разрушения бактериальной клетки. Бактериофаги способны лизировать только определенные микроорганизмы. Введенный в организм бактериофаг сохраняется в нем 5–7 дней (прием бактериофага не может заменить вакцинацию). Лечебно-профилактические бактериофаги содержат только вирулентные фаги. Эти препараты представляют собой стерильные очищенные фильтраты фаголизатов соответствующих видов бактерий, освобожденные от эндо- и экзотоксинов, продуктов фаголизиса бактериальных клеток, а также их антигенных комплексов и белковых компонентов питательных сред. Благодаря строгой специфичности действия лечебно-профилактические бактериофаги, в отличие от антибиотиков, не угнетают нормальную микрофлору, не подавляют иммунной защиты, не обладают токсическим действием и не вызывают аллергизации. Наличие резистентности бактерий к антибиотикам не влияет на литическую активность бактериофагов.

Лечебно-профилактические бактериофаги по своему составу подразделяются на:

- *монокомпонентные бактериофаги* – лекарственные средства, содержащие вирулентные фаги против одного рода или вида бактерий;
- *комбинированные бактериофаги* – лекарственные средства, содержащие несколько видов монокомпонентных бактериофагов. Лечебно-профилактические бактериофаги исполь-

зуют для перорального, наружного, местного, ректального применения, интраназального и конъюнктивального введения, введения в дренированные полости. Их выпускают в различных лекарственных формах – в растворах, в виде таблеток, суппозиториев, линиментов, мазей.

При производстве препаратов бактериофаги культивируют в реакторах (ферментерах) путем посева производственных штаммов бактерий и фагов. После завершения процесса фаголизиса для очистки фаголизатов от фрагментов бактериальных клеток, их метаболитов, в том числе энтеротоксинов и белковых компонентов питательной среды, культуральную суспензию пропускают через микрофльтрационные установки. Полученный фаголизат подвергают ультрафильтрации и концентрированию с последующей стерилизующей фильтрацией. Далее из полученного стерильного концентрата фаголизатов готовят жидкий препарат путем разведения 0,9 % раствором натрия хлорида со стабилизаторами или получают лиофилизированную биомассу, предназначенную для получения таблеток (лиофилизируя концентрат фаголизатов при соответствующих условиях). Полученные препараты контролируют на стерильность, специфическая активность по методу Аппельмана, аномальную токсичность.

Аллергены представляют собой фильтрат убитых бактериальных клеток или извлеченных из них активных фракций: туберкулин, антраксин, туллярин и т. д.

Аллергическая диагностика основана на повышенной специфической чувствительности зараженного организма к определенным аллергенам – веществам бактериального происхождения, которые вводят одним из методов (внутрикожно, накожно).

Аллергены контролируют на стерильность, микробную чистоту, аномальную токсичность (испытание проводят на животных) и специфическую активность или остаточную аллергенность (тесты *in vivo*).

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один правильный ответ.

1. ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ К ВАКЦИНАМ ДОБАВЛЯЮТ
 - 1) консерванты
 - 2) стабилизаторы
 - 3) адъюванты
 - 4) Витамины
2. АТТЕНУИРОВАННЫЕ ШТАММЫ ВХОДЯТ В СОСТАВ
 - 1) рекомбинантных вакцин
 - 2) живых вакцин
 - 3) анатоксинов
 - 4) ассоциированных вакцин
3. ИСККУСТВЕННО ПРИОБРЕТЕННЫЙ АКТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ СОЗДАЕТСЯ ПРИ ВВЕДЕНИИ
 - 1) бактериофагов
 - 2) пробиотиков
 - 3) вакцин
 - 4) лечебно-профилактических сывороток
4. ДЕЙСТВУЮЩИМ НАЧАЛОМ В АНАТОКСИНАХ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) обезвреженные экзотоксины
 - 2) обезвреженные эндотоксины
 - 3) антитела – антитоксины
 - 4) девергентные штаммы микроорганизмов
5. УБИТЫЕ ВАКЦИНЫ КОНТРОЛИРУЮТ НА
 - 1) аллергенность
 - 2) прозрачность
 - 3) стерильность
 - 4) остаточную патогенность
6. ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ СЫВОРОТКИ ПОЛУЧАЮТ ИЗ КРОВИ
 - 1) гипериммунизированных животных
 - 2) больных людей
 - 3) здоровых людей
 - 4) больных животных
7. В СОСТАВ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ВХОДИТ 97–98 %
 - 1) IgM
 - 2) IgG

- 3) IgE
- 4) IgD
- 5) IgA

8. α -ИНТЕРФЕРОНЫ СИНТЕЗИРУЮТСЯ

- 1) лимфоцитами
- 2) тучными клетками
- 3) лейкоцитами
- 4) Фибробластами

9. В СОСТАВ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ
ВХОДЯТ

- 1) умеренные бактериофаги
- 2) вирулентные бактериофаги
- 3) Фагоциты

10. ТУБЕРКУЛИН ОТНОСИТСЯ К

- 1) вакцинам
- 2) иммуноглобулинам
- 3) аллергенам
- 4) диагностикумам

Глава 12

МИКРОФЛОРА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

12.1. Характеристика микрофлоры растений

Микроорганизмы являются постоянными спутниками не только человека и животных, но и, в равной степени, растений, в том числе используемых в качестве лекарственного сырья. В России используется более 200 видов лекарственных растений. Микроорганизмы поселяются и ведут активный образ жизни, как на поверхности, так и внутри зеленых частей растений, их корней, семян, плодов. Растения, имеют субстратную (корни) и надземную часть. Микробная обсеменённость растений – это результат влияний, вызванных источниками живой и неживой природы, легко передаваемыми через воздух и с почвой. Субстратная (почвенная) часть находится в почве и непрерывно контактирует с почвенными микроорганизмами (грибы, актиномицеты, бактерии), вирусами и фагами, которые могут проникать в корни или колонизировать поверхность корней. Надземная часть растений постоянно контактирует с микроорганизмами, и они могут оседать с пылью и водными каплями. Состав воздушной микрофлоры может периодически изменяться при изменении ветра, а также зависит от наличия промышленных предприятий, автомобильных трасс и др. Многие растения служат для изготовления отваров, настоев и др. лекарственных форм. Для этого используют самые разнообразные растения, а также извлечённые из них активные действующие соединения. При производстве лекарственных средств из растительного сырья важную роль играет не только контроль исходных материалов, условий хранения и переработки, но и его происхождение (предыстория). Важными факторами, влияющими на качество растительного сырья, и соответственно,

определяющими дальнейшее качество и эффективность при применении, являются агрофитопоказатели (агрофон), выбор культуры, условия выращивания, сбора и сушки. Эти факторы могут оказать влияние на микробную обсемененность растений

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.

12.2. Нормальная микрофлора 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.

Считается, что первое определение понятия ризосферы было дано Хилтнером в 1904 г. Этот исследователь подразумевал под ризосферой «те места в почве, которые находятся под непосредственным влиянием корней растений». Он утверждал, что микрофлора частиц почвы, находящихся в непосредственной близости к корневой системе растения, более обильна, чем микрофлора частиц, находящихся за пределами влияния корней. С того времени проведено огромное количество исследований взаимного влияния микроорганизмов, заселяющих поверхность корней и корневых систем растений. В количественных исследованиях микробиологических биоценозов в почве, непосредственно соприкасающейся с корневой системой растения, многие авторы пользуются термином «эффект ризосферы». Это отношение численности микроорганизмов в частицах почвы, прилегающих к

корням, к численности микроорганизмов в почве, находящейся вне влияния корней.

В настоящее время под ризосферой понимают пространство вокруг корня, в котором имеет место обильное развитие микроорганизмов из-за стимулирования их роста корневыми экссудатами (выделениями), а в более широком смысле – корневыми депозитами.

Корневые экссудаты представляют собой низкомолекулярные органические вещества, продукты фотосинтеза и метаболизма растения. К ним относятся сахара, органические кислоты и аминокислоты, спирты, гормоны, витамины и др. Эти вещества «утекают» из зоны вблизи кончика корня, точнее зоны «растяжения» корня в процессе его роста и развития. Корневые ризодепозиты – более широкое понятие. Они включают не только экссудаты, но и все другие вещества – высокополимерные слизи полисахаридной и белковой природы, ферменты, отмирающие и слущивающиеся поверхностные клетки с их содержимым, кусочки тканей, в частности кортекс верхних стареющих участков корня, корневой чехлик, корневые волоски, летучие органические вещества и др. Считают, что в виде ризодепозитов растение теряет более 30–40 % продуктов фотосинтеза. Помимо химического воздействия на почву и находящихся в ней микроорганизмов, в том числе через изменение рН имеет место и чисто механическое воздействие растущего корня на окружающую его эко-нишу. Феномен более высокой плотности микроорганизмов вокруг корня за счет потребления экссудатов и ризодепозитов называется ризосферным эффектом. В свою очередь, почвенные микробы могут оказывать благоприятное воздействие на жизнь растений, что обусловлено:

- минерализацией органических веществ и растительных остатков;
- образованием тиамин 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;
- антагонистической ролью в отношении фитопатогенных микроорганизмов.

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.

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:

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

Растения в свою очередь выделяют ряд ростовых веществ, стимулирующих развитие гриба. Кроме этого, растения снабжают гриб глюкозой и специальными метаболитами корневой системы. Энергия, заложенная в глюкозе, дает возможность грибу усваивать труднорастворимые соединения фосфора и разлагать органические вещества, например торф.

Еще в очень давние времена люди заметили, что плодовые тела некоторых грибов растут в соседстве с определенными породами деревьев, как бы привязаны к ним. Это наблюдение отра-

зилось и в народных названиях ряда грибов – подосиновик, подберезовик, поддубовик. Более тесную связь грибов с корнями растений удалось установить, когда ученые стали широко пользоваться микроскопом. Первые наблюдения о наличии грибного мицелия на корневой системе различных растений были сделаны более 100 лет назад. Подобных заметок, имевших натуралистический характер, но по существу не уточнявших взаимоотношений между грибами и высшими растениями, можно перечислить достаточное количество. Фундаментальное значение в учении о микоризе имели работы профессора Одесского (Новороссийского) университета Ф.М. Каменского в 1881 г. В своих работах он подробно описал анатомическую картину корней подъельника, отмечая, что на корнях отсутствуют корневые волоски, а вместо них имеется толстая оболочка из грибного мицелия. Сильно сплетенные гифы гриба так плотно прилегают к эпидермису корней, что последние не могут непосредственно соприкоснуться с землей. Каменский делает заключение, что все растворимые вещества из почвы должны поступать к корням подъельника, проходя через грибную зону, и поднимает вопрос о значении этого явления для растений. Искажая историческую правду, зарубежные исследователи приоритет открытия микоризы приписывают обычно Б. Франку, который опубликовал свои наблюдения лишь в 1885 году. Франк имел поручение выяснить закономерности в нахождении трюфелей в лесных массивах. Данный ценный гриб составлял существенную статью экспорта Германии, и значение работы Франка легко можно понять. Не решив своей основной задачи, Франк установил, однако, наличие грибного мицелия на активной корневой системе многих деревьев. Работы Каменского и Франка послужили началом чрезвычайно большого количества исследований, посвященных изучению микоризы. Особенно большие успехи были достигнуты с применением современных методов исследований.

Главными представителями микоризных грибов являются базидиомицеты (*Boletus*, *Amanita*, *Lactarius*, *Cortinarius*, *Russula*, *Tricholoma*, *Entorrhiza*, *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.

Существует три вида микоризы: эндотрофная, эктотрофная, эктоэндотрофная. *Эктотрофная* микориза характерна для древесных растений (ель, дуб, береза), кустарников (ива) и очень редко встречается у травянистых (живородящая гречиха). При ее образовании мицелий гриба окутывает окончания молодых корешков, формируя подобие чехла, который видим невооруженным глазом, называемый раньше грибокормом. При микроскопическом исследовании корней с эктотрофной микоризой видно, что грибной чехол в виде параплектенхиматической оболочки покрывает корешки до конуса нарастания. От этого чехла отходят различные гифы, из которых наружные распространяются в окружающей почве, а внутренние проникают между клетками первичной коры, не захватывая даже эпидермиальные клетки. При этом корневые волоски отсутствуют, а корневой чехлик преобразуется в один-два слоя клеток. Мицелий эктотрофной микоризы, как правило, в ткани корня не проникает, но отдельные гифы внедряются между клетками коры корешка и разветвляются там, образуя тонкую изящную перепонку. Это тонкое однослойное грибное сплетение (перепонка), расположенное между клетками коровой перенхимы микоризного корня, получило название сети Гартига, грибные гифы которой увеличивают поглощающую поверхность корневой системы. Поверхность микориз может быть совершенно гладкая, волосистая, щетинистая; часто она представляется волнистой от расщепления наружных свободных гиф. По цвету, микориза бывает белой, черной, желто-бурой, желтовато-зеленой, серо-желтой, коричневой. Грибной чехол может быть плотносплетенным и рыхлосплетенным. Микоризы различаются также и по форме: одиночные, булабовидные, вильчаторазветвленные и гроздевидноразветвленные и др.

Эктотрофную микоризу образуют в большинстве случаев грибы гименомицеты (*Russula*-сыроежка, *Agaricus*-шампиньон, *Amanita*-мухомор и т. д.), иногда гастеромицеты (*Phallus*-весёлка, *Lycoperdon*-дождевик настоящий и т. д.). На корневой системе одного растения формировать микоризу могут один либо несколько видов грибов. Но чаще какому-то виду высшего растения в растительных сообществах соответствует определенный гриб-симбионт.

Эндотрофная микориза характеризуется тем, что форма корней остается постоянной, корневые волоски сохраняются, нет сети Гартига и грибного чехла. Гифы гриба пронизывают непосредственно клетки корневой паренхимы. Микориза практически не заметна на поверхности корня растения в связи с тем, что значительная часть гриба проникает внутрь клеток корневой системы, сосредоточена в элементах коры, никогда не проникает в сосудистые пучки и в конус нарастания корня. Гифы внутриклеточного мицелия, проникшие в клетки, ветвятся в виде гаустории, но более древовидно, и заполняют внутреннюю полость клетки. Эти древовидно разветвленные гифы грибов, обитающие в клетках растений с эндотрофной микоризой, названы арбускулами. В некоторых случаях на концах этих разветвлений образуются пузыревидные вздутия, названные везикулами, или спорангиолями.

Эндотрофная микориза формируется у брусничных, орхидных, шикшевых, вересковых, грушанковых и др. растений. Наиболее распространены у многих травянистых растений, кустарников и деревьев разных видов грибы-микоризообразователи фикомицеты (роды *Endogone*, *Pythium*), в некоторых случаях – базидиальные и несовершенные грибы.

При *эктоэндотрофном* или смешанном типе микоризы сочетаются свойства экто- и эндомикоризы. Возможно преобладание эктотрофного или эндотрофного типа. Такая микориза наблюдается у большинства древесных пород, у травянистых растений, кустарников, к примеру, арктоуса арктического, грушанки крупноцветковой. Гифы гриба в этом случае густо оплетают корень высшего растения снаружи и в тоже время дают обильные ответвления, проникающие внутрь корня, пронизывая и клетки, и межклеточные пространства.

Некоторые авторы описывают еще *перитрофную* микоризу, которая в отличие от предыдущих типов микориз характеризуется тем, что грибы находятся на поверхности или вблизи корней растений, в их ризосфере, но не проникают в ткани и анатомически не связаны с корнями. Перитрофная микориза, являющаяся простейшей формой симбиоза, представляет интерес как возможный первый этап эволюции микоризообразования. О перитрофной микоризе и участвующих в ней грибах известно очень мало.

От микориз необходимо отличать *псевдомикоризу*, или ложную микоризу. Она внешне сходна с настоящей микоризой и отличается от нее только тем, что мицелий гриба не образует сеть Гартига, а его отдельные гифы проникают глубоко в ткани, в центральный цилиндр, хотя клетки сохраняют первоначальный вид. При этом корни теряют корневые волоски, но никогда не покрываются чехлом из мицелия гриба. Псевдомикоризы образуются грибы-паразиты. Они поражают все ткани корня и кроме вреда, они ничего растению не приносят. Такой тип псевдомикоризы можно отличить от настоящего только при микроскопическом исследовании.

Эпифитная микрофлора. Эпифитной (греч. *Epi* – над, *phyton* – растение) называется микрофлора, находящаяся на поверхности надземных частей растений.

Количество эпифитных микроорганизмов, обнаруживаемых на поверхности листьев, иногда может достигать 10^8 клеток на грамм свежих листьев, или 10^2 на 1 см^2 , что вполне сопоставимо с численностью микроорганизмов в грамме почвы. Эпифитные бактерии характеризуются способностью к выживанию и размножению на поверхности листьев, а также способностью противостоять временному водному стрессу, ультрафиолетовому облучению, экстремальным температурам и недостатку питательных веществ. Это осуществляется за счет образования биопленок. Биопленки являются результатом агрегирования, микроколонизации прикрепленных к листовой поверхности, а также жгутам межклеточного пространства растительных тканей бактерии в биопленках, как известно, связаны с экзополимерной матрицей.

По качественному составу эпифитная микрофлора довольно однообразна и типичными ее представителями являются родов *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*. Реже встречаются спо-

ровые бактерии *Bacillus mesentericus*, *Bacillus vulgatus*, бесспорные молочнокислые бактерии, *E. coli*, грибы плесневые и дрожжевые.

Многие эпифитные микроорганизмы являются антагонистами фитопатогенных бактерий, препятствует проникновению фитопатогенных микроорганизмов в растительные ткани, тем самым, предохраняют растения от заболеваний, усиливая тем самым иммунитет растений, они существуют за счет обычных выделений растений и органических загрязнений поверхности растений. Например, *Erwinia herbicola aureum* – грамотрицательные короткие подвижные палочки, образующие колонии золотистого цвета на МПА, являются антагонистами возбудителя мягкой гнили овощей.

Численность и разнообразие микроорганизмов зависят от вида растения и его местообитания, климата, погодных условий и некоторых других обстоятельств и многих других. Так, растения окультуренных почв содержат большее количество микробов, чем растения лесов и лугов; осенью на листьях обнаруживается больше бактерий, чем ранней весной. Имеются различия в микробном сообществе верхней стороны листа и нижней. Верхние листья содержат меньше микробов, чем нижние, на которые бактерии попадают из почвы вместе с капельками влаги, отскакивающими от земли во время дождя. Существенную роль в этом играют свет и температура. Естественно, что растения пустынь, суккуленты, содержат гораздо меньше микроорганизмов на единицу площади поверхности или на грамм, чем растения влажных тропических лесов. 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.

12.3. Фитопатогенные микроорганизмы

Микроорганизмы, вызывающие инфекционные заболевания растений называются фитопатогенными. Среди возбудителей инфекционных заболеваний растений насчитывается более 600 вирусов и виридов, около 250 видов микоплазм, бактерий, риккетсий и актиномицетов, около 20 тыс. видов грибов.

Происхождение фитопатогенов в настоящее время рассматривают как результат изменения сапротрофного способа питания. На поверхности пораженных органов и тканей развиваются патогены, относящиеся к экзопаразитам, а патогены, живущие внутри растений-хозяев относятся к *эндопаразитам*.

По типу питания микроорганизмы разделяют на *сапротрофов* – извлекают питательные вещества из мертвых тканей (сапрофиты), *некротрофов* и *биотрофов* – получающие питательные вещества после повреждения живых растений. Причем некротрофы прежде убивают растение своими токсическими выделениями, а биотрофы извлекают питательные вещества из живых тканей, и это приводит к его гибели.

По степени паразитизма выделяют *факультативных* и *облигатных фитопатогенов*. Факультативные фитопатогены оказывают на ткани растения наиболее быстрое воздействие, что приводит к гибели клеток. На сочных органах растений это приводит к развитию гнилей, на листьях – пятнистостей. Основное условие существования таких возбудителей – наличие влаги в окружающей среде, так как данные патогены обладают, как правило, внеклеточными ферментами, быстро убивающими живые ткани и вызывающими появление обширных зон мертвой ткани. У облигатных фитопаразитов значительно меньше внеклеточных ферментов, контакт с растением-хозяином не приводит к быстрому разрушению клеток. Между фитопатогеном и хозяином устанавливается прижизненный обмен в течение продолжительного времени. Постепенно развитие облигатного паразита приводит к истощению растения, снижению его продуктивности. Болезни, вызываемые облигатными патогенами, проявляются в большей степени у интенсивно растущих растений и имеют длительный период скрытого развития.

Инфекционное заболевание растения представляет собой сложный процесс взаимодействия возбудителя-фитопатогена и

растения-хозяина. Характер развития взаимоотношений зависит от факторов окружающей среды, поэтому каждый патологический процесс может возникать и развиваться при наличии следующих условий:

- восприимчивого к определенному патогену растения-хозяина;
- патогенного организма и достаточного количества инфекционного материала;
- контакта патогена и растения-хозяина при соответствующих условиях внешней среды.

Если хотя бы одно из этих условий отсутствует, инфекционный процесс не развивается. Определяющая роль отводится также и патогенности, вирулентности и агрессивности патогена.

Под *патогенностью* понимают способность микроорганизмов вызывать заболевание определенного вида растений и наносить ему вред. Это свойство может изменяться в зависимости от цикла развития возбудителей и внешних условий. Факультативные формы, вызывающие гибель больших участков, могут быть более патогенными, чем облигатные, вызывающие местные поражения тканей.

Вирулентность – качественная мера патогенности. Это патогенность данного паразита по отношению к определенному виду или сорту растений-хозяев. Один и тот же возбудитель может быть вирулентным для одного сорта и авирулентным для другого.

Агрессивность – количественная мера патогенности. Это способность паразита вызывать массовое заражение восприимчивых растений (эпифитотии), преодолевая их защитные свойства. Высокоагрессивными считаются возбудители, способные вызывать заражение растений при минимальном количестве (дозе) инфекционного начала. Облигатные формы патогенов являются более агрессивными, факультативные – менее агрессивными.

Этапы инфекционного процесса: заражение, инкубационный период и проявление заболевания, или собственно болезнь.

Заражение – совокупность нескольких последовательных процессов, которые практически не разобщены во времени и поэтому весьма сложно установить границы между ними:

- 1) попадание инфекции на поверхность органов растения;
- 2) прорастание спор грибов, семян цветковых паразитов;
- 3) внедрение паразита внутрь тканей.

При заражении бактериями или вирусами второй и третий этапы не наблюдаются, так как они сразу же попадают внутрь тканей.

Пути распространения фитопатогенов в природе весьма разнообразны: при помощи воды – гидрохория, животными – зоохория, по воздуху – анемохория и т. д. Насекомые обычно разносят фитопатогены на ограниченные расстояния, лишь во время их миграций расстояния могут быть более значительными. Так же насекомые могут создавать дополнительные входные ворота для инфекции за счет наличия сосущего-колющего ротового аппарата. Например, *Erwinia amylovora* разносятся пчелами и другими опылителями и попадают в ранки, сделанные этими насекомыми. Фитопатогенные бактерии, вирусы и микоплазмы по воздуху, как правило, не распространяются. Таким путем они могут разноситься только с мельчайшими частицами пораженной ткани растений на незначительные расстояния. Один из основных путей распространения бактерий – посадочный материал: семенами, клубнями и др. Обычно бактерии локализируются между семенной оболочкой и эндоспермом, проникают в зародыш (*Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* и др.). Фитопатогенные бактерии способны сохраняться в почве, семенах и на растительных остатках. Однако, чем быстрее происходит минерализация этих продуктов, тем меньше сохраняются бактерии. При сохранении фитопатогенных бактерий на поверхности растений или в их тканях, говорят о поверхностной контаминации. В период заражения большинство фитопатогенных бактерий нуждается в повышенной влажности (от 50 до 100 %). Считают также, что бактерии сильно подвержены действию света. В связи этим следует отметить, что пигментированные бактерии чаще поражают надземные, а непигментированные – подземные части растений.

Проникновение возбудителя в ткани растения-хозяина происходит различными путями. Споры грибов способны проникать как в неповрежденные, так и в поврежденные ткани через естественные или искусственные отверстия. Бактерии не могут проникать в растения непосредственно через покровную ткань, заражение происходит только через естественные отверстия – устьица, чечевички или поврежденную покровную ткань. Особое значение для проникновения имеет влага: наличие капельно-

жидкой влаги или высокая влажность на поверхности растений способствуют размножению патогенов.

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.

Проявление заболевания определяется скоростью распространения возбудителя по проводящей системе или другими способами. Характер поражения может быть ограниченным, если у растения активизируются защитные реакции (действие окислительных ферментов, фитонцидов и др.).

Инфекционные болезни растений классифицируются:

- по локализации процесса:

общие – вызывают быструю гибель всего растения или отдельных крупных его частей;

местные – распространяются медленно, поражают отдельные части растений.

- по механизму:

паренхиматозные заболевания – развиваются при попадании микроорганизмов в ткани растений через различные анатомические отверстия (устьица, чечевички, нектарники) и повреждения покровных тканей. Возбудители выделяют ферменты и токсины, которые способны разрушать ткань растения, облегчающие их распространение по межклеточным пространствам. Проникновение патогенов вглубь вызывает массовую гибель клеток. К ним относят гнили, ожоги и пятнистости.

сосудистые поражения развиваются при распространении патогенов по сосудам растений, они размножаются в сосудах, вызывая их закупорку за счёт повреждения стенок, затрудняется питание растений и приводит к увяданию и гибели растения.

опухоли, возбудители содержат онкогенные плазмиды, которые попадая в клетки растений, они стимулируют опухолевый рост.

- по совокупности анатомических и физиологических изменений:

1. Камедетечения, смолотечения, слизетечения. Чаще всего вызываются бактериями рода *Erwinia* и грибами (класс *Ascomy-*

cetes), в большинстве наблюдаются у лиственных и хвойных деревьев.

2. Гниль. Загниванию могут подвергаться все части растения, но особенно те, которые богаты водой и запасными питательными веществами (клубни, корнеплоды, луковицы), чаще при их хранении. Причиной развития гнилей могут быть и грибы, и бактерии. В случае, когда под воздействием ферментов фитопатогена разрушается межклеточное вещество и клетки распадаются, говорят о возникновении мягких гнилей. Пораженная ткань превращается в бесформенную массу различных цветов. Гнили могут быть также мокрыми, сухими и твердыми. *Мокрые* гнили образуются в органах и тканях, богатых водой. Сухие гнили образуются при разрушении межклеточных веществ и оболочек клеток, относительно бедных водой, ткани теряют структуру и превращаются в волокнистую или порошкообразную массу. Примером развития гнилей такого типа являются поражения древесины трутовиками. Известны некоторые типы заболеваний, когда клетки отмирают без существенного разрушения пектина, т. е. твердые гнили.

3. Налеты появляются на поверхности пораженных органов и представляют собой мицелий и спороношение возбудителя болезни – гриба. Особенности налета – окраска и расположение – могут служить диагностическими признаками возбудителя, например, настоящие и ложные мучнистые росы, чернь.

4. Увядание или вилт – широко распространенный тип поражения растений, гибель которых происходит в результате проникновения возбудителей в корневую и проводящую системы. Наблюдается закупоривание проводящих сосудов, под действием образующихся токсинов происходит некроз стенок. В результате нарушается транспорт воды в растении, и оно увядает. Причиной развития вилта могут быть и грибы, и бактерии. В случае грибной инфекции увядание называется трахеомикозом, в случае бактериальной – трахеобактериозом. Однако увядание может быть связано и с неблагоприятными условиями окружающей среды.

5. 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*.

6. Пятнистость. Некоторые бактерии (род *Pseudomonas* и *Xanthomonas*), грибы (класс *Ascomycetes* и *Deuteromycetes*), вызывают образование пятен разного цвета, формы, размеров на листьях, семенах и плодах.

7. Опухоли или наросты проявляются как разрастание пораженной ткани. Могут образовываться на различных частях растения. Возникновение наростов происходит в результате увеличения размеров пораженных клеток (гипертрофия), или их количества (гиперплазия). Иногда оба процесса протекают одновременно. Поражения такого типа свидетельствуют о том, что патогены выделяют гормональные вещества, способные нарушить присущий растению способ роста, привести к разрастанию отдельных тканей. Наросты, галлы, опухоли – характерные признаки болезней, вызываемых грибами, бактериями (род *Agrobacterium*), вирусами и механическими повреждениями.

8. Язвы (антракнозы) возникают при поражении насыщенных водой органов и тканей растений и характеризуются размягчением тканей, окружающих места заражения. Вызываются бактериями (род *Erwinia* и *Rhizobium*), грибами, механическими повреждениями, низкой температурой.

9. Хлорозы и мозаика листьев. На листьях появляются бледно окрашенные пятна, чередующиеся с нормально окрашенными участками, возникают из-за нарушения пигментации листьев. При хлорозах это касается общего пожелтения или посветления листьев, при мозаиках пожелтение затрагивает отдельные части листа. Чаще всего причинами этого бывают нарушения питания или поражение вирусами.

10. Деформация. Деформации представляют собой изменения формы пораженного органа (искривление побегов, курчавость листьев, карликовость). Например, некоторые грибные и вирусные болезни связаны с деформациями листьев: скручиванием, морщинистостью, курчавостью. Скручивание листьев является результатом их переполнения крахмалом (в результате нарушения его оттока при поражении проводящей системы). Морщинистость и курчавость проявляются вследствие неравномерного роста мезофилла и жилок, а нитевидность – в результате роста только жилок. Деформации цветков – пролиферации, махровость – являются результатом вирусных поражений.

11. Некрозы проявляются в виде участков отмершей ткани на пораженных органах растения – листьях, стволах, плодах. Пятна могут иметь различную форму: округлую, удлинённую, угловатую. На листьях форма некротических пятен зависит от расположения жилок. При поражениях жилок некрозы проявляются в виде штрихов. Очень часто некрозы четко ограничены от здоровой ткани, и возбудитель локализован в таком пораженном участке. Такое ограничение распространения возбудителя можно рассматривать как защитную реакцию растения. В других случаях некрозы обильно заселены фитопатогеном, пораженная ткань крупная и хорошо заметна. При некоторых поражениях на границе здоровой и пораженной ткани образуется опробковевший слой, пораженные участки теряют связь со здоровыми и выпадают. Такой тип поражения называется дырчатой пятнистостью. Поражения типа пятнистостей характерны для микозов, бактериозов и вирусозов.

12. Пустулы представляют собой участки пораженной ткани с признаками спороношения грибов, вначале прикрытые эпидермисом, который впоследствии разрушается и разрывается. Образование пустул является наиболее типичным признаком поражения ржавчинными грибами.

13. Парша – заболевание, вызванное актиномицетами рода *Streptomyces*, развивающееся на покровных тканях, приводящее к их растрескиванию и образованию струпьев. Обычно возбудитель заболевания не проникает глубоко внутрь ткани, но при сильном поражении может вызвать деформацию плодов. Встречается парша на клубнях картофеля, плодах, семечках.

14. Мумификация выражается в почернении и ссыхании пораженных органов растения. Чаще всего мумифицируются пораженные мицелием паразитирующего гриба богатые питательными веществами органы. Пораженный плод превращается в твердое образование – склероций, кроющиеся ткани которого темноокрашены. Характерные примеры таких поражений – спорынья злаков, мумификация плодов яблони.

15. Израстание связано с чрезмерным ростом растения за счет выделения фитопатогеном ростовых веществ. С избыточным выделением ростовых веществ связана также и чрезмерная кустистость. В этом случае образуется большое количество стеблей, такие растения называют «ведьмины метлы». На такой процесс

расходуется много энергии, растения плохо плодоносят, имеют мелкие листья и тонкие побеги. Считают, что часто этот симптом является признаком фитоплазменного или вирусного поражения.

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 (>80 % заболеваний), например, *фузариозы*, *аскохитозы*, *воловни* и многие другие.

К инфекционным болезням растений относят и **актиномикозы**, вызываемые актиномицетами.

Фитопатогенные бактерии. 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.

В настоящее время фитопатогенные представители обнаружены среди бактерий отделов: грамотрицательных, грамположительных и микоплазм. Фитопатогенные бактерии в большинстве палочковидной формой клеток, хотя встречаются и кокковидные. Некоторые фитопатогенные бактерии имеют слизистую капсулу (ослизнение оболочки), они более устойчивы к солнечному свету. Большинство фитопатогенных бактерий не образуют спор, являются аэробами или факультативными анаэробами. По характеру питания фитопатогенные бактерии – гетеротрофы, способные расти на питательных средах.

По степени приспособленности бактерий к растениям их делят на 2 группы:

1. Паразиты – бактерии, которые наиболее хорошо живут на живых растениях или сохраняются на неперегнивших растительных остатках. Такие бактерии, попав в почву, сравнительно быстро погибают в ней (10–20 дней). Возбудители мокрой гнили – *Pectobacterium caratovororum*, возбудители пятнистостей – *Xanthomonas malvacearum*, возбудители корневого рака – *Pseudomonas tumefaciens*.

2. Бактерии-сапрофиты, которые вообще ведут сапрофитный образ жизни, но в некоторых случаях вызывают заболевание растений, например *Pseudomonas fluorescens*, вызывающая загнивание растений табака, рапса, бегонии.

Фитопатогенные бактерии выделяют большое количество ферментов патогенности и токсинов. Почти все фитопатогенные бактерии имеют такой фермент, как пектиназа, посредством которого разлагается как в аэробных, так и в анаэробных условиях межклеточное вещество (срединная пластинка), состоящее из пектинов, склеивающих клетки между собой. В анаэробных условиях этот процесс протекает по типу маслянокислого брожения. Таким образом, разложение пектиновых веществ ведет к мацерации тканей. Пектиновых веществ особенно много в паренхиме коры. После их разрушения в коре остаются лишь легко разделяющиеся лубяные волокна. Весьма характерно это для древесных пород при бактериальном поражении коры. После разложения пектиновых веществ от флоэмы остаются лишь тонкие волокна луба – она приобретает вид мочала, а под толстым корковым слоем образуется пустота. По этой же причине на тонких ветвях корковый слой сморщивается в складки, что очень характерно при поражении их бактериозом. Разложение пектиновых веществ, представляющих собой слизистую массу, в тканях флоэмы или ксилемы по схеме маслянокислого брожения у древесных пород связано с выделением наружу через трещины или разрывы слизи или жидкости независимо от того, где происходит разложение – во флоэме или ксилеме. Образующиеся в тканях газы в результате жизнедеятельности бактерий помогают такому выделению. Очевидно, что так называемое слизетечение, нередко наблюдаемое у древесных пород и обычно рассматриваемое как безобидное местное явление, на самом деле может быть отражением глубоких патологических процессов, происходящих в стволе дерева.

У многих видов фитопатогенных бактерий имеется *амилаза*, действующая на крахмал и превращающий его в сахара, которые в свою очередь могут сбраживаться другими ферментами по схеме маслянокислого, спиртового, молочнокислого и прочих брожений. При этом сахара растительной клетки оказываются минерализованными до углекислого газа и воды. Вероятно, в связи с этими процессами ксилема и флоэма лесных пород при некоторых бактериальных поражениях бывает исключительно насыще-

на водой. Т. к. жизнедеятельность бактерий в древесине растущих деревьев тесно связана с явлениями брожения, это неминуемо приводит к ее разложению. Распад спиртов и органических кислот представляет собой ту фазу, которая приводит к образованию простейших соединений углекислоты, воды, водорода и метана. Наличие в древесине растущих деревьев, пораженных бактериозом, метана может указывать на брожение клетчатки, иначе говоря, на разложение целлюлозы, что связано с разрушением оболочек клеток. Наличие свободного азота может свидетельствовать о редукации нитратов.

У некоторых фитопатогенных бактерий имеется хлорофиллаза, которая расщепляет хлорофильные зерна, находящиеся в зеленых тканях растений. Под воздействием этого фермента происходит обесцвечивание листовой пластинки в виде различного рода пятнистостей, а в некоторых случаях и полностью. Листья и хвоя, например, становятся желтыми, а иногда даже и белыми (у белой акации, бархата амурского, сосны и пихты).

Одним из окисляющих ферментов, распространенным у фитопатогенных бактерий является тирозиназа, расщепляющая тирозин и превращающая его в меланин. Этим объясняется тот факт, что пораженная бактериозом поверхность раковых ран или древесины на воздухе быстро коричневеет или чернеет, в некоторых случаях принимает синевато-черную окраску. Особенно резко это проявляется при поражении бактериозом клена, ореха грецкого, бархата амурского и некоторых других пород.

Действие токсинов бактерий на растения слабо изучены. Токсины фитопатогенных бактерий в одних случаях легко выделяются из клетки в окружающую среду (экзотоксины), в других – тесно связаны с нею и выделяются при гибели бактерий (эндотоксины). Токсины играют большую роль при поражении растений бактериями и могут быть разнообразны даже у одного и того же вида возбудителя болезни. Очевидно, что под воздействием токсинов живые клетки будут отмирать. В результате массового размножения бактерий в тканях растений происходит накопление ядовитых продуктов их жизнедеятельности, нарушающих соответствующие ферментативные системы, обмен, что приводит к гибели. Токсины фитопатогенных бактерий - вещества различной химической природы. Токсин, синтезируемый бактериями *Pseudomonas syringae*, является низкомолекулярным пептидом,

ингибирующим синтез глутаминсинтетазы, которая необходима для образования хлорофилла. В результате на листьях появляются пятнистости. В качестве токсинов могут выступать полисахариды и гликопептиды слизистых слоев бактерий.

Некоторые виды фитопатогенных синтезируют фитогормоны, стимулирующие разрастание тканей растения с образованием опухолей, например, гетероауксин, индолилуксусная кислота, синтезируемая бактериями *Agrobacterium tumefaciens*. Опухоли могут вызывать сжатие проводящих сосудов с последующей гибелью растения. К фитогормонам относится также гиббереллин, который синтезируется бактериями и вызывает ненормальное удлинение побегов. Некоторые фитопатогенные бактерии – возбудители инфекционных заболеваний лекарственных растений представлены в таблице 24.

Таблица 24

Фитопатогенные бактерии – возбудители
инфекционных заболеваний лекарственных растений

Роды	Виды	Вызываемые заболевания
<i>Erwinia</i>	<i>E. amylovora</i> , <i>E. tracheiphila</i> <i>E. carotovora</i> , <i>E. carotovora</i>	Ожог, увядание Мягкие гнили
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. syringae</i> , <i>P. mellea</i> . <i>P. rhizogenes</i> , <i>P. tumefaciens</i> .	Пятнистость Рак корней
<i>Xanthomonas</i>	<i>X. campestris</i> , <i>X. heterocea</i>	Пятнистость, увядание
<i>Pectobacterium</i>	<i>P. phetophtorum</i> , <i>P. aroidae</i>	Гнили
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosorum</i>	Рак, язвы
<i>Agrobacterium</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Опухоли
<i>Clavibacter</i>	<i>C. michiganense</i>	Увядание
<i>Streptomyces</i>	<i>S. scabies</i> .	Парша картофеля

Характеристика фитопатогенных бактерий

Грамотрицательные

Род *Erwinia* относятся к представителям семейства *Enterobacteriaceae*. По форме – палочки, могут встречаться как одиночные, так и парами, или в виде цепочек. Это подвижные микроорганизмы, в основном перитрихи. Спор и капсул не образуют. Факультативные анаэробы. Среди рода есть пигментообразующие (золотисто-жёлтые колонии на МПА) и не образующие пигмента микроорганизмы. Представители этого рода встречаются как на поверхности растений, так и в почве, особенно хорошо

сохраняются на растительных остатках, способны вызывать гнили, увядания, некрозы, язвы.

Внутри рода выделяют две группы: группу бактерий «мягкой гнили» и группу бактерий, вызывающих увядание растений. Для бактерий, вызывающих гнили, характерна продукция пектолитических и других мацерирующих ферментов, чаще загниванию подвержены овощные культуры. Бактерии, вызывающие увядания, включают два вида *E. amylovora* и *E. tracheiphila*. *E. amylovora* вызывает ожог у представителей семейства розоцветных, *E. tracheiphila* – бактериальное увядание огурцов. *E. amylovora* относится к наиболее вредоносным патогенам, пораженные им деревья имеют вид обгоревших, поражаются также цветки, плоды, побеги. Наиболее часто поражение происходит весной, цветки высыхают, чернеют, но остаются на деревьях. Пораженные плоды коричневеют и сморщиваются. Считают, что никакая другая болезнь плодовых не причиняет такого ущерба, особенно учитывая, что поражаются около 180 видов растений. Бактерии являются карантинным объектом.

Род Pseudomonas – многочисленная широко распространенная в природе группа бактерий, большинство видов которой являются сапрофитами, обитателями почвы, водоемов, где им принадлежит огромная роль в минерализации органического вещества. Наряду с сапрофитами, в состав рода включены и очень вредоносные фитопатогены. Представители данного рода являются аэробными палочками с полярно расположенными жгутиками. Хемоорганогетеротрофы, способны к росту на самых простых по составу средах. Характерным признаком *Pseudomonas* является способность к продукции пигментов, хотя данный признак не всегда является диагностическим. Для фитопатогенных представителей характерно образование желто-зеленых и синих флюоресцирующих пигментов. Такие пигменты традиционно называют флюоресцеинами, хотя в последнее время употребляют и термин «пиовердины». Бактерии рода *Pseudomonas* способны вызывать у растений пятнистости, некрозы, опухоли и гнили, которые обусловлены изменением метаболизма растительной клетки под влиянием веществ (ферменты, гормоны, токсины), выделяемых патогенами.

Род Xantamonas – прямые палочки. В мазке преимущественно одиночные. Спор и капсул не образуют. Подвижные, в основ-

ном монотрихи, хотя могут встречаться и перитрихи. Выделяют жёлтый пигмент и образуют колонии жёлтого цвета. При культивировании на питательных средах нуждаются в факторах роста и поэтому не растут на простых питательных средах. Основным видом является *X. campestris*, вызывающий сосудистый бактериоз у различных растений.

Род Agrobacterium – прямые палочки одиночные или парные. Подвижные микроорганизмы, в основном перитрихи. Спор и капсул не образуют. Среди рода есть пигментообразующие и не образующие пигмента микроорганизмы. Это факультативные анаэробы. При росте на среде с углеводами выделяют большое количество слизи. Бактерии рода *Agrobacterium* вызывают заболевания практически у всех представителей двудольных и некоторых голосеменных растений. Однодольные растения практически не поражаются. Отличительной особенностью бактерий этого рода является связь между развитием заболеваний и наличием в клетках крупных Ti- и Ri-плазмид, т. е. патогенность агробактерий определяется наличием плазмид. Штаммы, несущие Ti-плазмиду вызывают развитие корончатых галлов или рака, наследующие Ri-плазмиду – волосатость корня. Особенность инфекционного цикла *A. Tumefaciens* – возбудителя корневого рака плодовых – проявляется в его способности длительное время сохраняться в почве. Патоген проникает в растение через повреждения, которые вызывают различные причины (насекомые, механические повреждения при прививке). Бактерия стимулирует нерегулярное интенсивное деление клеток, вследствие чего образуются наросты – опухоли, галлы.

Представители *рода Pectobacterium* имеют палочковидные формы с перитрихальными жгутиками, способны разлагать пектин и вызывать мягкую (мокрую) гниль растений. Бактерии этого рода активны в биохимическом отношении и в своем развитии связаны с насекомыми. *Pectobacterium carotovorum* – возбудитель мокрой гнили моркови, лука, сердцевинной гнили стеблей махорки, редьки и многих других растений. Пораженная ткань размягчается вследствие разрушения срединных пластинок клеток под воздействием фермента протопектиназы и загнивает. *Pectobacterium phytophthorum* – возбудитель черной ножки стеблей, гнили клубней картофеля.

Род *Rhizobium* включает клубеньковые бактерии, которые внедряясь в клетки корней бобовых растений, вызывают их разрастание (образование клубеньков). В клубеньках бактерии с помощью фермента нитрогеназы включают молекулярный азот воздуха в химические соединения, которые усваиваются растениями. Поэтому, несмотря на некоторый вред, наносимый бактериями (отток питательных веществ в зараженные участки корня для формирования клубеньков и питания бактерий), присутствие ризобий в корнях дает ему большие выгоды.

Грамположительные

В группе коринеформных бактерий три рода бактерий имеют фито-патогенных представителей. Наиболее значимыми и распространенными являются бактерии рода *Clavibacter*. Клетки бактерий являются неподвижными полиморфными палочками, строгими аэробами, нуждающимися в некоторых факторах роста. Спор не образуют. Бактерии продуцируют большое количество разнообразных пигментов. Ранее представителей этого рода относили к роду *Corynebacterium*, из которого они в 1988 г. были выделены в отдельный род. Представители данного рода вызывают увядания растений, поражая на ранних стадиях болезни сосуды, а на более поздних и другие части растений. Больные растения отстают в росте, становятся карликовыми с большим количеством стеблей. Листья постепенно теряют зеленую окраску и коричневеют. Темнеют и пораженные сосуды, что особенно хорошо заметно на срезах. Типовым видом является *C. michiganense*.

Представители рода *Streptomyces* относятся к семейству Actinomycetaceae, образуют воздушный мицелия. Колонии складчатые, кожистые или морщинистые. Наиболее экономически значимым из-за причиняемого ущерба является возбудитель парши картофеля *S. scabies*, это заболевание характеризуется поражением клубней и плодов, на поверхности которых образуются трещинки, коростинки и небольшие вздутия.

Заражение растений фитопатогенными бактериями 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 пере-

даче бактериозов ограничена. Возбудители грибковых и бактериальных болезней растений более тесно, чем возбудители заболеваний человека и животных, связаны с почвой, что обусловлено особенностями жизни растений.

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.

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.

При развитии бактериозов могут отмечаться как общие (диффузные), так и местные поражения. При диффузных бактериозах возбудитель проникает в сосудистую систему, распространяется в проводящих пучках и прилегающих к ним тканях. Нарушается нормальное поступление воды и растение погибает. Основным симптомом является увядание. Например, развитие *Clavibacter michiganensis* на растениях томатов вначале проявляется лишь на листьях, затем – на побегах, в итоге растение увядает. Гибель растения – одна из основных причин высокой вредности возбудителей диффузных бактериозов. Местные бактериозы проявляются в поражении паренхиматозных тканей, отдельных органов растений, плодов, побегов. Их основные симптомы – некрозы, хлорозы, гнили, опухоли. Некрозы бактериальной этиологии представляют собой участки отмершей ткани, черной или бурой окраски, которые могут возникать на всех надземных частях растения. Например, некрозы, вызванные *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora*, приводят к уменьшению ассимиляционной поверхности, отмиранию отдельных побегов, гибели завязей и, в итоге, к существенному уменьшению урожая. Поражение сочных, богатых углеводами тканей приво-

дит к появлению гнилей. Под действием ферментов бактериальных клеток, разрушается межклеточное вещество (мацерация ткани), что типично для бактерий *Erwinia*. Относительно редко встречается образование опухолей, что свойственно бактериям рода *Agrobacterium*. При заражении некоторыми видами бактерий могут проявляться одновременно несколько симптомов поражения. Хлорозы часто сопровождают развитие некрозов, зоны их могут сливаться. Возбудитель бактериального рака томатов вызывает увядание, растрескивание стеблей и пятнистость плодов; возбудитель «черной ножки» – увядание стеблей в период вегетации и гниль клубней в период вегетации и при хранении.

Таким образом, для бактериозов характерны следующие свойства:

- патогены бактериальной природы не способны проникать в растительные организмы через неповрежденные покровные ткани;
- заражение растений зависит от наличия капельно-жидкой влаги;
- перенос на значительные расстояния по воздуху ограничен;
- системный характер инфекции, т. е. наблюдается пассивное распространение бактерий в тканях растения через сосудистую систему, заселение соседних тканей и проникновение в семена и т. д.;
- отсутствие для большинства представителей покоящихся форм и неспособность длительное время выживать в почве.

Фитопатогенные микоплазмы (фитоплазмы). Роль микоплазм как возбудителей заболеваний растений была впервые доказана в 1967 году при проведении электронно-микроскопического анализа некоторых пораженных растений. До этого времени часто смешивали заболевания, вызываемые вирусами и микоплазмами из-за сходства симптомов. Однако, в развитии таких заболеваний существует ряд различий:

- 1) микоплазмы переносятся только насекомыми (главным образом цикадками, листоблошками (ксиллидами), повиликой), а период их инкубации и размножения в переносчике достаточно продолжителен: от 2-х недель до 1,5 месяцев. Видовое разнообразие для каждого возбудителя достаточно широко и практически соответствует кругу питающих переносчика растений;

- 2) возбудители термолабильны как в растении, так и в переносчике и повышением температуры можно добиться их аттенуации;
- 3) инокуляция соком больного растения стерильной особи насекомого переносчика приводит к заражению последнего, при этом в ткани переносчика появляются частицы, превосходящие по размерам известные вирусы.

В настоящее время известно более 200 видов растений поражаемых микоплазмами. Общим для этих заболеваний является распространение их в зонах с умеренным и теплым климатом, благоприятствующим развитию сосущих насекомых – основных переносчиков. Наиболее вредоносными микоплазмозами считаются микоплазмозы пшеницы, пасленовых, винограда и некоторых древесных культур.

Взаимодействие микоплазм с их клетками растений-хозяев происходит в три этапа:

1-й этап. Проникновение микоплазм в молодые паренхиматозные клетки флоэмы, где они взаимодействуют с мембранными элементами клетки. Реакция клетки-хозяина проявляется в образовании отдельных выростов мембраны, направленных в сторону клеток микоплазм. Мембранные структуры растительных клеток разбухают и сливаются с мембранными структурами микоплазм.

2-й этап. Дальнейшее развитие инфекции характеризуется нарушением нормального метаболизма растительной клетки. На 3–4 сут. цитоплазма инфицированных молодых клеток темнеет от насыщения рибосомами и полисомами, что свидетельствует об усилении метаболизма пораженных клеток.

3-й этап. В хлоропластах содержится повышенное количество крахмала, что приводит к развитию хлороза и разрушению клеток.

Фитопатогенные представители обнаруживаются в трех семействах микоплазм: *Acholeplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma*. К числу наиболее часто встречающихся у микоплазм факторов патогенности можно отнести продукцию фитотоксинов и ферментов. *Spiroplasma citri* образует два типа токсинов, которые вызывают увядание растений и задерживают прорастание семян. Еще одним из факторов патогенности можно также считать конкуренцию микоплазм с растениями-хозяевами за определенные продукты метаболизма (сахара, аминокислоты).

Микоплазмозы относятся к заболеваниям катастрофическим, часто принимающим характер эпифитотий. При заселении микоплазмами проводящей системы растений и выделении ими продуктов жизнедеятельности обычно происходит усиленное образование дегенеративных клеток флоэмы, в результате больные растения становятся карликовыми, желтушными и увядают. Обычно в пораженных микоплазмами растениях нарушаются процессы регуляции роста, образуются в избытке придаточные почки и побеги, нарушается доминирование верхушки. Растения приобретают вид «ведьминой метлы» из-за образования дополнительных боковых побегов. У них уменьшается размер междоузлий (карликовость), листьев, изменяются генеративные органы, что приводит к бесплодию. После поражения прекращается плодоношение. Из 40 наиболее известных микоплазмозов пасленовых самыми вредоносными считаются «ведьмины метлы» картофеля и столбур томатов.

Фитопатогенные вирусы и вириды. *Вирусы* – мельчайшие (субмикроскопические) возбудители болезней растений, животных и человека, не имеющие клеточного строения и способные размножаться только в живых клетках растения хозяина. Зарегистрировано примерно 600 фитопатогенных вирусов. Большинство вирусов относится к семейству Reoviridae, родам Phytoreovirus, Fijivirus.

При вирусной инфекции имеет место облигатный тип паразитизма, причем его абсолютная форма.

Вирусы растений имеют палочковидную (вирус табачной мозаики), нитевидную (X-вирус картофеля, тристеза цитрусовых), сферическую (некроз табака) и бациллоидную (штриховатая мозаика пшеницы) формы. Размер вирусов составляет от 25 нанометров (нм) у вируса некроза табака, и до 2500 нм у вируса тристезы цитрусовых. Большинство вирусов растений содержит одноцепочечную линейную РНК, реже встречаются вирусы с двух цепочечными молекулами РНК, закрученными в спираль. Лишь немногие вирусы растений (вирус мозаики цветной капусты) имеют в своем составе ДНК.

Механизм размножения вирусов отличается от способов размножения других микроорганизмов. В клетках зараженного растения вирус репродуцируется путем синтеза отдельных молекул нуклеиновых кислот и белка и последующей сборки из них вири-

онов. Нередко вирионы агрегируют друг с другом, образуя вирусные включения – кристаллы различной формы (кристаллы Ивановского), или, если вирионы соединяются с уплотнениями цитоплазмы, образуются включения в виде аморфных тел.

Вирусы, вызывающие болезни растений, могут распространяться различными путями. Многие вирусы распространяются переносчиками, которые питаются или паразитируют на растении. Это, главным образом, насекомые, клещи, нематоды, грибы и паразитические цветковые растения (повилика). Лишь сравнительно небольшое количество фитопатогенных вирусов передается насекомыми с грызущим ротовым аппаратом – такая передача малоспецифична и имеет значение только для вирусов, способных сохраняться в соке больного растения. В зависимости от особенностей передачи насекомыми вирусы делят на персистентные и непersistентные. Персистентные вирусы сохраняют свою инфекционность в организме переносчика в течение нескольких дней, а иногда в течение всей жизни. Непersistентные вирусы могут быть переданы переносчиками в течение ограниченного промежутка времени, часто не более часа. Вирусы могут передаваться контактно-механическим путем, т. е. при взаимоповреждающем контакте частей здорового и больного растения. Это происходит при соприкосновении надземных или подземных частей растений. Часть вирусов (около 20 %) способна передаваться через семена. Некоторые вирусы плодовых и ягодных культур могут передаваться через пыльцу. У вегетативно размножаемых культур (картофель, земляника, тюльпан и др.) вирусы распространяются в основном с посадочным материалом. При различного рода прививках (трансплантации) происходит распространение вирусных болезней. Этим методом передаются все известные фитопатогенные вирусы. Единичные вирусы (вирус мозаики табака, вирус некроза табака) могут передаваться с растительными остатками, с почвой, с гидропонными растворами. Небольшое значение (для вирусов кормовых бобовых трав) имеет место распространения вирусов через стебли повилики.

По характеру воздействия на поражаемое растение вирусы делят на две большие группы – вирусы мозаичного типа (мозаика) и вирусы желтушного типа (желтуха).

Мозаика характеризуется неравномерной расцветкой пораженных органов (листьев), при которой участки с нормально зе-

ленной окраской чередуются со светлоокрашенными пятнами разной величины и формы. Такую мозаичную расцветку листа хорошо наблюдать при прохождении через него света или на фоне белой бумаги. Кроме изменения окраски при мозаичных заболеваниях наблюдается изменение формы листовой пластинки: морщинистость, курчавость, возникающие вследствие того, что жилки листа задерживаются в росте, а мякоть листа продолжает разрастаться, а также уменьшение размеров листа. При некоторых болезнях мозаичная расцветка обнаруживается на лепестках цветков, как, например, при мозаике тюльпана. При мозаичном заболевании томата такая расцветка заметна на незрелых плодах. Мозаичные болезни вызывают отставание в росте, но резко выраженной задержки роста и развития не наблюдается.

При мозаичных болезнях патологические изменения наблюдаются преимущественно в хлорофиллоносных тканях (паренхима листьев). Мозаика проявляется в распаде хлоропластов и поражении палисадной паренхимы. Эти морфологические изменения ведут к ослаблению фотосинтеза, а затем к отмиранию отдельных клеток и участков тканей. При некоторых заболеваниях происходят изменения в анатомическом строении отдельных органов. Например, в хлоротических участках листьев табака, пораженного мозаикой, клетки палисадной паренхимы по форме приближаются к клеткам губчатой паренхимы, а лист становится тоньше. К типу мозаичных болезней относятся: мозаики табака, свеклы, картофеля, малины, сливы, вишни и др.

Желтухи характеризуются равномерным обеднением листьев хлорофиллом, вследствие чего они приобретают желтоватую или светло-зеленую окраску – общий хлороз. В листьях много накапливается крахмала и они становятся более жесткими и хрупкими. При желтухе сахарной свеклы, например, листья при сжатии не мнутся, а ломаются с хрустом. То же отмечается для листьев картофеля, пораженного вирусом скручивания.

При поражении желтухами наблюдается сильная задержка роста и развития растения и различные уродства цветков. При столбуре томата наблюдается гипертрофия чашелистиков, которые могут срастаться, образуя колокольчик; лепестки недоразвиваются и остаются зелеными. При закукливании овса наблюдается гипертрофия пестика, сохраняющего зеленую окраску. Часто наблюдается пролиферация – ненормальное израстание цветка.

Вирусные болезни типа желтухи поражают преимущественно проводящую систему, вызывая в ней патологические изменения: гипертрофию ситовидных трубок, омертвление клеток. Вследствие поражения ситовидных трубок задерживается отток питательных веществ, вырабатываемых листьями, а клетки бывают переполнены продуктами фотосинтеза (крахмалом). Анатомические изменения происходят при некоторых заболеваниях и касаются редукации клеток. В частности, сильная редукация величины клеток наблюдается в тканях карликовых растений овса, пораженного вирусом закукливания, и в нитевидных ростках клубней картофеля, пораженного столбурным увяданием. К желтухам относятся: мозаика пшеницы, закукливание злаков, столбур пасленовых, скручивание листьев картофеля и др.

По характеру проявления симптомы вирусных болезней растений можно разделить на 5 основных типов:

1. Угнетение роста.
2. Изменение окраски листьев, которые приобретают мозаичную расцветку.
3. Деформация органов.
4. Локальные некрозы.
5. Нарушение репродуктивных функций растений.

При одном и том же вирусном заболевании на растении обычно проявляется несколько типов симптомов. Симптомы вирусных заболеваний могут изменяться по мере развития патологического процесса.

Вредоносность вирусных заболеваний проявляется, главным образом, в снижении урожайности растений и ухудшении качества продукции. Особый вред вирусы наносят при выращивании семенного и посадочного материала. Поражение вирусами отрицательно влияет на пищевую и кормовую ценность продукции, пригодность её к промышленной переработке. Вирусы вызывают у растений стерильность и несовместимость, что отрицательно сказывается на работе селекционеров. У цветочных культур теряется декоративность, что наносит значительный экономический ущерб. Под действием вирусов теряются сортовая чистота, холодостойкость, зимостойкость, снижается всхожесть семян. В среднем размер убытков от развития вирусных болезней составляет примерно 20 % общего экономического ущерба, обусловленного

деятельностью всех групп возбудителей болезней и вредителей сельскохозяйственных культур.

Вироиды как новый класс патогенов был открыт Т. Динером в 70-х годах XX в. К этой группе фитопатогенов относят вирусоподобные инфекционные агенты, представляющие собой низкомолекулярную одноцепочную РНК, ковалентно замкнутую, имеющую низкую молекулярную массу ($2,5 \times 10^4 - 15 \times 10^4$), являющуюся носителем инфекционности и использующую для своей репликации биосинтетическую систему клетки растения-хозяина.

Вироиды были идентифицированы как возбудители опасных болезней. Один из них стал причиной гибели миллионов кокосовых пальм на Филиппинах за последние пятьдесят лет, другой нанес урон промышленному разведению хризантем в США в начале 1950-х гг. Первый вириод веретеновидности клубней картофеля, или PSTV был идентифицирован в 1971 году. Это самый крупный из известных вириодов; его РНК состоит из 359 нуклеотидов и имеет форму либо замкнутого кольца, либо структуру типа шпильки. Комплементарные пары оснований соединены водородными связями, образуя двунитевую РНК. Вироиды обнаружены только в ядрах инфицированных клеток. Они реплицируются подобно вирусам, т. е. синтезируют комплементарную цепь, которая функционирует как матрица. При этом вириоды используют ферментные системы клетки-хозяина.

Вироиды характеризуются высокой инфекционностью, термостабильностью, стойкостью к воздействию различных химических соединений. Вироиды распространяются с посадочным материалом, с семенами, передаются от растения к растению механическим путем. Так, вириод экзокортиса цитрусовых быстро распространяется при прививках.

Наиболее характерные симптомы вириодозов: угнетение роста, уменьшение размеров растения и отдельных его органов (листьев, цветков, плодов), ослабление интенсивности окраски, хлороз и антоцианоз листьев, деформация различных органов.

Фитопатогенные грибы. Грибы, вызывающие заболевания лесных пород и культурных растений, наносят огромный ущерб. Массовые грибковые заболевания растений (эпифитотии) могут быть причиной голода населения целых стран. Болезни снижают потенциальный урожай на 10–20 % и более. Поражая лекарствен-

ные растения, грибы, как и другие микроорганизмы, делают их непригодными для использования в качестве сырья в фармацевтической промышленности.

Фитопатогенные грибы подразделяют на экто- и эндопаразиты. *Эктопаразиты* распространяются преимущественно по листьям, внедряясь в клетки хозяина только специализированными органами (например, гаусториями), и спорносятся на его поверхности. К ним относятся возбудители мучнистой росы злаков, тыквенных, табака, картофеля. *Эндопаразиты* развивают свой таллом внутри хозяина, при спороношении они выходят наружу.

В зависимости от типа взаимоотношения гриба и растения-хозяина различают облигатные и факультативные паразиты. Первые поражают только живые ткани и не растут на обычных питательных средах. К таким грибам относятся, например *Russinia graminis* (черная ржавчина злаков) и *Peronospora tabacina* (ложная мучнистая роса табака). Факультативные паразиты также поражают живые ткани растения, но после его отмирания не погибают, они могут расти на лабораторных питательных средах. К ним относятся многочисленные грибы, разрушающие древесину. Они вызывают практический интерес в связи с проблемой утилизации отходов сельского и лесного хозяйства.

Фитопатогенные грибы различаются по специфичности выбора растения-хозяина. Например, среди возбудителей мучнистой росы *Erisiphales* имеются как виды, поражающие только определенные расы хозяина, так и грибы, которые поражают растения из разных порядков. Ржавчинные грибы *Russinia graminis* в гаплофазе развивается на барбарисе, а в дикариотической – на злаках.

Некоторые паразитические грибы предпочитают отдельные органы растений. Например, пурпурная спорынья *Claviceps purpurea* инфицирует только завязи злаков, *Ustilago violacea* (возбудитель головни злаков) – только тычинки. Грибы рода *Verticillium* развиваются в сосудах растения, нарушая движение соков, что приводит к его увяданию и гибели. Гриб проникает в ткань растения через устьица или через раны на его поверхности; они способны прорывать поверхностные структуры своими инфекционными гифами. Далее гриб распространяется по растению, что сопровождается появлением симптомов его заболевания. На следующей стадии инфекционного процесса гриб

развивает органы спороношения, а реакция растения зависит от количества и качества возбудителя заболевания.

12.4. Меры профилактики и борьбы с инфекционными болезнями растений

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 *Helminthosporium 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

Некоторые болезни передаются семенами, поэтому важным мероприятием оказывается обеззараживание семян. Одним из источников инфекции являются опавшие на поверхность почвы пораженные растительные остатки. Поэтому эффективна глубокая зяблевая вспашка, способствующая перемещению паразитов вглубь почвы, где они погибают под антагонистическим воздействием бактерий и актиномицетов или поедаются простейшими

животными. Важное значение имеет сбор и уничтожение опавших листьев, плодов, ветвей, правильный севооборот, препятствующий накоплению в почве заразного начала. Широко используются меры химической защиты растений. Большое значение имеет правильная обработка почвы и внесение удобрений, что повышает сопротивляемость культурных растений. Весьма важны выведение и подбор устойчивых к заболеваниям сортов, интересны также сверхчувствительные сорта, быстрая гибель которых ведет к прекращению развития паразитического гриба. Инфекцию могут распространять также и зеленые растения, в которых бактерии хорошо сохраняются и переносятся в новые районы страны вместе с зараженными растениями (черенки, окулировочные материалы – глазки). Одним из основных источников заражения бактериозами являются остатки больных растений. Особенно долго и хорошо фитопатогенные бактерии сохраняются в деревянистых частях растений. Некоторые виды насекомых также могут являться источником первичной инфекции. Большую опасность в распространении бактериозов представляют капельки дождя с мелкими частицами остатков больных растений, которые ветром и воздушными течениями разносятся на далекие расстояния (воздух сам по себе не играет роли в непосредственной передаче).

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 карантин 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.

12.5. Микрофлора растительного лекарственного сырья

Обсемененность микробами растений, в том числе и лекарственных, может быть очень высокой и зависит от условий их произрастания, от характера растения, высоты стебля и других причин. Микрофлора растений, а, следовательно, растительного лекарственного сырья, чрезвычайно разнообразна. На поверхности растений обнаруживаются представители микрофлоры почвы, среди которых основное место занимают спорообразующие бактерии, актиномицеты и грибы.

Особенно сильно заселяются микробами срезанные и сорванные растения, т. к. они являются лучшей питательной средой, чем живые растения. Среди микроорганизмов, встречающихся на растениях и в растительном лекарственном сырье, могут встречаться фитопатогенные виды, т. е. виды, вызывающие заболевания растений. Некоторые виды микроорганизмов, находящиеся в лекарственном растительном сырье и обладающие сильной ферментативной активностью, могут при соответствующих условиях разрушать фармакологически активные вещества, тем самым, снижая ценность лекарства.

Консервирование лекарственного сырья и условия его хранения оказывают существенное влияние на микробную обсемененность. При хранении в условиях повышенной влажности микроорганизмы не только более длительно сохраняют жизнеспособность, но могут размножиться и вызывать порчу лекарственного сырья. Порчу лекарственного сырья обнаруживают по изменению цвета высушенного растения, появлению очагов размножения плесени и др.

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 и 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 рН 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.

В связи с этим для предупреждения возможности загрязнения лекарственных средств необходимо соблюдать следующие правила:

1. Использовать сырьё, не повреждённое микроорганизмами.
2. Правильно транспортировать хранить сырьё и готовые лекарственные формы, соблюдая санитарно-гигиенические требования.
3. Соблюдение санитарно-гигиенических норм на этапах технологического процесса (стерилизация, дезинфекция, дератизация и проч., надёжность упаковочного материала, тары).
4. В лекарственных формах, предназначенных для многократного пользования должен добавляться консервант.
5. Соблюдение правил личной гигиены.

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*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Accharomyces*, *Candida*, *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Actinomyces*, иногда – *Sporotrichum* и др.), актиномицеты, спорообразующие виды бактерий (*B. subtilis*, *B. mesentericum*) а также неспоровые (*Chromobacterium aurantiacum*, *Phylomonas* и др.).

12.6. Определение микробной обсемененности растительного лекарственного 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 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ МПА, перемешивают и после застывания агара посева инкубируют при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 $20\text{--}22 \text{ }^\circ\text{C}$ 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. 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 10^4 микроорганизмов, их них до 10^3 грибов.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выбрать один правильный ответ.

1. ЭПИФИТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – ЭТО

- 1) микроорганизмы, находящиеся на корнях растений
- 2) микроорганизмы, вызывающие заболевания растений
- 3) микроорганизмы, населяющие надземные части растений
- 4) микроорганизмы, организма человека

2. МИКОРИЗА ВПЕРВЫЕ ОПИСАНА

- 1) И.И. Мечниковым
- 2) Л. Пастером
- 3) Р. Кохом
- 4) Ф.М. Каменским

3. МИКОРИЗА – ЭТО

- 1) морфологически единое образование, состоящее из гриба и частей корневой системы растения
- 2) морфологически единое образование, состоящее из гриба и бактерий корней растения
- 3) морфологически единое образование, состоящее из плесневых и шляпочных грибов
- 4) морфологически единое образование, состоящее из переплетенных корней разных растений

4. РИЗОСФЕОРНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – ЭТО

- 1) микроорганизмы, находящиеся на корнях растений
- 2) микроорганизмы, вызывающие заболевания растений
- 3) микроорганизмы, населяющие надземные части растений
- 4) микроорганизмы, организма человека

5. НАИБОЛЬШЕЕ КОЛИЧЕСТВО МИКРООРГАНИЗМОВ ОБИТАЕТ

- 1) на поверхности корней растений
- 2) в радиусе 15 см вокруг корней растений
- 3) в радиусе 50 см вокруг корней растений

6. ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – ЭТО

- 1) возбудители заболеваний сельскохозяйственных растений
- 2) возбудители заболеваний листовых растений
- 3) возбудители заболеваний растений
- 4) возбудители заболеваний лекарственных растений

7. ИНФЕКЦИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ РАСТЕНИЙ, ВЫЗВАННЫЕ ГРИБКАМИ, НАЗЫВАЮТСЯ

- 1) бактериозы
- 2) актиномикозы
- 3) микозы
- 4) микофитозы

8. ЗАРАЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ ФИТОПЛАЗМОЗАМИ ПРОИСХОДИТ

- 1) через воду
- 2) через почву
- 3) при контакте с больным человеком
- 4) через насекомых

9. ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ КОЛЬЦЕВЫЕ МОЛЕКУЛЫ ОДНОНИТЕВОЙ РНК, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ РАСТЕНИЙ НАЗЫВАЮТСЯ

- 1) прионы
- 2) вирусы
- 3) микоплазмы
- 4) вириды

10. ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ ОПРЕДЕЛЯЮТ

- 1) ОМЧ
- 2) ОМЧ и бактерии семейства Enterobacteriaceae
- 3) ОМЧ и дрожжевые и плесневые грибы
- 4) условно-патогенные бактерии

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Глава 1

Требования к производству лекарственных препаратов и микробиологическому контролю санитарного состояния производственных помещений

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	2	6	3
2	1, 2, 3, 4	7	2
3	3	8	1, 2, 3
4	4	9	2
5	1	10	3

Глава 2

Микробиологическая лаборатория на фармацевтическом предприятии. Правила работы

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	1	6	4
2	1, 3, 4	7	1, 3
3	2, 4	8	2
4	3, 4	9	4
5	3	10	1, 3, 4

Глава 3

Питательные среды для микробиологического контроля

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	1	6	4
2	2	7	2
3	4	8	1, 3, 4
4	1, 2, 3	9	1
5	3	10	1

Глава 4

Чистые помещения на фармацевтических предприятиях

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	3	6	3
2	2	7	1
3	1	8	3
4	1	9	3
5	2	10	4

Глава 5
Микрофлора воздуха и методы ее изучения

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	3	6	2
2	1	7	4
3	3	8	3
4	1	9	2
5	1	10	3

Глава 6
Микробиологический контроль в чистых помещениях

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	1	6	3
2	2	7	3
3	3	8	4
4	2	9	4
5	3	10	1

Глава 7
**Микробиологический контроль воды очищенной и
воды для инъекций**

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	3	6	2
2	1	7	1
3	3	8	3
4	4	9	3
5	3	10	2

Глава 8
Контроль лекарственных препаратов на стерильность

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	4	7	3
2	2	8	3
3	1	9	4
4	2	10	2
5	1	11	4
6	3	12	4

Глава 9
Контроль лекарственных препаратов на
микробиологическую чистоту

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	2	6	2
2	1	7	1
3	2	8	1
4	2	9	2
5	3	10	1

Глава 10
Контроль лекарственных препаратов, обладающих
антимикробным действием

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	1	6	4
2	1	7	2
3	3	8	3
4	2	9	2
5	1	10	1

Глава 11
Микробиологический контроль
иммунобиологических препаратов

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	3	6	1
2	2	7	2
3	3	8	3
4	1	9	2
5	3	10	3

Глава 12
Микрофлора лекарственного растительного сырья.
Методы микробиологического исследования

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	3	6	3
2	4	7	4
3	1	8	4
4	1	9	4
5	1	10	3

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Тест-штаммы, применяемые для контроля питательных сред

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для культивирования микроорганизмов</i>							
Питательный бульон для культивирования микроорганизмов (сухие: СПБ, ГРМ-бульон, ГМФ-бульон; готовые к употреблению: бульон Хоттингера, мясо-пептонный бульон)	Жидкая	Для культивирования различных микроорганизмов	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	S.xerosis 1911 S.aureus Wood-46**	10 ⁻⁶	44-48 ч (37±1) °C	Рост S. xerosis, S. aureus, E. coli, P. aeruginosa в виде диффузного помутнения, S. pyogenes в виде придонно-пристеночного роста (возможно слабое диффузное помутнение)
				S.pyogenes Dick I	10 ⁻⁴		
				E.coli (O55:K59) 3912/41** P.aeruginosa 27/99**	10 ⁻⁷		
			Стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	S. flexneri 1a 8516*** S. typhi Н-901 ГДР/ГИСК ****	1 бак. петля	20-24 ч (37±1) °C	Образование индола (S. flexneri) и сероводорода (S. typhi) определяемое по индикатору

Примечание: * - тип (консистенция) питательной среды, подготовленной к применению;

** - тест-штамм для контроля ГРМ-бульона;

*** - тест-штамм не обязателен для контроля мясо-пептонного бульона;

**** тест-штамм не обязателен для контроля мясо-пептонного бульона и бульона Хоттингера

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для культивирования микроорганизмов</i>							
Питательный агар для культивирования микроорганизмов, сухой (СПА, ГРМ-агар, ГМФ-агар; готовые к употреблению: агар Хоттингера, мясо-пептонный агар)	Плотная	Для культивирования различных микроорганизмов	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	S. flexneri 1a 8516 S. sonnei «S-form»	10 ⁻⁶	18-20 ч (37±1) °C	Рост в виде изолированных колоний, бесцветных, прозрачных
			Стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	P. aeruginosa 27/99 S. marcescens 303 или S. plymuthica 1	10 ¹	18-20 ч (37±1)°C S.marcescens 1 при (2 ±2) °C	Образование синезеленого или зеленого пигмента P. aeruginosa 27/99 и оранжево-красного S. marcescens 1

Примечание: * - тип (консистенция) питательной среды, подготовленной к применению;

** - тест-штамм для контроля ГРМ-бульона;

*** - тест-штамм не обязателен для контроля мясо-пептонного бульона;

**** тест-штамм не обязателен для контроля бульона Хоттингера

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения и дифференциации возбудителей аэробной инфекции, сухая	Плотная	Для выделения и дифференциации возбудителей аэробной инфекции/стафилококка, синегнойной палочки, кишечной палочки/из раневого содержимого	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	S. aureus «Виотко» P. aeruginosa 89 E. coli 3912/41 (O55:K59) P. mirabilis 3177	10 ⁻⁷	18-22 ч (37±1) °C	Рост в виде единичных колоний. Колонии S. aureus – круглые, оранжевые с черным центром или без него, E. coli – серые или серо-голубые, P. aeruginosa – розового цвета
			Дифференцирующие свойства	Смеси (1:1): 1. S. aureus + E. Coli 2. P. aeruginosa + E. coli 3. P. aeruginosa + S. aureus	из 10 ⁻⁵ разбавленное в 5 раз (условно 10 ⁻⁶)		Четкая дифференциация: S. aureus – в виде оранжевых колоний с черным центром или без него; E. coli в виде серых или серо-голубых колоний; P. aeruginosa в виде колоний розового цвета
			Ингибирующие свойства	P. mirabilis 3177	10 ⁻⁶		На среде подавляется «роение» P. mirabilis, колонии в О-форме, прозрачные красноватого цвета, на питательном агаре «роение» наблюдается

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения и дифференциации энтеробактерий, сухая (среда Кода, SDS-бульон)	Жидкая	Для выделения и дифференциации энтеробактерий по признаку ферментации лактозы при санитарном обследовании пищевых продуктов (<i>среда Кода</i>), объектов внешней среды/вода, смывы и др./ (<i>SDS-бульон</i>)	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	E. coli Ewing (0124:K72) 227; K. pneumoniae 3534/51; C. freundii 101/57; S. marcescens 1; S. flexneri 1a 8516	10 ⁻⁶	44–48 ч (37±1) °C	Рост в виде диффузного помутнения среды с изменением цвета с зеленого на желтый
			Дифференцирующие свойства	E. coli 675; E. aerogenes 10006	10 ⁻⁶	20–24 ч (37±1) °C	Диффузное помутнение среды без изменения цвета
			Ингибирующие свойства	P. vulgaris НХ19222 S. aureus Wood-46	10 ⁻¹	44–48 ч (37±1) °C	На среде подавляется рост стафилококка и протей. Среда остается прозрачной без изменения цвета, в питательном бульоне наблюдается диффузное помутнение

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для обнаружения бактерий группы кишечной палочки, сухая (среда Кесслера-ГРМ)	Жидкая	Для обнаружения бактерий группы кишечной палочки по признаку ферментации лактозы при санитарно-бактериологическом обследовании пищевых продуктов и объектов внешней среды	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	E. coli 675; K. pneumoniae 418; C. freundii 101/57; E. aerogenes 10006; P. aeruginosa 27/99	10^{-6}	22-24 ч (37±1) °C E. coli 675 при (43±1) °C	Рост E. coli, K. pneumoniae, C. freundii в виде диффузного помутнения среда и газообразования; E. aerogenes – в виде диффузного помутнения среда и слабого газообразования; P. aeruginosa – в виде слабого помутнения среда без газообразования
			Ингибирующие свойства	P. vulgaris HX19222; S. aureus Wood-46	10^{-4}	44-48 ч (37±1)	На среде подавляется рост стафилококка и протей. Среда остается прозрачной, в питательном бульоне наблюдается диффузное помутнение

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения энтеробактерий, сухая (агар Эндо)	Плотная	Выделение энтеробактерий из исследуемого материала и их дифференциация по признаку ферментации лактозы (лактозоотрицательные шигеллы от лактозоположительных эшерихий)	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	S. sonnei «S-form»; S. dysenteriae I 1362; E. coli 3912/41 (O55:K59); E. coli 168/59; (O111:K58)	10 ⁻⁶ разбавленное 1:1 (условно 10 ⁻⁷)	18–20 ч (37±1) °C	Рост в виде изолированных колоний. Колонии S. dysenteriae I прозрачные, бесцветные, S. sonnei бесцветные или могут быть слегка розовыми, со слабо-выраженным центром E. coli 3912/41 – красные с металлическим блеском, E. coli 168/59 – металлический блеск может быть менее выраженный
			Дифференцирующие свойства	Смеси (1:1): 1. S. sonnei «S-form» и E. coli 168/59 (O111:K58); 2. S. dysenteriae I 1362 и E. coli 3912-41 (O55:K59)	10 ⁻⁶		Лактозоотрицательные энтеробактерии образуют прозрачные или полупрозрачные бесцветные колонии (могут образовывать колонии бледно-розового цвета). Лактозоположительные энтеробактерии образуют колонии красного цвета с металлическим блеском или без него
			Ингибирующие свойства	S. aureus Wood-46	10 ⁻¹		На среде подавляется рост стафилококка, на питательном агаре наблюдается газонный рост

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения и дифференциации энтеробактерий селективная сухая (типа Макконки агара)	Плотная	Выделение энтеробактерии из исследуемого материала (моча, фекалии, пищевые продукты, вода) и их дифференциация по признаку ферментации лактозы	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	E. coli 3912/41 (O55:K59); S. typhimurium 79; S. flexneri 1a 8516	10 ⁻⁶	18-20 ч (37±1) °C	Рост в виде изолированных колоний. Колонии E.coli ярко-розовые, S. flexneri – полупрозрачные, бесцветные, S. typhimurium – полупрозрачные, бесцветные. Колонии P. mirabilis F-392 изолированные, бесцветные в О-форме колонии без «роения». На питательном агаре «роение» наблюдается
			Дифференцирующие свойства	Смесь (1:1): E.coli 3912/41 (O55:K59) с S. typhimurium 79	10 ⁻⁶		Лактозоположительные энтеробактерии растут в виде ярко-розовых колоний, лактозоотрицательные – в виде бесцветных
			Ингибирующие свойства	S. aureus 209-P	10 ⁻¹		На среде подавляется рост стафилококка, на питательном агаре наблюдается газонный рост. На среде подавляется «роение» протей, на питательном агаре «роение» наблюдается
				P. mirabilis F-392	10 ⁻⁶		

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения бактерий родов Proteus, Providenci, Morganella, сухая	Плотная	Для выделения бактерий родов Proteus, Providencia, Morganella из инфицированного материала	Чувствительность среды	P. mirabilis 3177; P. alcalifaecins 1035-49;	10 ⁻⁷	20–22 ч (37±1) °C	Рост в виде единичных колоний
				P. vulgaris НХ19; M. morganii 1707	10 ⁻⁶		Рост в виде изолированных колоний
			Стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	P. mirabilis 3177; P. alcalifaecins 1035-49;	10 ⁻⁶		Наблюдается формирование колоний в О-форме, без «рое-ния» голубоватого цвета Возможна Н-форма колоний P. vulgaris и P. Mirabilis с зоной роения не более 5 мм
				P. vulgaris НХ19; M. morganii 1707 P. rettgeri I (Титов)	10 ⁻⁵		
Ингибирующие свойства	E. coli 3912/41 (O55:K59); S. aureus 209-P; P. aeruginosa 08 Habs	10 ⁻¹	44–48 ч (37±1) °C	На среде подавляется рост кишечной палочки, стафилококка, синегнойной палочки, на питательном агаре наблюдается газонный рост этих микроорганизмов			

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения сальмонелл и шигелл, сухая (SS-агар, бактоагар Плоскирева)	Плотная	Для выделения сальмонелл и шигелл из исследуемого материала (фекалии, моча и др.) и их дифференциация от других энтеробактерий по признаку ферментации лактозы	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	S. typhi Н-901 ГДР/ГИСК; S. paratyphi A 225; S. flexneri 1a 8516; S. sonnei «S-form»	10 ⁻⁶ разбавленное 1:1 (условно 10 ⁻⁷)	18–20 ч (37±1) °С	Рост в виде изолированных колоний. Колонии S. typhi, S. paratyphi, S. flexneri – бесцветные; S. sonnei – бесцветные или слегка розовые, E. coli – красные
			Дифференцирующие свойства	Смеси (1:1): 1. S. typhi Н-901 ГДР/ГИСК и E. coli 3912/41 (O55:K59); 2. S. paratyphi A 225 и E. coli 3912/41 (O55:K59); 3. S. flexneri 1a 8516 и E. coli 3912/41 (O55:K59); 4. S. sonnei «S-form» и E. coli 3912/41 (O55:K59)	шигеллы и сальмонеллы 10 ⁻⁶ ; E. coli 3912/41 (O55:K59) 10 ^{-4*} , 10 ⁻⁵		Хорошая дифференциация: колонии сальмонелл – бесцветные; шигелл – бесцветные или слегка розовые, эшерихий – красные

Примечание: * - тест-штамм не обязателен для контроля бактоагара Плоскирева

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения сальмонелл и шигелл, сухая (SS-агар, бактоагар Плоскирева)	Плотная	Для выделения сальмонелл и шигелл из исследуемого материала (фекалии, моча и др.) и их дифференциация от других энтеробактерий по признаку ферментации лактозы	Ингибирующие свойства	S. aureus Wood-46;	10 ⁻¹	18–20 ч (37±1) °С	На средах подавляется рост стафилококка, на питательном агаре наблюдается газонный рост. На средах подавляется рост эшерихий не менее, чем в три раза по отношению к числу колоний на питательном агаре. На SS-агаре подавляется «роение» протей, на бактоагаре Плоскирева и питательном агаре «роение» наблюдается
				E. coli 3912/41 (O55:K59);	10 ⁻⁵ 10 ^{-6**}		
				P. mirabilis 3177*; P. vulgaris HX19222*	10 ⁻⁵		

Примечание: * - тест-штамм не обязателен для контроля бактоагара Плоскирева;

** - разведение не обязательно для контроля SS-агара

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения и дифференциации <i>E. coli</i> O157:H7 и др. энтеробактерий по признаку ферментации сорбита, сухая (сорбитол <i>E. coli</i> O157:H7 агар, ЭДКС-агар)	Плотная	Выделение и идентификация <i>E. coli</i> O157:H7 и др. энтеробактерий из исследуемого материала (фекалии, питьевая и сточные воды, пищевые продукты и др.) по признаку ферментации сорбита	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	<i>E. coli</i> 4 (O157:H7); <i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59); <i>S. typhimurium</i> 79; <i>S. flexneri</i> 1a 8516	1:1 из 10 ⁻⁶ (условно 10 ⁻⁷)	18–20 ч (37±1) °С	Рост в виде изолированных колоний. На сорбитол агаре колонии <i>E. coli</i> 4 (O157:H7) и <i>S. flexneri</i> - бесцветные или светлорозовые, <i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59) – малиновые со слабовыраженным металлическим блеском или без него, <i>S. typhimurium</i> – малиновые с металлическим блеском. На ЭДКС-агаре колонии <i>E. coli</i> 4 (O157:H7) полупрозрачные, бесцветные, колонии <i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59) желтого цвета, <i>S. flexneri</i> , полупрозрачные, бесцветные, <i>S. typhimurium</i> желтого цвета

Примечание: * - тест-штамм не обязателен для контроля Сорбитол *E. coli* O157:H7 агара

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения и дифференциации <i>E. coli</i> O157:H7 и др. энтеробактерий по признаку ферментации сорбита, сухая (сорбитол <i>E. coli</i> O157:H7 агар, ЭДКС-агар)	Плотная	Выделение и идентификация <i>E. coli</i> O157:H7 и др. энтеробактерий из исследуемого материала (фекалии, питьевая и сточные воды, пищевые продукты и др.) по признаку ферментации сорбита	Дифференцирующие свойства	Смеси (1:1) 1. <i>E. coli</i> 4 (O157:H7) с <i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59); 2. <i>E. coli</i> 4 (O157:H7) с <i>S. typhimurium</i> 79	10 ⁻⁶	18–20 ч (37±1) °С	На средах сорбитотрицательные энтеробактерии, в том числе <i>E. coli</i> 4 (O157:H7) образуют полупрозрачные, бесцветные или светло-розовые колонии. Сорбитоположительные колонии на Сорбитол <i>E. coli</i> O157:H7 агаре образуют колонии розовато-малинового или малинового цвета с металлическим блеском или без него, на ЭДКС-агаре – желтые
			Ингибирующие свойства	<i>S. aureus</i> Wood-46	10 ⁻¹		На средах ингибируется рост стафилококка, на питательном агаре – газонный рост. На среде ЭДКС-агар подавляется «роение» протей, на среде Сорбитол <i>E. coli</i> O157:H7 агар и питательном агаре «роение» наблюдается
				<i>P. vulgaris</i> НХ19222*	10 ⁻⁵		

Примечание: * - тест-штамм не обязателен для контроля Сорбитол *E. coli* O157:H7 агара

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения сальмонел, сухая (висмут-сульфит агар)	Плотная	Сальмонеллы	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	S. typhi Н-901 ГДР/ГИСК; S. typhimurium 79; S. london 3496; S. paratyphi A 225; S. gallinarum 665; S. typhibismuth	10 ⁻⁶ разбавленное 1:1 (условно 10 ⁻⁷)	44–48 ч (37±1)°C	Рост в виде изолированных колоний. Колонии S. typhi, S. typhimurium, S. london черные с блестящей зоной вокруг и черным цветом среды под ними; S. paratyphi – зеленые с темным центром; S. gallinarum – зеленые; S. typhibismuth – полиморфные черные с окрашиванием среды под ними в черный цвет
			Дифференцирующие свойства	Смеси (1:1) S.typhimurium 79 и E.coli 3912/41 (O55:K59)	10 ⁻⁶ 10 ⁻³ и 10 ⁻⁴		Рост сальмонелл в виде черных колоний с блестящей зоной вокруг них и окрашиванием в черный цвет среды под колониями. S. paratyphi и S. gallinarum образуют зеленые колонии. Эшерихии растут в виде зеленовато-коричневых колоний
			Ингибирующие свойства	S. aureus Wood-46;	10 ⁻¹		На среде подавляется рост стафилококков, клебсиелл и «роение» протей. На питательном агаре наблюдается газонный рост стафилококка, густой рост клебсиелл и «роение» протей
				K. rhinoscleromatis NCTC 5046;	10 ⁻⁵		
		P. vulgaris HX19222	10 ⁻⁶				

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Среда для выделения сальмонелл-ПД, сухая (питательная среда с бриллиантовым зеленым и феноловым красным)	плотная	Для выделения сальмонелл из исследуемого материала для санитарно-бактериологического контроля пищевых продуктов и лекарственных средств	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	S. paratyphi S. typhimurium 301 E. coli ATCC 25922	10 ⁻⁶	18-20 ч (37±1) °C	Рост в виде изолированных колоний. Колонии S. paratyphi А 225 розового цвета с розовым ореолом, S. typhimurium 301 – розово-красного цвета с розово-красным ореолом, E. coli ATCC 25922 желто-зеленые с желто-зеленым ореолом
			Дифференцирующие свойства	Смесь (1:1) S. typhimurium 301 и E. coli ATCC 25922	10 ⁻⁶		Хорошая дифференциация сальмонелл (колонии розового или розово-красного цвета) от эшерихий (колонии желто-зеленые)
			Ингибирующие свойства	S. aureus 209 P	10 ⁻³		На среде подавляется рост стафилококка, на питательном агаре наблюдается густой рост

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения стафилококков сухая (солевой агар-М, электролитный солевой агар)	Плотная	Для выделения стафилококков из исследуемого материала (пищевые продукты, грудное молоко, смывы, вода, кровь, кал и др.)	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	S. epidermidis ATCC 14990; S. saprophyticus ATCC 15305;	10 ⁻⁶	48 ч (37±1) °С	Рост в виде изолированных и единичных колоний. Колонии S. aureus «Виотко» желтого цвета, S. epidermidis и S. saprophyticus белого цвета
				S. aureus «Виотко»	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷		
			Ингибирующие свойства	E. coli 168/59 (O111:K58); P. aeruginosa 273; P. vulgaris HX19222	10 ⁻²		

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения синегнойной палочки, сухая (ЦПХ-агар)	Плотная	Для селективного выделения культуры <i>Pseudomonas aeruginosa</i> из инфицированного материала (отделяемое ожоговых и хирургических ран, кал, моча)	Чувствительность среды	<i>P. aeruginosa</i> 08 (Habs); <i>P. aeruginosa</i> 26; <i>P. aeruginosa</i> 165	10^{-7}	23–25 ч (37±1) °С	Рост в виде единичных колоний
			Стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	<i>P. aeruginosa</i> 08 (Habs); <i>P. aeruginosa</i> 26; <i>P. aeruginosa</i> 165	10^{-6}		Колонии <i>P. aeruginosa</i> полупрозрачные с окрашиванием среды в зеленый или сине-зеленый цвет
			Ингибирующие свойства	<i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59); <i>S. aureus</i> 209-P; <i>P. vulgaris</i> HX19222	10^{-2}	46–50 ч (37±1) °С	На среде подавляется рост стафилококка, протей, кишечной палочки, на питательном агаре наблюдается газонный рост этих микроорганизмов

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения и дифференциации коринебактерий, сухая (среда Бучина)	Плотная	Для выделения и дифференциации коринебактерий из инфицированного материала	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	C. Diphtheriae mitis 6765; C. Diphtheriae gravis 665; C. Xerosis 1911; C. Ulcerans 675	$10^{-6}, 10^{-7}$	44–48 ч (37±1) °C	Рост в виде изолированных и единичных колоний. Колонии C. Diphtheriae mitis и C. Ulcerans темно-синие, гладкие, C. Diphtheriae gravis темно-синие шероховатые, C. Xerosis – серовато-голубые
			Дифференцирующие свойства	Смесь (1:1) C. Diphtheriae mitis 6765 и C. Xerosis 1911	10^{-6}		Четкая дифференциация. На среде коринебактерии дифтерии растут в виде темно-синих колоний, дифтероиды образуют колонии серовато-голубого цвета
			Ингибирующие свойства	S. Aureus Wood-46	10^{-3}		На среде подавляется рост стафилококка, на питательном агаре наблюдается густой рост

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения коринебактерий, сухая (Коринебак-агар)	Плотная	Выделение коринебактерий из инфицированного материала	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	C. diphtheriae mitis 6765; C. diphtheriae-gravis 665; C. xerosis 1911; C. ulcerans 675	$10^{-6}, 10^{-7}$	20–48 ч (37±1) °C	Рост с образованием через 20–24 ч не менее 20 колоний на одной чашке, через 44–48 ч – не менее 30 колоний. Через 48 ч колонии C. diphtheriae mitis темно-серые, гладкие; C. diphtheriae gravis – темно-серые, шероховатые; C. ulcerans и C. xerosis – серовато-черные, гладкие
			Ингибирующие свойства	S. aureus Wood-46; S. pyogenes Dick I	10^{-3}	46–48 ч (37±1) °C	На среде подавляется рост стафилококков и стрептококков, на питательном агаре наблюдается густой рост

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения грибов рода <i>Candida</i> , сухая (Кандида-агар)	Плотная	Для выделения грибов <i>Candida</i> из патологического материала, а также при санитарном обследовании объектов внешней среды	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	<i>C. albicans</i> 259/NCTC/885/6 53; <i>C. brumptii</i> 530/ИБФМ-J-40	$10^{-5}, 10^{-4}$	23–25 ч (37 ± 1) °C	Рост в виде изолированных и единичных колоний. Колонии <i>C. albicans</i> плотные, с ровными краями, белого цвета, выпуклые, блестящие; <i>C. brumptii</i> – плотные с ровными или волнистыми краями, беловато-кремового цвета, плоские, с неровной поверхностью. На среде подавляется рост кишечной палочки, протей, стафилококка, на питательном агаре наблюдается газонный рост этих микроорганизмов
			Ингибирующие свойства	<i>E. coli</i> 3912 (O55:K59); <i>S. aureus</i> 209-P; <i>P. vulgaris</i> HX 19222	10 ед.	47–49 ч (37±1) °C	

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Дифференциально-диагностические селективные среды для выделения микроорганизмов</i>							
Основа питательной среды для выделения уреплазм, сухая (сульфат-марганцевый агар)	Плотная	Для выделения уреплазм из патологического материала после добавления нормальной лошадиной сыворотки, пеницилина и амфотерицина В, мочевины	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	U. urealyticum (YIII)	10 ⁻³	47–49 ч (37±1) °С в атмосфере углекислого газа (5-10 %)	Рост в виде типичных изолированных колоний
			Дифференцирующие свойства	U. urealyticum (YIII)	10 ⁻³	(37±1) °С в атмосфере углекислого газа (5–10 %) 47–49 ч	Колонии U. urealyticum коричневые, под микроскопом напоминают яичницу-глазунью.
				M. hominis Н 31	10 ⁻³	166–170 ч	Колонии M. hominis бесцветные, под микроскопом напоминают яичницу-глазунью

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА	
1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Селективные среды для идентификации микроорганизмов</i>								
Питательная среда для родовой идентификации энтеробактерии, сухая (цитратный агар Симмонса)	Плотная	Для родовой идентификации энтеробактерий по способности утилизировать цитрат	Дифференцирующие свойства	S. paratyphi B 506; C. freundii 34/57; E. aerogenes CCM 2531; K. pneumoniae 5055; P. mirabilis 3177	1 бак. петля из (1 петля + 1 мл физ. р-ра)	48 ч (37±1) °С	Густой рост микроорганизмов, способных утилизировать цитрат в качестве единственного источника углерода, сопровождается изменением цвета среды с зеленого на синий	
				P. alcalifaciens 1035-49;				72 ч (37±1) °С
				H. alvei 1				120 ч (21±1) °С
			Ингибирующие свойства	P. morganii 417	120 ч (37±1) °С	Отсутствие роста микроорганизмов, не способных утилизировать цитрат в качестве единственного источника углерода, цвет среды не изменяется		

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Селективные среды для идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для идентификации энтеробактерий, сухая (ацетатный агар)	Плотная	Для идентификации энтеробактерий по их способности утилизировать ацетат натрия	Дифференцирующие свойства	E. coli 3912/41 (O55:K59); K. pneumoniae K 2 NCTC 5055;	1 бак. петля из (1 петля + 1 мл физ. р-ра)	48 ч (37±1) °С	Рост микроорганизмов, способных утилизировать ацетат, сопровождается изменением цвета среды с зеленого на синий
				E. coli Ewing «O124:K72» 227			
			Ингибирующие свойства	S. sonnei «S-form»			
Основа питательной среды для индикации Ureplasma urealyticum, сухая	Жидкая	Для индикации U. urealyticum в клиническом материале после добавления к основе питательной среды сыворотки крупного рогатого скота, мочевины, амфотерицина В и пенициллина	Дифференцирующие свойства	U. urealyticum (YIII)	10 ⁻³	46–50 ч (37±1) °С	Диффузный рост в пробирках с изменением цвета среды от зеленого (исходный) до красно-фиолетового

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда с эозинметиленовым синим, сухая (среда Левина)	Плотная	Для выделения энтеробактерий из исследуемого материала и их дифференциации по признаку ферментации лактозы. На среде можно выделить коагулазоположительные стафилококки	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	S. flexneri 1a 8516; E. coli 168/59 (O111:K58);	$10^{-6}, 10^{-7}$	18–20 ч (37±1) °С	Рост в виде изолированных и единичных колоний. S. flexneri 1a 8516 в виде бесцветных, E. coli 168/59 (O111:K58) в виде фиолетовых колоний. S.aureus 209-P образует бесцветные или светло-сиреневые колонии
				S. aureus 209-P	10^{-5}	48 ч (37±1) °С	
			Дифференцирующие свойства	Смесь (1:1) S. flexneri 1a 8516 и E. coli 168/59 (O111:K58)	10^{-6}	18-20 ч (37±1) °С	Четкая дифференциация. Лактозоотрицательные образуют прозрачные или полупрозрачные бесцветные колонии (могут образовывать колонии бледно-розового цвета). Лактозоположительные энтеробактерии - не прозрачные от светло-сиреневого до фиолетового цвета с металлическим блеском или без него

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для первичной идентификации энтеробактерий, сухая (среда Ресселя)	Плотная	Для первичной идентификации энтеробактерий по признаку ферментации лактозы и глюкозы	Дифференцирующие свойства	S. flexneri 1a 8516; S. paratyphi A 225; E. coli 339 (O55:K59); A. faecalis 415	1 бак. петля из 10 ед.	18-20 ч (37±1) °С	При росте микроорганизмов ферментирующих лактозу наблюдается пожелтение скошенной части агара, глюкозы – пожелтение столбика среды. Газообразование сопровождается образованием пузырьков, разрывов, отслоением от стенок. Рост микроорганизмов, не ферментирующих лактозу и глюкозу, сопровождается посинением среды, либо сохраняется исходный зеленый цвет. S. flexneri – пожелтение столбика и посинение скошенной части; S. paratyphi – пожелтение столбика с образованием газа и посинение скошенной части; E. coli – пожелтение всей среды с газообразованием; A. faecalis – посинение всей среды или только скошенной части

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для первичной идентификации энтеробактерий, сухая (агар Клиггера)	Плотная	Для идентификации энтеробактерий по их способности ферментировать лактозу, глюкозу, образовывать газ и сероводород	Дифференцирующие свойства	S. typhibismuth; S. paratyphi B № 8006; S. sonnei «S-form»; E. coli (O55:K59) 3912/41; P. inconstans 1068-50; P. mirabilis Сиднеев; P. aeruginosa 613-60	1 бак. петля	48 ч (37±1) °С	При росте микроорганизмов, ферментирующих лактозу, наблюдается пожелтение скошенной части агара, глюкозы - пожелтение столбика среды. Газообразование сопровождается образованием пузырьков, разрывов, отслоением от стенок. Образование H ₂ S сопровождается почернением среды в столбике, а при слабом образовании – почернением на грани столбика и «косяка» или, реже, на дне пробирки. Рост микроорганизмов, не ферментирующих лактозу и глюкозу, не влияет на исходный (красный) цвет среды. Лактоза, глюкоза, газ, H ₂ S: S. typhibismuth: - + - + слабо; S. paratyphi: - + (маскируется) + +; S. sonnei: - + - -; E. coli: + + + -; P. inconst.: - + +слабо -; P. mirabilis: - + (маскируется) + +; P. aeruginosa: - - - -

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для идентификации энтеробактерий, сухая (цитратный агар Кристенсена)	Плотная	Для идентификации энтеробактерий по их способности утилизировать цитрат натрия в присутствии органического азота	Дифференцирующие свойства	S. sonnei «S-form»;	1 бак. петля	72 ч (37±1) °C	Рост микроорганизмов, утилизирующих цитрат (E. coli и P. alcalifaciens), сопровождается изменением цвета среды с желтого на розово-красный. При росте микроорганизмов, не утилизирующих цитрат (S. sonnei), цвет среды не изменяется
				E. coli Ewing 0124 K72 227;		72 ч (37±1) °C	
				P. alcalifaciens 1068-50		24 ч (37±1) °C	

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для идентификации энтеробактерий, сухая (железо-глюкозо-лактозный агар, двухслойный)	Плотная	Для первичной идентификации энтеробактерий по их способности ферментировать глюкозу и лактозу, образовывать сероводород и расщеплять мочевины (мочевину добавляют к среде ex tempore)	Дифференцирующие свойства	<p><i>S. flexneri</i> 1a 8516;</p> <p><i>E. coli</i> (O55:K59) 3912/41;</p> <p><i>P. vulgaris</i> HX19222;</p> <p><i>C. freundii</i> 58/57;</p> <p><i>S. typhi</i> H-901 ГДР/ТИСК</p>	1 бак. петля	20–24 ч (37±1)°C	<p>При росте микроорганизмов, ферментирующих глюкозу, наблюдается пожелтение столбика среды (для некоторых культур, например шигелл и некоторых сальмонелл, возможно пожелтение «по уколу» или оранжевое окрашивание столбика).</p> <p>Газообразование сопровождается разрывами (появлением пузырьков) в столбике среды. В случае ферментации лактозы происходит пожелтение скошенной части среды. В случае образования сероводорода наблюдается почернение верхней части столбика. Расщепление мочевины (при добавлении ее ex tempore) сопровождается изменением в малиновый цвет всей среды или только скошенной ее части. При этом может наблюдаться маскировка ферментации глюкозы и лактозы. Глюкоза, лактоза, H₂S, мочевины: <i>S. flexneri</i>: + - -; <i>E. coli</i>: + газ + - -; <i>P. vulgaris</i>: + (маскируется) + (маскируется) ++; <i>C. freundii</i>: + (газ) ++ -; <i>S. typhi</i>: + - + -</p>

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА																																										
1	2	3	4	5	6	7	8																																										
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>																																																	
Питательная среда для родовой идентификации энтеробактерий, сухая (фенилаланин агар)	Плотная	Для родовой идентификации энтеробактерий по способности дезаминировать фенилаланин	Дифференцирующие свойства	<i>P. vulgaris</i> НХ 19222; <i>E. coli</i> (O55:K59) 3912/41	1 бак. петля	20–24 ч (37±1)°С	Внесение 2–3 капель 10 % FeCl ₃ на выросшую культуру микроорганизмов, дезаминирующих фенилаланин (<i>P. vulgaris</i>), изменяет цвет среды с желтого на зеленый, не дезаминирующих (<i>E. coli</i>) – не изменяет цвет среды																																										
Питательная среда для идентификации энтеробактерий, сухая (среда Гисса) с: а/лактозой; б/глюкозой; в/сахарозой; г/мальтозой; д/маннитом	Плотная	Для идентификации энтеробактерий по тесту ферментации одного из углеводов (лактозы, глюкозы, сахарозы, мальтозы) или многоатомного спирта маннита	Дифференцирующие свойства	<i>S. flexneri</i> 1a 8516; <i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59); <i>S. dysenteriae</i> 1362; <i>P. vulgaris</i> НХ19222; <i>K. pneumoniae</i> 3534/51; <i>S. typhi</i> 65; <i>S. aureus</i> «Виотко»	1 бак. петля из 10 ед.	18–20 ч (37±1)°С	При росте микроорганизмов, ферментирующих углеводов, наблюдается изменение цвета среды с розового на синий или голубой. Газообразование сопровождается появлением пузырьков в столбике среды или на ее поверхности. Рост микроорганизмов, не ферментирующих углеводов, не изменяет цвет среды. <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th></th> <th>глю</th> <th>лакт</th> <th>сах</th> <th>ман</th> <th>ман.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>S. flexneri</i></td> <td>К</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>К</td> <td>К</td> </tr> <tr> <td><i>E. coli</i></td> <td>КГ</td> <td>КГ</td> <td>-</td> <td>КГ</td> <td>КГ</td> </tr> <tr> <td><i>S. dysent</i></td> <td>К</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>К_{слаб}</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>P. vulgaris</i></td> <td>КГ</td> <td>-</td> <td>КГ</td> <td>КГ</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>K. pneum</i></td> <td>КГ</td> <td>КГ</td> <td>КГ</td> <td>КГ</td> <td>КГ</td> </tr> <tr> <td><i>S. typhi</i></td> <td>К</td> <td>К</td> <td>К</td> <td>К</td> <td>К</td> </tr> </tbody> </table>		глю	лакт	сах	ман	ман.	<i>S. flexneri</i>	К	-	-	К	К	<i>E. coli</i>	КГ	КГ	-	КГ	КГ	<i>S. dysent</i>	К	-	-	К _{слаб}	-	<i>P. vulgaris</i>	КГ	-	КГ	КГ	-	<i>K. pneum</i>	КГ	КГ	КГ	КГ	КГ	<i>S. typhi</i>	К	К	К	К	К
	глю	лакт	сах	ман	ман.																																												
<i>S. flexneri</i>	К	-	-	К	К																																												
<i>E. coli</i>	КГ	КГ	-	КГ	КГ																																												
<i>S. dysent</i>	К	-	-	К _{слаб}	-																																												
<i>P. vulgaris</i>	КГ	-	КГ	КГ	-																																												
<i>K. pneum</i>	КГ	КГ	КГ	КГ	КГ																																												
<i>S. typhi</i>	К	К	К	К	К																																												

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА												
1	2	3	4	5	6	7	8												
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>																			
Питательная среда для родовой идентификации энтеробактерий, сухая (малонат агар)	Плотная	Для родовой идентификации энтеробактерий по тесту утилизации малоната натрия	Дифференцирующие свойства	E. aerogenes 3/43; K. pneumoniae 204; E. coli 3912/41 (O55:K59); P. inconstans 1035-49	1 бак. петля	18–20 ч (37±1) °C	Рост микроорганизмов, утилизирующих малонат натрия (E. aerogenes и K. pneumoniae), сопровождается изменением цвета среды с зеленого на синий. Рост микроорганизмов, не утилизирующих малонат натрия (E. coli и P. inconstans), не изменяет цвет среды												
Питательная среда для родовой идентификации энтеробактерий, сухая (глюкозо-фосфатный бульон)	Жидкая	Для родовой идентификации энтеробактерий по тесту с метиловым красными в реакции Фогеса-Проскауэра	Дифференцирующие свойства	E. coli 675; E. aerogenes 2531;	1 бак. петля	20–24 ч (37±1) °C	Рост микроорганизмов в виде диффузного помутнения. Проявление признака в последующем тесте с метиловым красным и реакции Фогеса-Проскауэра сопровождается изменением цвета среды из желтого в красный. Отсутствие признака в данных тестах не сопровождается изменением цвета среды												
				H. alvei 1		20–24 ч (22±1) °C													
							<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>МЕТИЛОВЫЙ КРАСНЫЙ</th> <th>ФОГЕСА-ПРОСКАУЭРА</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E. coli</td> <td>+</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>E.aerogenes</td> <td>-</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>H.alvei 1</td> <td>-</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>		МЕТИЛОВЫЙ КРАСНЫЙ	ФОГЕСА-ПРОСКАУЭРА	E. coli	+	-	E.aerogenes	-	+	H.alvei 1	-	+
	МЕТИЛОВЫЙ КРАСНЫЙ	ФОГЕСА-ПРОСКАУЭРА																	
E. coli	+	-																	
E.aerogenes	-	+																	
H.alvei 1	-	+																	

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для определения чувствительности микробов к антибиотика, сухая (среда АГВ)	Плотная	Для определения чувствительности микробов к антибиотикам	Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам	E. coli ATCC 25922; S. aureus ATCC 25923; P. aeruginosa ATCC 27853	10^{-1}	18–20 ч (37±1) °С	Рост в виде газона с четкими зонами угнетения роста антибиотиками (амикацин, бензилпенициллин, ванкомицин, стрептомицин, гентамицин, тетрациклин, эритромицин, левомицетин, полимиксин-М) соответствующего диаметра
Пит. среда для определения чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам, сухая (Мюллера-Хинтон агар)	Плотная	Для определения чувствительности микроорганизмов к противомикробным лекарственным средствам	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	E. coli ATCC 25922, S. aureus ATCC 25923 P. aeruginosa ATCC 27853 E. faecalis ATCC 29212			Рост в виде изолированных колоний

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к противомикробным лекарственным средствам, сухая (Мюллера-Хинтон агар)	Плотная	Для определения чувствительности микроорганизмов к противомикробным лекарственным средствам	Показатель чувствительности микроорганизмов к противомикробным лекарственным средствам	E. coli ATCC 25922, S. aureus ATCC 25923 P. aeruginosa ATCC 27853 E. faecalis ATCC 29212	10 ⁻¹	18–20 ч (37±1) °С	Рост в виде газона с четкими зонами угнетения роста противомикробными лекарственными средствами (бензилпенициллин, карбенициллин, стрептомицин, доксициклин, гентамицин, левомицетин, спарфлоксацин, цефуроксим, ципрофлоксацин, эритромицин) соответствующего диаметра
			Двухвалентные катионы (Ca ²⁺ Mg ²⁺)	P. aeruginosa ATCC 27853			Рост в виде газона с черной зоной (16–21 мм) угнетения роста гентамицином (МПК 0,5–2,0 мкг)
			Тимин и тимидин	E. coli ATCC 25922, S. aureus ATCC 25923			Рост в виде газона с четкой зоной (> 20 мм) угнетения роста сульфометаксазолом (диск 300 мкг)

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для идентификации синегнойной палочки, сухая	Плотная	Для идентификации по признаку пигментообразования вида <i>P. aeruginosa</i>	Стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	<i>P. aeruginosa</i> 165; <i>P. aeruginosa</i> 5/Перкадзе; <i>P. aeruginosa</i> 68; <i>P. aeruginosa</i> 140; <i>P. aeruginosa</i> 615	1 бак. петля из суспенз. (2 петли в 2 мл физ. р-ра)	23-25 ч (37±1) °С	Рост тест-штаммов сопровождается образованием пигмента (пиоцианина) с окрашиванием среды в зеленый или сине-зеленый цвет
Питательная среда для выделения и культивирования коклюшного микроба, сухая (КУА)	Плотная	Для выделения коклюшного микроба из инфицированного материала и культивирования штаммов	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	<i>B. pertussis</i> № 649; 79; 39; 703; 688; 796; 143	10 ⁻⁶ и 10 ⁻⁶ , разведенное в 4 раза	70-72 ч (37±1) °С	Рост тест-штаммов в виде изолированных мелких выпуклых, гладких, круглых с розовыми краями, блестящих («жемчужины») колоний

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для идентификации грибов вида <i>Candida albicans</i> , сухая (хламидоспор-агар)	Плотная	Для идентификации грибов вида <i>Candida albicans</i> по тесту хламидоспорообразования	Стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	<i>C. albicans</i> 610/1563; <i>C. albicans</i> 615/1708; <i>C. tropicalis</i> 151/1-017-ATCC-7347	1 бак. петля из суспенз. (2 бак. петли в 0,2 мл физ. р-ра)	23–25 ч (27±1) °С	У <i>C. albicans</i> образование хламидоспор и отсутствие хламидоспор у <i>C. tropicalis</i> . Учет производится при микроскопировании посевов в проходящем свете при увеличении (×100 – ×200). На питательной среде по краям полосок посева выявляются специфические морфологические образования – хламидоспоры, которые четко дифференцируются от дрожжевых клеток правильно-округлой формой, двухконтурной оболочкой, зернистостью в центре, расположением чаще на конце нити псевдомицелия

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для выделения стрептококков сухая*	Жидкая	Для выделения стрептококков из крови и другого инфицированного материала	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	S. pyogenes гр «А» № 682	10 ⁻⁶	24–48 ч (37±1) °С	Стрептококки серогруппы «А» дают рост в виде взвешенных частиц, придонного или придонно-пристеночного осадка с сохранением прозрачности самой среды; стрептококки группы «В» дают рост в виде придонного осадка с диффузным помутнением среды; стрептококки группы «Д» дают рост в виде вязкого слизистого осадка и диффузного помутнения среды
				S. agalactiae гр «В» О-90R			

Примечание: *для приготовления селективного варианта к готовой среде необходимо добавить *ex tempore* генцианвиолет

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для идентификации коринебактерий по тесту расщепления цистина, сухая	Плотная	Для идентификации коринебактерий по тесту расщепления цистина ферментом цистиназой	Стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	<i>C. diphtheriae mitis nontoxigenic</i> 203 АГ; <i>C. diphtheriae gravis</i> 75; <i>C. xerosis</i> 1911; <i>C. pseudodiphtheriticum</i> «Соколов»	1 бак. петля	18–20 ч (37±1)°С	Почернение среды по ходу укола и образование облачка коричневого цвета в глубине столбика среды указывает на наличие фермента цистиназы (положительная реакция) (<i>C. diphtheriae mitis nontoxigenic</i> и <i>C. diphtheriae gravis</i>). При отрицательной реакции цвет среды не меняется (<i>C. xerosis</i> и <i>C. pseudodiphtheriticum</i>)
Питательная среда для выделения, дифференциации и количественного определения бактерий в моче электролитдефицитная, сухая (ЭДПА)	Плотная	Для выделения и дифференциации микроорганизмов по признаку ферментации лактозы, определения степени бактериурии при исследовании мочи	Чувствительность среды и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	<i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59); <i>S. typhimurium</i> 79; <i>P. mirabilis</i> F-392; <i>P. vulgaris</i> НХ19	10 ⁻⁶	17–21 ч (37±1)°С	Рост в виде изолированных колоний. Колонии <i>E. coli</i> и <i>E. faecalis</i> желтые, <i>P. mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i> прозрачные, голубые в О-форме без «роения», допускаются отдельные колонии в Н-форме («роение»)
				<i>E. faecalis</i> 775	10 ⁻⁵		Четкая дифференциация. Лактозоположительные микроорганизмы образуют колонии желтого цвета, лактозоотрицательные – прозрачные, голубые
			Дифференцирующие свойства	Смесь (1:1) <i>E. coli</i> 3912/41 и <i>P. mirabilis</i> F-392	10 ⁻⁶		

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Пита- тельная среда для контроля стериль- ности, сухая (тиогли- колевая среда)	Полу- жидкая	Для контроля сте- рильности меди- цинских иммуно- биологических препаратов (МИБП) с целью выявления воз- можной их кон- таминации аэро- ными и анаэробными бак- териями и грибами	Чувствительность среды и стабиль- ность основных био- логических свойств микроорганизмов	A. faecalis 415	$10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$	24–48 ч (34–35) °С	Рост S. novyi 198 в виде отдельных шаро- образных колоний че- рез 24 ч и диффузного помутнения с выра- женной прозрачной зоной в верхней части столбика через 48 ч, не менее чем в 2-х пробирках из разведе- ний $10^{-4}, 10^{-5}$. Рост A. faecalis 415 в виде помутнения верхней части столбика среды, менее чем в 2-х про- бирках из разведений $10^{-7}, 10^{-8}$
			Нейтрализующие свойства (при пред- варительном внесе- нии в каждую про- бирку по 0,5 мл 0,01 %-го р-ра мер- тиолята)	A. faecalis 415	$10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$		

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные среды для предварительной идентификации микроорганизмов</i>							
Питательная среда для определения токсигенности дифтерийных микробов, сухая (среда ОТДМ, Коринетоксагар)	Плотная	Для определения токсигенности дифтерийных микробов методом диффузной преципитации в студне среды	Стабильность основных биологических свойств микроорганизмов	C. diphtheriae gravis 75; C. diphtheriae mitis Сеньков; C. diphtheriae intermedius 619; C. diphtheriae gravis nontoxigenis 4895; C. diphtheriae mitis nontoxigenic 3689; C. diphtheriae intermedius nontoxigenic 7227	1 бак. петля	22–24 ч (37±1) °С	Рост всех штаммов и образование линий преципитации токсигенными штаммами

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА	
1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Селективные накопительные среды</i>								
Питательная среда для накопления сальмонелл, сухая (селенитовая среда Лейфсона)	Жидкая	Для накопления сальмонелл при исследовании различного материала (испражнения, моча и др.)	Показатель эффективности	S. paratyphi B 506	10 ⁻⁶	6 ч (37±1) °С	Не менее чем в 5 раз	Учет производят по количеству колоний, выросших на чашках со средой Эндо
			Показатель ингибиции	Смесь (1:1) E. coli 3912/41 (O55:K59) + S. paratyphi B 506	10 ⁻⁵		Не менее чем в 1,5 раза	
Питательный бульон для селективного накопления сальмонелл, сухой (МА-бульон)	Жидкая	Для селективного накопления сальмонелл из различного инфицированного материала с последующим высевом на дифференциально-диагностические среды	Показатель эффективности	S. paratyphi B 506	10 ⁻⁶	20–24 ч (37±1) °С	Не менее чем в 10000 раз	Учет производят по количеству колоний, выросших на чашках со средой Эндо
			Показатель ингибиции	Смесь (1:1) E. coli 3912/41 (O55:K59) + S. paratyphi B 506	10 ⁻⁵		Не менее чем в 100 раз	

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Транспортные среды</i>							
Транспортная среда для различных микроорганизмов, полужидкая, готовая к применению (среда типа Эймса)	Полужидкая	Транспортирование исследуемого биоматериала от момента его забора до посева при сохранении жизнеспособности и отсутствии размножения различных микроорганизмов, включая стрептококки, стафилококки, эшерихии, гемофильные бактерии, дрожжеподобные грибы	Показатели жизнеспособности и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов при задержке роста	S. aureus 25923 E. coli 25922 H. influenzae 49247 S. pneumoniae 49619	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶	24 ч 18–25 °С	Отсутствие размножения. Число колоний после 24 ч хранения не различается более чем на порядок. Типичный рост микроорганизмов при высеве на питательные агары
				C. albicans 24433	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵		
Питательная среда для кампилобактерий транспортная, сухая	Плотная	Для хранения и транспортирования исследуемого материала при диагностике кампилобактериоза	Показатели жизнеспособности при задержке роста и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов	C. jejuni CTC 11168 C. coli III24	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶	70–74 ч 2–8 °С	Типичный рост на кровяном эритроцит агаре. Число колоний через 74 ч инкубации ниже на один порядок

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные основы и добавки</i>							
Гидролизат казеина неглубокой степени расщепления ферментативный, сухой. Экстракт кормовых дрожжей для микробиологических питательных сред, сухой ЭКД)	-	Использование при изготовлении микробиологических питательных сред. Гидролизат казеина в качестве белковой основы. ЭКД в качестве ростового фактора (водорастворимые витамины группы В, свободные аминокислоты)	В составе тиогликолевой среды должен обеспечивать качество этой среды в отношении тест-штамма Clostridium novyi198	См. «Питательная среда для контроля стерильности, сухая (тиогликолевая среда)»			
Гидролизат казеина средней степени расщепления кислотный, сухой	-	Использование в качестве белковой основы при изготовлении питательных сред, применяемых для культивирования анаэробов с целью получения токсинов	-	-	-	-	-

СРЕДЫ И ДОБАВКИ	ТИП*	НАЗНАЧЕНИЕ	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	ТЕСТ-ШТАММЫ	РАЗВЕДЕНИЕ	ИНКУБАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ РОСТА
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Неселективные основы и добавки</i>							
Основа бактериологических питательных сред, сухая (гидролизат мяса ферментативный - ГМФ), пептон для бактериологических питательных сред, сухой	-	В качестве питательной основы (по аналогии с пептоном) для приготовления бактериологических питательных сред при выделении, культивировании и идентификации различных микроорганизмов	Препарат в количестве 15,0 г/л (ГМФ) и 10,0 г/л (пептон) в составе мясо-пептонного бульона и мясо-пептонного агара должен обеспечивать их качество	См. «Питательный бульон для культивирования микроорганизмов (мясо-пептонный бульон)» и «Питательный агар для культивирования микроорганизмов (мясо-пептонный агар)»			
Кровь баранья дефибринированная для питательных сред, стерильная	Жидкая	Для обогащения бактериологических питательных сред и определения гемолитической активности микроорганизмов	Препарат в количестве 5 % в составе СПА должен обеспечивать типичный рост тест-штаммов	S. aureus Wood-46	10 ⁻⁶	22–24 ч (37±1) °C	Типичный рост
				S. aureus № 5 S. pyogenes Dick-1 E. faecalis 7/62			
				S. pneumoniae м ³ № 3	10 ⁻⁵	40–48 ч (37±1) °C	

Тест-микрорганизмы и условия инкубации для определения ростовых и селективных свойств питательных сред

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ	ПРИМЕНЕНИЕ	ТЕСТ-ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ	УСЛОВИЯ ИНКУБАЦИИ
1	2	3	4
-Соево-казеиновый агар -Среда № 1 для выращивания бактерий	Выделение аэробных микроорганизмов	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 или <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702; <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 или ATCC 25922; <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	72 ч (32,5±2,5) °C
-Бульон Сабуро	Выделение дрожжевых грибов	<i>Candida albicans</i> РКПГУ/НСТС 885-653 или ATCC 10231	5 сут (22,5±2,5) °C
-Агар Сабуро с глюкозой -Среда № 2 для выращивания грибов	Выделение дрожжевых и плесневых грибов	<i>Candida albicans</i> РКПГУ/НСТС 885-653 или ATCC 10231; <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642, ATCC 16404 ВКМФ1119 или <i>A. niger</i> РКПГФ106	5 сут (22,5±2,5) °C
-Бульон Мосселя -Бульон Мак-Конки -Среда № 3	Обогащение энтеробактерий	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 или ATCC 25922; <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>abony</i> IHE 103/39 или НСТС 6017 <u>Штаммы-ассоцианты:</u> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	24–48 ч (32,5±2,5) °C
-Агар Мак-Конки -Агар Мосселя -Среда № 4 для выделения энтеробактерий	Выделение энтеробактерий	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 или ATCC 25922; <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>abony</i> IHE 103/39 или НСТС 6017 <u>Штаммы-ассоцианты для определения селективных свойств:</u> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	24–48 ч (32,5±2,5) °C

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ	ПРИМЕНЕНИЕ	ТЕСТ-ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ	УСЛОВИЯ ИНКУБАЦИИ
1	2	3	4
-Ксилоза-лизин-дезоксихолат агар -Висмут-сульфитный агар -Среда № 5 для идентификации бактерий рода <i>Salmonella</i>	Выделение бактерий рода <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enterica ssp. enterica serovar abony</i> IHE 103/39 или NCTC 6017 <u>Штаммы-ассоцианты для определения селективных свойств:</u> <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 или ATCC 25922; <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 или <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702	24–48 ч (32,5±2,5) °С
-Соево-казеиновый бульон -Среда № 8 для выращивания бактерий	Накопление аэробных бактерий	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702 или <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633; <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 или ATCC 25922; <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	24 ч (32,5±2,5) °С
-Агар для выявления пиоцианина <i>P. aeruginosa</i> -Среда № 9 для идентификации <i>P. aeruginosa</i>	Выделение <i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	24–48 ч (32,5±2,5) °С
-Цетримидный агар -ЦПХ-агар для выделения <i>P. aeruginosa</i>	Идентификация <i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <u>Штаммы-ассоцианты для определения селективных свойств:</u> <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 или ATCC 25922; <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	24–48 ч (32,5±2,5) °С

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ	ПРИМЕНЕНИЕ	ТЕСТ–ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ	УСЛОВИЯ ИНКУБАЦИИ
1	2	3	4
-Маннитно-солевой агар -Среда № 10 для идентификации <i>S. aureus</i>	Идентификация <i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 или ATCC 1228 <u>Штамм-ассоциант для определения селективных свойств:</u> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	48 ч (32,5±2,5) °C
-Бульон Раппопорта-Вассилиадиса	Обогащение бактерий рода <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>abony</i> IHE 103/39 или NCTC 6017	24 ч (42,5±2,5) °C
-Трехсахарный агар с солями железа -Среда № 13 для идентификации бактерий рода <i>Salmonella</i>	Идентификация бактерий рода <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>abony</i> IHE 103/39 или NCTC 6017; <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 или ATCC 25922	24 ч (32,5±2,5) °C
-Цитратный агар Симмонса -Среда № 14 для идентификации <i>E. coli</i>	Идентификация <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 или ATCC 25922; <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>abony</i> IHE 103/39 или NCTC 6017	24 ч (32,5±2,5) °C

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/gost-r-52249-2009>
2. ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств Good Manufacturing Practice for medicinal products (GMP) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.consultpharma.ru/index.php/ru/documents/proizvodstvo/710-gostr-52249-2009-part1>
3. ГОСТ ИСО 14644-1-2002 Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://ohranatruda.ru/ot_biblio/normativ/data_normativ/40/40425/
4. СП 1.3.1285-2003 Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ld.ru/w/biometra/1.3.1285-03.pdf>
5. ОФС.1.2.4.0002.15 Государственной Фармакопеи [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/420324576>
6. ОФС.1.2.4.0003.15 Государственной Фармакопеи [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0003-15-sterilnost>
7. Вода очищенная и вода для инъекций: требования фармстатей. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://water-filter-spb.ru/s16-trebovaniya-farmstati-fs-k-vode-ochishhennoj-i-vode-dlya-inekciy.htm>
8. ОФС. 1.7.4.0004.15 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/en/ofs-1-7-1-0004-15-vaktsiny-i-anatoksiny/>
9. ОФС. 1.2.4.0005.15 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0005-15-pirogenost/>
10. Иммунобиологические препараты для профилактики, лечения и диагностики инфекционных заболеваний [Электронный ресурс]: учебное пособие / ред. Е.П. Красноженов, Т.Л. Мирютова. – Томск: Печатная мануфактура, 2007. – 292 с.: Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>

Учебное издание

Авторы:

Карпова Мария Ростиславовна
Муштоватова Людмила Степановна
Бочкарева Ольга Петровна
Попова Елена Владиславовна
Зверева Ирина Феликсовна
Грицута Александра Валерьевна

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Учебное пособие

Редактор А.Ю. Коломийцев
Технический редактор О.В. Коломийцева
Обложка Л.Д. Кривцова

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8(3822) 51-41-53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 10.10.2017 г.
Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.
Печать ризограф. Гарнитура «Times». Печ. л. 16,5; авт. л. 9,9
Тираж 150 экз. Заказ №

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru