

ЛЕКЦИЯ 9

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств



Уровень микробной чистоты – один из основных показателей качества фармацевтической продукции.

По этому показателю все препараты делят на:

- **Стерильные** – препараты, в которых не допускается содержание жизнеспособных клеток микроорганизмов (~ 20 % от общего количества ЛС);
- **Нестерильные** – препараты, в которых допускается содержание живых микроорганизмов, требования к количеству и качественному составу которых зависят от лекарственной формы и способа введения препарата и нормируется соответствующей документацией (ГФ РБ, ФСП РБ) (~ 80 % от общего количества ЛС).



Важность микробиологического контроля в фармацевтическом производстве обусловлена последствиями присутствия микроорганизмов как в стерильных, так и в нестерильных ЛС, создающими опасность для здоровья и жизни человека.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Роль микроорганизмов-контаминантов ЛС в патологии человека:

- Могут приводить к серьезным инфекционным заболеваниям или к отравлению организма вследствие образования токсинов;
- Могут приводить к биодеградации ЛС, в частности действующих веществ (АФИ), - в результате происходит снижение либо отсутствие терапевтического действия препарата;
- Способствуют появлению и распространению лекарственной устойчивости – способности сохранять жизнедеятельность несмотря на контакт с химиопрепаратами.

Природа заболеваний, вызываемых микроорганизмами-контаминантами ЛС:

- Неинфекционные: обусловленные продуктами биодеградации АФИ
- Инфекционные: вызываемые проникновением в организм патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.
 - *Токсикозы* - заболевания, вызываемые энтерально действующими экзотоксинами микроорганизмов (*S. aureus*, *C. botulinum*.)
 - *Токсикоинфекции* — заболевания, вызываемые эндотоксинами микроорганизмов (*B. cereus*, род *Klebsiella*).

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Возникновение, развитие и исход заболевания зависят:

- от уровня микробной контаминации;
- вирулентности микроорганизма-контаминанта;
- резистентности человека;
- способа введения препарата.

Для стерильных ЛС наличие микроорганизмов даже в малом количестве может стать летальным, учитывая беспрепятственное попадание микроорганизмов в кровь или на слизистые оболочки, при условии ослабленного иммунитета человека.

При местном применении вероятность развития инфекционного процесса резко возрастает при обширных повреждениях тканей в результате травмы, ожога, хирургического вмешательства.

Например: *Staphylococcus aureus* при попадании с контаминированным ЛС

- на кожу или слизистые может вызывать гнойно-воспалительные процессы
- при ингаляционном введении – стафилококковую пневмонию
- при пероральном введении – токсико-инфекцию
- при попадании в кровяное русло – генерализованную инфекцию (сепсис).

Вывод: нормирование относительно стерильности и микробиологической чистоты ЛС, регламентированное требованиями фармакопеи, предназначено для защиты потребителей ЛС от возможных последствий их контаминации микроорганизмами.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Историческая справка

Оценка вероятности микробной контаминации нестерильных лекарственных средств во всем мире стала проводиться после фактического доказательства возможности инфицирования потребителей препаратами, загрязненными патогенными микроорганизмами.

- В 1966 г. в Швеции была зарегистрирована вспышка инфицирования сальмонеллезом, возникшая в результате использования загрязненного препарата. Пострадали более 200 человек.

- Установлено негативное деструктивное влияние продуктов жизнедеятельности бактерий и грибов на стабильность и эффективность лекарственных препаратов.

- ВОЗ принимает рекомендации по введению максимально допустимого уровня микробной контаминации нестерильных лекарственных средств.

- Конец 60-х годов 20-го века - нормы по микробиологической чистоте лекарственных средств начали устанавливаться в нормативных документах Великобритании, Европы и США.

- Для разработки условий проведения микробиологических исследований лекарственных средств были привлечены специалисты-микробиологи в области методологии испытаний в пищевой и санитарной микробиологии.

- Но определенные физико-химические и биологические свойства лекарственных средств требовали введения новейших подходов к определению их микробиоты.

- С 1968 г. постепенно вносились изменения, в том числе в методы и условия проведения микробиологических исследований по контролю качества лекарственных средств.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

• В странах бывшего Советского Союза контроль ЛС по микробиологическим показателям долгое время проходил по требованиям инструкций 70-х годов XX столетия, которые, в отличие от рекомендаций ВОЗ, включали другие подходы к методологии выявления микробиоты в ЛС, что не согласовывалось с требованиями ведущих фармакопей мира.

Тем не менее:

- По результатам анализов, выполненных в период с 1973 по 1975 гг. из 5000 препаратов 65% не удовлетворяло предъявляемым требованиям по уровню обсемененности, 12% - содержали патогенные микроорганизмы.

- В 1979г. только 30% проверенных препаратов не соответствовали требованиям и лишь 0,9% содержали патогенные микроорганизмы.

• 1989 г. - первые шаги в направлении создания микробиологического контроля ЛС, выход Государственной фармакопеи СССР XI издания (выпуск 2), которая впервые содержала требования к определению качества лекарственных средств по показателям «Стерильность» и «Микробиологическая чистота», которые соответствовали рекомендациям ВОЗ.

• 1996 г. - дополнения № 1 к ГФ XI, которое стало основным документом, на котором базировался микробиологический контроль фармацевтической продукции отечественных предприятий.

• За последние 30 лет в европейских странах и США неоднократно менялись требования, предъявляемые к нестерильным лекарственным средствам по показателю «Микробиологическая чистота». Результатом этой работы стали международные и национальные стандарты (Фармакопея США, Европейская фармакопея, Британская фармакопея, ГФ РБ, ГФУ, ГФ XII), четко регламентирующие требования к уровню содержания в фармацевтической продукции микроорганизмов и проведение исследований по определению микробиологической чистоты лекарственных средств.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств



Основные задачи микробиологического контроля нестерильной продукции:

1. Имеются ли в образце жизнеспособные микроорганизмы (бактерии, грибы)? (качественный анализ)
2. Если да, то в каком количестве? (количественный анализ)
3. Что именно? (идентификационный анализ).

Для ответа на поставленные вопросы используют только фармакопейные методы.

Микробиологические требования к нестерильной продукции:

- должна содержать ограниченное количество микроорганизмов;
- не должна содержать определенные виды микроорганизмов;
- допустимое количество и виды микроорганизмов зависят от лекарственной формы и пути введения препарата;



Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Критерии приемлемости для микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств.
(ГФ РБ т.1, изд-е 2 раздел 5.1.4.)

Способ применения ЛС	Общее количество аэробов (ОКА), КОЕ/г или КОЕ/мл	Общее количество грибов (ОКГ), КОЕ/г или КОЕ/мл	Специфические микроорганизмы (в 1г или 1мл)
Неводные ЛС для внутреннего применения	10^3	10^2	Отсутствие <i>Escherichia coli</i>
Водные лекарственные средства для внутреннего применения	10^2	10^1	Отсутствие <i>Escherichia coli</i>
Ректальный	10^3	10^2	-
Для кожного, назального, ушного использования	10^2	10^1	Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Для ингаляционного применения	10^2	10^1	Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Интерпретация критериев приемлемости:

- 10^1 КОЕ: максимально допустимое число = 20;
- 10^2 КОЕ: максимально допустимое число = 200;
- 10^3 КОЕ: максимально допустимое число = 2000.

Критерии выбора микроорганизмов, нормирование которых предусмотрено Фармакопеей:

- Опасность для здоровья населения;
- Способность служить критерием оценки гигиенического состояния производства, предусмотренного правилами GMP;
- В настоящее время признан достаточным для получения результатов, адекватно отражающих качество продукции по микробиологическим показателям;
- Со временем может быть расширен.

Критерии приемлемости для микробиологической чистоты нестерильных субстанций для фармацевтического использования

(ГФ РБ т.1, изд-е 2 раздел 5.1.4., EP)

Назначение	Общее количество аэробов (ОКА), КОЕ/г или КОЕ/мл	Общее количество грибов (ОКГ), КОЕ/г или КОЕ/мл
Субстанции для фармацевтического использования	10^3	10^2

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Критерии приемлемости для микробиологической чистоты нестерильных субстанций для фармацевтического использования

(ГФ РБ т.1, изд-е 2 раздел 5.1.4., национальные требования)

Назначение	Общее количество аэробов (ОКА), КОЕ/г или КОЕ/мл	Общее количество грибов (ОКГ), КОЕ/г или КОЕ/мл	Специфические микроорганизмы (в 1г или 1мл)
Нестерильные субстанции для производства стерильных ЛС, ЛС для местного и ингаляционного применения и	Суммарно не более 10^2		Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, либо бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i>
Нестерильные субстанции для производства нестерильных ЛС	10^3	10^2	Отсутствие <i>Escherichia coli</i>
Субстанции природного происхождения, для которых предварительная антимикробная обработка невозможна и для которых уполномоченный орган допускает микробное загрязнение исходного сырья более 10^3 в 1г или 1 мл	Суммарно не более 10^4		Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> (в 10 г или 10 мл), Не более 10^2 КОЕ грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, либо бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i>

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Методы определения микробиологической чистоты нестерильных ЛС

(ГФ РБ т.1, изд-е 2 раздел 2.6.12)

1. Метод высева на чашки Петри с питательной средой:

- метод глубинного посева
- метод поверхностного посева

2. Метод мембранной фильтрации

3. Метод наиболее вероятного числа (наименее точный метод, используется для продуктов с очень низкой бионагрузкой).

Принцип: методы основаны на посеве на/в питательные среды определенного количества образца препарата, инкубировании, подсчете выросших колоний и выявлении специфических микроорганизмов, интерпретации полученных результатов.

Питательные среды, используемые для определения микробиологической чистоты

Микроорганизмы	Питательная среда
Общее количество аэробов (ОКА)	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (# агаризованная среда №1)
Общее количество грибов (ОКГ)	Декстрозный агар Сабуро (# агаризованная среда №2)
<i>Escherichia coli</i>	Бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов, бульон Макконки, агар Макконки

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Возможность обнаружения микроорганизмов-контаминантов в испытании в присутствии испытуемого продукта (ЛС или АФИ или вспомогательное вещество) должна быть доказана.

1. Проверка пригодности питательных сред

А. Проверке подлежит каждая партия приготовленных питательных сред (~ 5% от количества в партии);

Б. Проверка стерильности: термостатируют образец каждой серии питательной среды после ее стерилизации в течении 5-ти суток при 30-35°C (если среда используется для выявления бактерий) и 20-25°C (если среда используется для выявления грибов).

По истечении заданного срока на (в) питательных средах должны отсутствовать визуально определяемые признаки роста микроорганизмов.

В. Проверка ростовых свойств:

- Ростовые качества питательных сред обеспечиваются двумя факторами:
 - наличием питательных веществ (пептиды, углеводы) и факторов роста, таких как аминокислоты, витамины, микроэлементы и пр.
 - отсутствием ингибиторов роста микроорганизмов, например, остатков протеолитических ферментов, примесей тяжелых металлов, антибиотических веществ, и т.д.;
- Контролем при определении ростовых качеств среды служит:
 - стандартная среда с гарантированными ростовыми свойствами, на котором правильно проявляется количественный и качественный рост микроорганизмов (морфология колоний);
 - в случае отсутствия стандартной среды для контроля ростовых свойств в качестве контроля используют некоторое количество среды из предыдущей партии.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

- Селективные и диагностические среды должны избирательно поддерживать рост определенного вида (видов) микроорганизмов, характерным образом его идентифицировать (например, цвет колонии, зона ферментации вокруг колонии) и подавлять другие виды.

Выявляемые специфические микроорганизмы	Среда	Свойство	Тест-штамм
Escherichia coli	Бульон Макконки	Ростовое	Escherichia coli
		Ингибирующее	Staphylococcus aureus
	Агар Макконки	Ростовое и индикаторное	Escherichia coli

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

- Используют эталонные тест-культуры микроорганизмов:
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Bacillus subtilis*
 - *Candida albicans*
 - *Aspergillus brasiliensis*
- Каждая партия питательной среды (жидкой и агаризованной) должна быть проверена отдельно для каждого организма:
 - Агаризованная среда и бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов или агаризованная среда №1 должны быть проверены с использованием всех бактериальных штаммов;
 - Декстрозный агар Сабуро или агаризованная среда №2 должны быть проверены с использованием *Candida albicans* и *Aspergillus brasiliensis*.
- Используют суспензии тест-штаммов, содержащие ~ 100 КОЕ/мл :
 - Каждый штамм выращивают отдельно в пробирках на соответствующей питательной среде (ГФ РБ таблица 2.6.12.-1 для ОКА и ОКГ, 2.6.13.-1 для специфических микроорганизмов). Тест-штаммы аэробных бактерий выращивают при 30-35 °С в течение 18-24 часов; тест-штаммы грибов выращивают при 20-25°С в течение 2 суток (*Candida albicans*), 5 суток (*Aspergillus brasiliensis*).
 - Готовят исходную суспензию каждого штамма смывом с поверхности агара буфером (ГФ РБ), для лучшего суспендирования грибных спор используют ПАВ – полисорбат 80 – в количестве 0,05%.
 - Оптическую плотность исходной суспензии сравнивают с оптической плотностью стандарта мутности 0,5 по МакФарланду (McFarland). Совпадение оптических плотностей означает, что исходная суспензия содержит ~ 10⁸ КОЕ/мл.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

- Из исходных суспензий готовят *рабочие суспензии* серий десятикратных разведений в том же растворителе до концентрации 100 КОЕ/мл. Приготовленные суспензии используют в течение 2 ч. или, при условии хранения при температуре 2-8 °С, в течение 24 ч.

- Чашки с агаризованными средами или емкости с жидкими средами инокулируют соответствующим микроорганизмом в количестве ~ 100 КОЕ (1 мл рабочей суспензии с концентрацией 100 КОЕ/мл). Инкубируют в подходящих условиях в течение требуемого для бактерий и грибов времени (ГФ РБ).

- Контроль: инокулированные среды из предыдущей партии.

- Отрицательный контроль: контролю подвергается растворитель, используемый для приготовления исходной и рабочей суспензий тест-микроорганизмов, путем высева на питательные среды. Не должно наблюдаться роста микроорганизмов.

- Учет и интерпретация результатов:

- ✓ Для агаризованных сред: подсчитывают число выросших колоний. Найденное значение не должно отличаться от значения, полученного для предыдущей партии



- ✓ Для жидких сред: должен обнаруживаться отчетливо заметный рост микроорганизмов в сравнении с ростом, который получен с использованием среды из предыдущей партии.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

- Для селективных питательных сред, используемых для выявления специфических микроорганизмов, подтверждают ростовые, ингибирующие рост и индикаторные свойства

Испытания на ингибирующие рост свойства питательных сред:

Питательную среду инокулируют ~ 100 КОЕ подходящего микроорганизма и инкубируют при определенной температуре в течение определенного периода времени

Результат: не должен наблюдаться рост микроорганизмов, для которых данная среда не является селективной.

Испытания на индикаторные свойства.

Выполняют методом поверхностного посева, инокулируя каждую чашку ~ 100 КОЕ соответствующего микроорганизма. Инкубируют при определенной температуре в течение периода времени, необходимого для выявления специфического микроорганизма.

Результат:

Выросшие колонии по индикаторным реакциям (цвету) должны соответствовать описанию в ГФ РБ и должны быть сравнимы с теми, которые наблюдаются на предыдущей партии партии среды.

Количество выросших колоний не должно отличаться от значения, полученного для предыдущей партии среды более чем в 2 раза.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

2. Проверка наличия/отсутствия антимикробного действия ЛС (АФИ, вспомогательного вещества).

1. Некоторые ЛС (АФИ, вспомогательные вещества) обладают выраженным антимикробным действием:

- Специфическое антимикробное действие: антибиотики, антисептики, производные фторхинолонов, сульфаниламиды и др. – т.е. вещества и препараты из них, предназначенные для лечения инфекционных заболеваний.

- Неспецифическое антимикробное действие: цитостатики, спирты, S-содержащие препараты, некоторые анальгетики и др. – т.е. вещества и препараты из них, непосредственно не предназначенные для лечения инфекционных процессов, но обладающие сопутствующим антимикробным действием.

2. Наличие антимикробного действия ЛС проверяется в тех же условиях, что и определение микробиологической чистоты, с использованием тест-культур, применяемых для проверки ростовых свойств питательных сред.

3. В основе метода определения антимикробного действия лежит сравнение интенсивности роста тест-микроорганизмов в присутствии и в отсутствие испытуемого продукта (АФИ, вспомогательного вещества, ЛС).

4. Приготовление испытуемого образца:

- водорастворимые продукты: растворяют или разводят (обычно в соотношении 1:10) в буфере или питательной среде (ГФ РБ).

- нерастворимые в воде продукты: суспендируют (обычно в соотношении 1:10) в буфере или питательной среде (ГФ РБ).

- жиры:

- продукт растворяют в небольшом количестве стерильного изопропилмиристата или смешивают с небольшим количеством ПАВ, нагретого до 40 - 45°C. При необходимости поддерживают температуру в водяной бане;

- добавляют предварительно подогретый до нужной температуры разбавитель до получения разведения продукта 1:10, перемешивают до образования эмульсии.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

5. Контроль – растворитель, используемый для приготовления образца ЛС (буфер или питательная среда – ГФ РБ).

6. Инокуляция образца и контроля, высев на питательные среды:

- Испытуемый образец и контроль инокулируют суспензией тест-микрорганзизма в количестве ~100 КОЕ.

- Объем суспензии микроорганизма не должен превышать 1% объема образца или контроля.

- Делают высев на чашки Петри глубинным или поверхностным способом, инкубируют. Для каждого микроорганизма используют не менее 2-х чашек.

7. Отрицательный контроль: контролю подвергается растворитель, используемый для приготовления исходной и рабочей суспензий тест-микрорганзизмов, путем высева на питательные среды. Не должно наблюдаться роста микроорганизмов.

8. Учет роста и интерпретация результатов:

- Подсчитывают количество выросших колоний бактерий и грибов в чашках с добавлением образца препарата и контроля, рассчитывают среднее арифметическое.

- Если среднее количество колоний в чашках с испытуемым образцом отличается от среднего количества колоний в чашках с контролем менее чем в 2 раза (процент восстановления – более 50%), то считается, что продукт не обладает антимикробным действием.

- В противном случае продукт обладает антимикробным действием, необходимо его устранить (нейтрализовать).

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

3. Нейтрализация (устранение) антимикробного действия:

- Разведения исходного образца.
- Добавление нейтрализующего агента (специфического или неспецифического) в растворитель.
- Комбинация двух методов.
- Мембранная фильтрация.

Разведение исходного образца

- используют тот же растворитель, что и для приготовления образца ЛС (буфер или питательную среду);
- разведение должно проводиться с учетом критериев приемлемости по содержанию микроорганизмов в продукте. Например: если содержание ОКА – 10^3 КОЕ/г, а ОКГ – 10^2 КОЕ/г, то последнее допустимое разведение образца для устранения антимикробного действия составит – 1:500 для бактерий и 1:50 для грибов (при посеве 1 мл образца с культурой глубинным способом);
- если желаемый результат достигается при минимальном разведении, используют это разведение:

- контроль, отрицательный контроль, проведение испытания и интерпретацию результатов - аналогично как при «Проверка наличия/отсутствия антимикробного действия ЛС».

Добавление нейтрализующего агента

- перечень возможных неспецифических нейтрализующих агентов: натрия гидросульфит, глицин, лецитин, полисорбат, тиогликолят, тиосульфат, ионы Mg, Ca;

- специфические инактиваторы: β -лактамаза (пенициллиназа) – для β -лактамных антибиотиков (пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов и монобактамов), парааминобензойная кислота – для сульфаниламидов и др.

- необходимо подтвердить эффективность и отсутствие токсичного действия нейтрализующих агентов на микроорганизмы в испытаниях без испытуемого продукта;

- проведение испытания, учет и интерпретация результатов – аналогично проверке наличия антимикробного действия

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Комбинация методов:

Метод разведения + применение нейтрализующих агентов

Мембранная фильтрация

-используют установку мембранной фильтрации с мембранными фильтрами с номинальным размером пор – 0,45 мкм;



- образец ЛС готовят по стандартной процедуре так, чтобы на фильтр нанести 1 г испытуемого средства, и добавляют ~ 100 КОЕ каждого из тест-микробов;
- полученный испытуемый образец переносят на мембранный фильтр, фильтруют и промывают фильтр подходящим объемом того же растворителя (не более 5 раз по 100мл);
- контроль: ~ 100 КОЕ каждого из тест-микробов в том же растворителе;
- для определения ОКА и ОКГ мембранные фильтры переносят на чашки с соответствующими питательными средами и инкубируют в подходящих условиях;
- для определения специфических микроорганизмов – соответственно на селективные среды
- проводят подсчет выросших колоний и интерпретацию результатов аналогично определению антимикробного действия чашечным методом.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Не найден подходящий метод нейтрализации :

- бактерицидное действие продукта в отношении тест-микробов.

Следовательно, продукт не может быть контаминирован данными видами микробов;

- продукт ингибирует только определенные (используемые в испытании) виды микробов и не ингибирует другие.

Испытание проводят с большим коэффициентом разведения с учетом критериев приемлемости для выявления устойчивых штаммов.

Определение микробиологической чистоты ЛС (АФИ, вспомогательных веществ) (ОКА и ОКГ)

- *Количество испытуемого образца:* чем больше масса образца, тем выше статистическая достоверность вывода об отсутствии патогенных микроорганизмов.

Если иное не указано в частной статье, используют 10 г или 10 мл испытуемого продукта

Количество может быть уменьшено

- для АФИ, содержание которых в ЛС очень мало - ≤ 1 мг в дозированной единице (таблетке, капсуле) и недозированной единице (мл или г). В этом случае количество испытуемого образца должно быть не менее чем количество, содержащееся в 10 дозированных единицах или 10 г (10 мл) продукта;
- для АФИ, количество которых ограничено или объем серии очень мал (1000 мл или 1000г). Количество образца для испытания – 1% от размера серии;
- для ЛС, общее количество в серии которых менее 200 единиц (например, для клинических испытаний). Размер отбираемого для контроля образца – 2 единицы.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Мембранная фильтрация:

- готовят образец из 10 г продукта (растворяют в отношении 1:10 в буфере или питательной среде – ГФ РБ) с учетом результатов испытаний по определению антимикробного действия;
- количество образца, эквивалентное 1 г исходного продукта, наносят на каждый из двух мембранных фильтров и немедленно фильтруют, при необходимости промывают;
- для определения ОКА один из мембранных фильтров переносят на поверхность агаризованной среды на основе гидролизата казеина и соевых бобов (или №1). Чашки инкубируют в течение 3-5 суток при температуре 30 - 35°C;
- для определения ОКГ второй из мембранных фильтров переносят на поверхность декстрозного агара Сабуро (или №2). Чашки инкубируют в течение 5-7 суток при температуре 20-25°C
- рассчитывают число КОЕ (ОКА и ОКГ) в 1г или 1 мл испытуемого продукта и делают вывод о соответствии его качества требованиям спецификации.

• Метод чашечного подсчета:

- готовят образец из 10 г продукта с учетом результатов испытаний по определению и устранению антимикробного действия;
- для каждой питательной среды (для выявления ОКА и ОКГ) готовят не менее 2-х чашек Петри для каждого уровня разведений;
- посевы делают глубинным или поверхностным способом;
- инкубируют посевы аналогично как и для мембранной фильтрации;
- для подсчета колоний отбирают чашки с максимальным количеством колоний не более 250 для определения ОКА и не более 50 для определения ОКГ. Рассчитывают среднее арифметическое значение числа колоний для каждого разведения и определяют количество КОЕ в 1 г или 1 мл испытуемого продукта. Делают вывод о соответствии его качества критериям приемлемости.
- отрицательный контроль: контролю подвергается растворитель, используемый для приготовления раствора/суспензий испытуемого продукта, путем высева на питательные среды. Не должно наблюдаться роста

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

- Если на агаризованной питательной среде для выявления бактерий обнаруживаются колонии грибов, они рассчитываются как часть общего количества аэробов (ОКА).
- Если на агаризованной питательной среде для выявления грибов обнаруживается рост колоний бактерий, они рассчитываются как общее количество грибов (ОКГ).

Определение микробиологической чистоты : испытания на наличие специфических микроорганизмов

Пример: выявление *Escherichia coli* (метод чашечного подсчета)

1. Образец готовят аналогично как и для выявления ОКА и ОКГ
2. Испытанию подвергают количество, эквивалентное 1 г или 1 мл продукта
3. Инокулируют подходящее количество бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают, инкубируют при температуре 30-35°C в течение 18-24 ч.
4. Встряхивают контейнер, переносят 1 мл образца, полученного при выполнении п.3, в 100 мл бульона Макконки и инкубируют при температуре 42-44°C в течение 24 - 48 ч. - *обогащение*

5. Пересевают подходящее количество образца, полученного при выполнении п.4, на чашки с агаром Макконки и инкубируют при температуре 30-35°C в течение 18-72 ч. – *индикация*

6. Интерпретация результатов: рост характерных колоний свидетельствует о возможном присутствии *Escherichia coli*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

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

При проведении испытания методом мембранной фильтрации приготовленный образец фильтруют через мембранный фильтр, который помещают в бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают, инкубируют при температуре 30-35°C в течение 18-24 ч. далее: аналогично пп. 4-7.

Лекция 9. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств

Схема определения микробиологической чистоты

Проверка пригодности питательных сред (стерильность, ростовые свойства)

Проверка наличия/отсутствия антимикробного действия продукта

← Продукт не обладает антимикробным действием

→ Продукт обладает антимикробным действием

↓
Прямой посев на чашки Петри с агаризованной средой

↓
Нейтрализация антимикробного действия (разведение, добавление нейтрализующего агента, комбинированный метод, мембранная фильтрация)

← Прямой посев на чашки Петри с учетом результатов устранения антимикробного действия

→ Мембранная фильтрация и перенос фильтров на поверхность агаризованных сред

↓
Инкубирование, подсчет выросших колоний, интерпретация результатов