

**Микробиологический  
контроль стерильных и  
нестерильных  
лекарственных средств  
(1 день исследования)**

# **Стерильные препараты -**

препараты, в которых в соответствии с требованиями Фармакопеи не допускается присутствие жизнеспособных клеток микроорганизмов.

**Доля стерильных препаратов составляет  
около 20% от общего количества  
лекарственных препаратов**

# **Стерильные лекарственные препараты**

- **Растворы для парентерального применения**
- **Суспензии**
- **Эмульсии**
- **Твердые лекарственные вещества (порошки, таблетки, пористые массы)**
- **Глазные капли и мази**
- **Лекарственные средства для местного применения на открытые раны (имплантаты, присыпки, мази, гели и др.)**

# **Нестерильные лекарственные препараты -**

**Препараты, в которых допускается содержание живых микроорганизмов, количество и качественный состав которых зависит от вида и назначения продукции и нормируется соответствующей документацией.**

- На долю нестерильных препаратов приходится около 80% общего числа выпускаемых лекарственных препаратов.**

**В нестерильных лекарственных  
препаратах **допускается**  
**лимитированное количество**  
**микроорганизмов при**  
**отсутствии определенных**  
**видов**, представляющих  
опасность для здоровья  
человека**

# **Контаминация лекарственных препаратов происходит**

- **в процессе производства**
- **в период использования (в условиях клиники - госпитальными штаммами микроорганизмов, например, *Pseudomonas aeruginosa*)**

# Фармакопея

- Определяет выбор микроорганизмов, представляющие опасность для здоровья населения
- Нормирует содержание микроорганизмов, допустимых в лекарственном препарате

# **Задачи микробиологического контроля нестерильной продукции**

1. Количественное определение в лекарственном препарате жизнеспособных микроорганизмов.
2. Идентификация выделенных патогенных микроорганизмов.

**Испытание** лекарственных средств **на**  
**микробиологическую чистоту**  
**проводят в асептических условиях**

# Отбор образцов лекарственных средств (ЛС)

- От каждой исследуемой серии ЛС для проведения **испытания на микробиологическую частоту** 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.

## **Твердые лекарственные формы:**

- **10,0 г образца** – для определения общего числа бактерий и грибов **в 1 г** препарата, для испытания на отсутствие ***P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli***
- **25,0 г образца** – для определения бактерий рода ***Salmonella***
- **10,0 г образца** – для количественного определения **энтеробактерий, устойчивых к желчи**

# Таблетки, драже, гранулы, порошки

- 10,0 г образца измельчают (в случае необходимости) и переносят в 100 мл буферного раствора.

# Капсулы

- **10,0 г образца** переносят в 100 мл буферного раствора, содержащего не более 5% твина-80 и нагретого до температуры не выше 40<sup>0</sup>С.
- После суспендирования капсул в буферном растворе проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

# Мягкие лекарственные формы:

- **10,0 г препарата** – для определения общего числа бактерий и грибов, для теста на отсутствие *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* в 1 г препарата
- **10,0 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

- **10,0 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<sup>0</sup>С и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

# Мази, линименты, кремы, суппозитории, трудно смешиваемые с водой

- **10,0 г образца** смешивают со стерильным твином-80, количестве 5 г. Смесь нагревают на водяной бане не выше 40<sup>0</sup>С и осторожно перемешивают. 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

- **10,0 мл образца** исследуют для определения общего числа микроорганизмов и грибов в 1 мл препарата, для теста на отсутствие **E. coli**, **P. aeruginosa**, **S. aureus**
- **25,0 мл образца** – для испытания на отсутствие бактерий рода **Salmonella**
- **10,0 мл образца** – для количественного определения **энтеробактерий**, устойчивых к желчи

# Растворы, суспензии, сиропы, микстуры

- **10,0 мл образца** поместить в 90 мл буферного раствора, перемешивать и провести количественное и качественное определение микроорганизмов.

## Растворы в маслах, эмульсии

- **10,0 мл образца** поместить в стерильную колбу, содержащую 90 мл буферного раствора с твином-80 в количестве не более 5% и стеклянные бусы. Смесь нагреть на водяной бане до температуры не выше 40<sup>0</sup>С и энергично встряхивать до получения гомогенной эмульсии, которую использовать для количественного и качественного определения микроорганизмов.

# Аэрозоли

## Аэрозоли на основе спиртов и твердых веществ

- 3,0 г образца (после испарения пропеллента) в 30 мл буферного раствора, перемешивают и проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.
- Не менее 1,0 г образца, применяемого респираторно, используют для испытания на отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи.

# Аэрозоли на основе масел

- 3,0 г образца (после испарения пропеллента) поместить в стерильную емкость с 30 мл буферного раствора с твином-80 в количестве не более 5 % и стерильные стеклянные бусы. Смесь нагревать на водяной бане до температуры не выше 40<sup>0</sup> и энергично встряхивать до получения гомогенной эмульсии, которую использовать для количественного и качественного определения микроорганизмов.
- Не менее 1,0 г образца, применяемого респираторно, используют для испытания на отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи.

# Трансдермальные пластыри

- 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<sup>0</sup>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*.

# **Методы количественного определения аэробных микроорганизмов**

# Методы:

- Чашечный агаровый метод

Глубинный

Двухслойный

Поверхностный

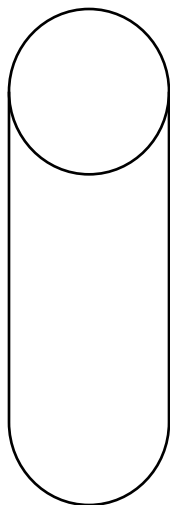
Модифицированный глубинный

- Мембранная фильтрация
- Пробирочный метод наиболее вероятных чисел

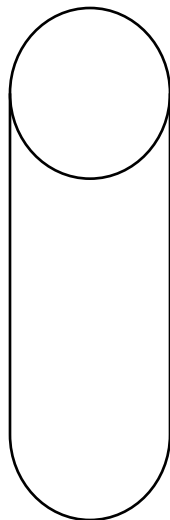
# Метод наиболее вероятных чисел (НВЧ)

- Используется при испытании ЛС с низким уровнем микробной контаминации.
- Метод НВЧ менее чувствителен и точен по сравнению с чашечным агаровым методом или методом мембранной фильтрации.
- Его используют только для определения **общего числа бактерий**, так как результаты, полученные при определении общего числа грибов, особенно плесневых, считают недостоверными.

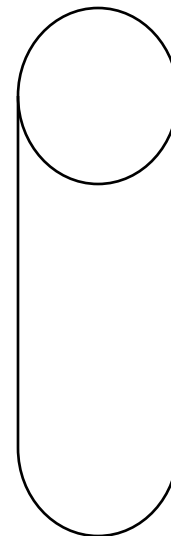
# Исследуемый образец



1:10



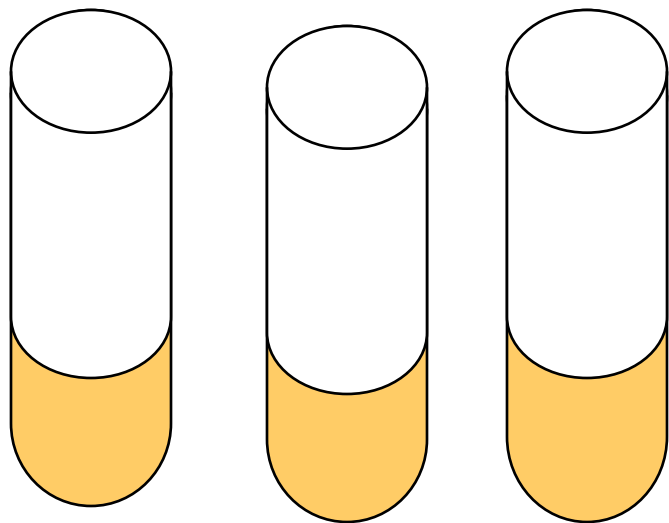
1:100



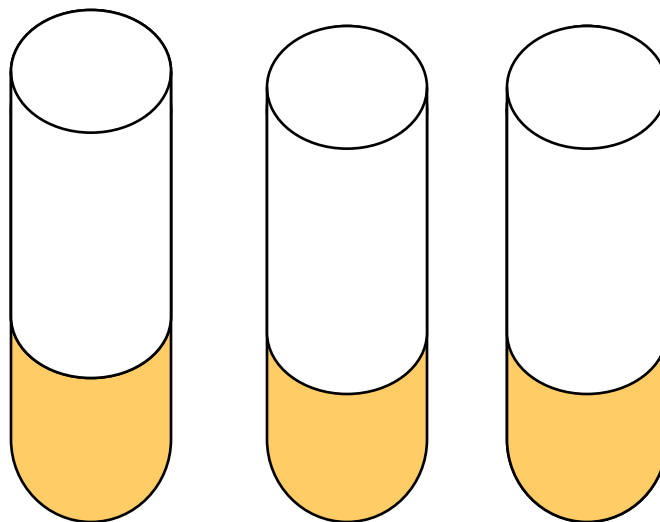
1:1000

**Приготовить образец в виде раствора, суспензии или эмульсии в разведениях, 1:10, 1:100, 1:1000, используя подходящий растворитель.**

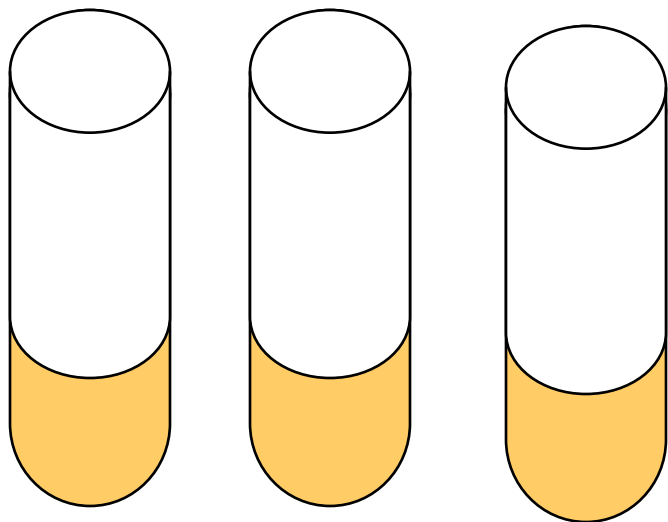
**1  
ряд**



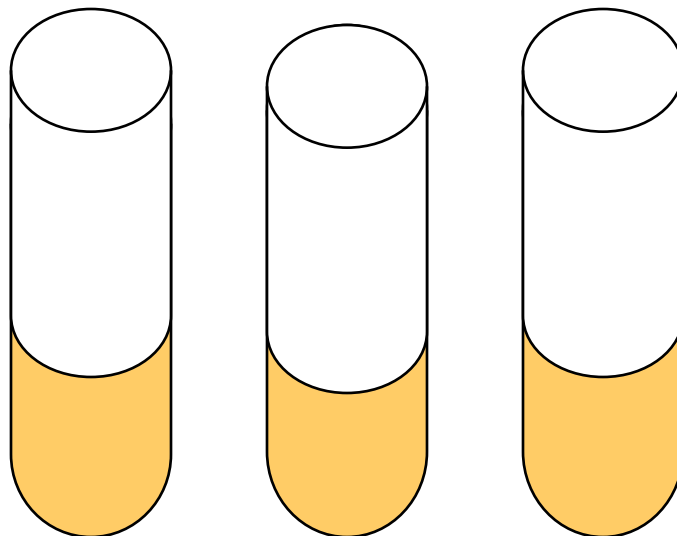
**2  
ряд**



**3  
ряд**



**4  
ряд**



**Подготовить 12 пробирок по 9 мл ПА**

## **Выполнение испытания**

- В 1 ряд пробирок внести по 1 мл испытуемого образца в разведении 1:10
- Во 2 ряд – по 1 мл в разведении 1:100
- В 3 ряд – по 1 мл в разведении 1:1000
- В 4 ряд внести по 1 мл разбавителя, который используют для растворения, суспендирования или эмульгирования образца

**Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение не более 3 сут.**

# Учет и интерпретация результатов

1. Необходимо отметить число пробирок в 1, 2, 3, рядах, в которых визуально наблюдают рост микроорганизмов.
2. Среда в пробирках 4 ряда (контроль разбавителя) должна оставаться стерильной.
3. Полученное трехзначное число соответствует наиболее вероятному количеству жизнеспособных микроорганизмов в 1,0 г или в 1,0 мл лекарственного средства

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

# Испытание на стерильность

# На стерильность исследуют

- препараты для инъекций, инфузий
- глазные капли, пленки
- фармацевтические субстанции
- биологические лекарственные препараты и их растворители и др. стерильные препараты

В соответствии с нормативной документацией или фармакопейными статьями препараты должны быть стерильными.

# Условия проведения испытания

- Испытание на стерильность проводят в асептических условиях в ламинарных установках, чистых помещениях или изоляторах класса чистоты А.
- Меры, предотвращающие контаминацию, не должны оказывать губительного влияния на микроорганизмы, которые могут содержаться в испытуемых образцах иммунобиологических лекарственных препаратов.
- Условия проведения испытания регулярно контролируют в соответствии с соблюдением надлежащих правил производства и лабораторной практикой.

# Методы испытания на стерильность

- Метод мембранной фильтрации
- Метод прямого посева

# Метод мембранной фильтрации

- Используют во всех случаях, когда природа препарата, его физико-химические свойства позволяют фильтровать его через мембранные фильтры.

# Метод мембранной фильтрации

- смачивание мембран
- подготовка образцов
- фильтрация содержимого всех емкостей через мембранные фильтры
- отмывка мембранных фильтров соответствующим стерильным раствором
- добавление питательной среды
- инкубирование посевов

## Метод прямого посева

- Используют для испытания на стерильность ЛС, не обладающих антимикробным действием или антимикробное действие которых можно устранить разведением или инаktivированием, а также для препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

# Устранение антимикробного действия препарата

- Увеличить разведение препарата, взяв больший объем растворителя/разбавителя питательной среды (но не более 200 мл).
- Вместо стандартного разбавителя можно использовать стерильную нейтрализующую жидкость промышленного производства.
- Использовать неспецифические инактиваторы (твин-80).
- Применение специфических инактиваторов, нейтрализующих антимикробное действие ЛС, но не угнетающих рост микроорганизмов.

# Специфические инактиваторы антимикробного действия ЛС

- 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  $\beta$ -лактамазы в количестве, указанном в фармакопейной статье или нормативной документации.

## Отбор образцов для испытания

- При проведении испытания на стерильность число контролируемых первичных упаковок определяется с учетом общего количества единиц в серии
- Для посева на соответствующую питательную среду используют образец в определенном количестве (фармакопейная статья)

# 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.
- При необходимости инактиватор можно добавлять и в питательную среду.

- **Испытуемые образцы засевают непосредственно в питательные среды в соотношении 1:10 или 1:20**

# Испытание мазей, кремов и растворов в маслах

- Необходимо приготовить 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.

# 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 °C и энергично встряхивают в течение 5-15 минут до получения гомогенной эмульсии, которую высевают в жидкие среды: тиогликолевую, соево-казеиновую и Сабуро.

## Мази и кремы, трудно смешиваемые с водой

- Готовят разведение препарата 1:10, помещая в стерильную колбу с соответствующим стерильным разбавителем, твином-80 в количестве 50% от массы навески и стеклянными бусами диаметром 5-6 мм.
- Смесь нагревают на водяной бане до температуры 40<sup>0</sup>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 количестве, указанном в фармакопейной статье «Стерильность», 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  $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  в жидкой тиогликолевой среде и при температуре  $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  в жидких соево-казеиновой среде или среде Сабуро.

# Учет и интерпретация результатов испытания

- Во время инкубации периодически просматривают посевы.
- Наличие роста микроорганизмов определяют визуально в проходящем свете.
- Общее время инкубации должно составлять не менее чем  $14 + 4$  сут от начала испытания.

При **отсутствии роста микроорганизмов**, считают, что  
испытываемый 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 !!!!**

# Питательные среды

- Для испытания на стерильность используют жидкие среды: тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро.
- **Тиогликолевая среда** применяется для выявления аэробных и анаэробных бактерий
- **Жидкая соево-казеиновая** среда применяется для выявления грибов и аэробных бактерий.
- **Жидкую среду Сабуро** используют для выявления грибов.

# Минимальное количество испытуемого препарата для посева на питательные среды

Количество препарата в первичной упаковке	Минимальное количество препарата для посева на каждую питательную среду
<b>Жидкие</b>	
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
<b>Твердые</b>	
Менее 50 мг	все содержимое
50 - 300 мг	½ содержимого, но не менее 50 мг
300 мг – 5 г	150 мг