

# Санитарно-микробиологическое исследование аптек.



# *МИКРОФЛОРА ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ*

Под лекарственной формой понимают одно или несколько лекарственных веществ, подвергшихся специальной обработке, в результате которой им придана удобная для применения больным форма. В аптеках изготавливают следующие лекарственные формы: сухие (порошки, сборы), жидкие (микстуры, настои, отвары, капли), мягкие (мази, пасты, шарики, свечи) и стерильные инъекционные препараты

Лекарства с повышенной обсемененностью микробами, особенно патогенными, могут вызывать инфекционные заболевания у людей, кроме того, размножение микроорганизмов в лекарственных средствах ведет к изменению их физических и органолептических свойств, а в отдельных случаях и к превращению лекарств в токсический продукт.

Срезанные и сорванные при заготовке лекарственные растения (растительное сырье) могут содержать большое количество микробов.

## Растительное сырье может быть загрязнено:

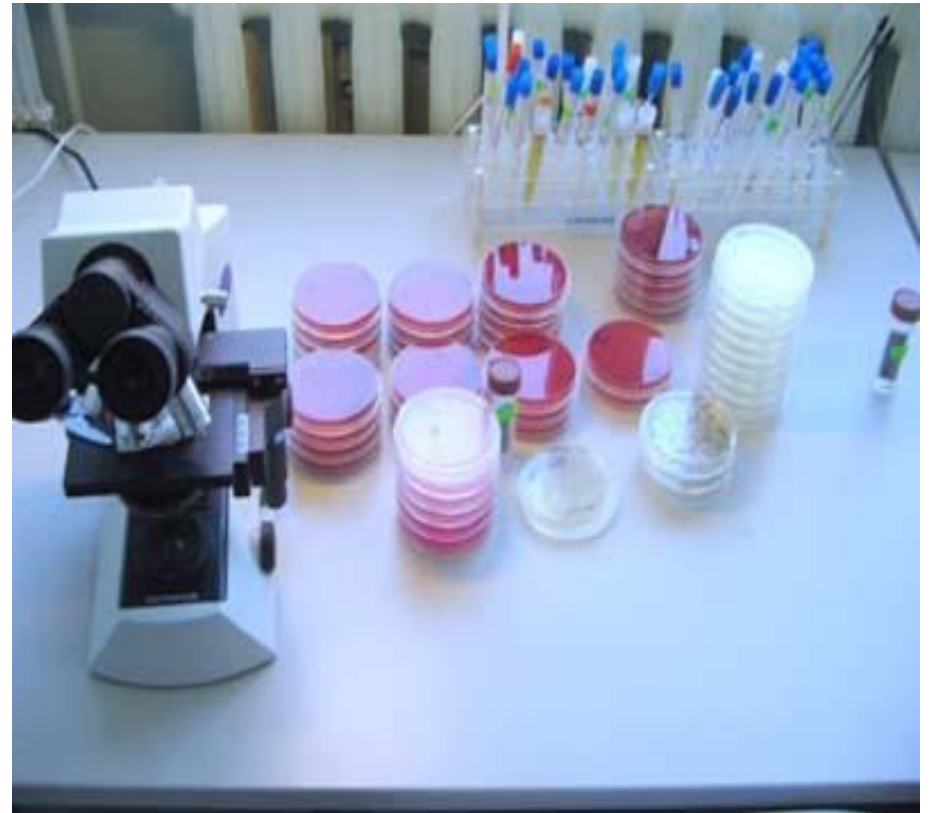
- 1) *нормальной микрофлорой растений;*
- 2) *фитопатогенной микрофлорой;* т.е. микробами *самих растений*
- 3) *микробами из окружающей среды.*

Растительное лекарственное сырье может загрязняться микроорганизмами из окружающей среды на всех этапах его заготовки и хранения: сбор, первичная обработка, сушка, измельчение, упаковка, получение резаного сырья, растительных порошков, а также при приготовлении брикетов, гранул, таблеток.

Срезанные и сорванные растения являются хорошей **питательной средой** для размножения микроорганизмов (грибов, гнилостных и целлюлозоразрушающих бактерий и др.). Поэтому происходит **микробная порча сырья**.

**Признаки порчи:** изменение цвета, появление очагов размножения плесени и пр.

Микробная порча приводит к изменению **фармакологических свойств** растений и лекарственных препаратов, полученных из растений, а также может служить причиной образования **токсичных продуктов**. Патогенные микроорганизмы могут вызывать заболевания у людей, использующих препараты.





Одним из способов, препятствующих росту микроорганизмов на растениях, является их **высушивание**. На высушенных растениях жизнедеятельность микробов значительно снижается, многие бактерии погибают. В связи с этим, микробная порча сырья происходит в первую очередь при повышенной влажности, которая способствует размножению **гнилостных микробов**.

Поэтому необходимо строго соблюдать **условия хранения** растительного сырья и проводить **бактериологический контроль** его микробной загрязненности. Микробная обсемененность лекарственных препаратов зависит от соблюдения в аптеке санитарно-гигиенического режима.

# *Микрофлора готовых лекарственных форм*

изготавливаемых в аптеках и на производстве, зависит от :

- 1) вида сырья, его питательной ценности для микроорганизмов или, напротив, его антимикробной активности, начальной загрязненности;
- 2) химической природы веществ, входящих в состав лекарственного средства;
- 3) технологии приготовления (настои, отвары, температура, время, объем и пр.);



4) условий хранения;

5) санитарно-гигиенических условий в аптеках и на фабриках.

Инъекционные препараты, глазные капли и мази, препараты для новорожденных должны быть стерильными.

В ряде случаев инъекционные средства, оставаясь стерильными, обладают пирогенными свойствами.

Пирогенная реакция организма человека, возникающая за счет убитых бактерий и продуктов их распада, содержащихся в лекарственном препарате, характеризуется повышением температуры, вазомоторными расстройствами, в тяжелых случаях – шоковым состоянием.

Пирогенные вещества (пирогены), представляющие собой эндотоксины (преимущественно грамотрицательных бактерий), проходят через бактериальные фильтры, не инактивируются при кипячении, для их разрушения необходимо автоклавирование в течение 3 ч.

Причиной пирогенности лекарственных препаратов, являются загрязнение дистиллированной воды, нарушение асептики технологического процесса, увеличение времени (более 1,5 ч) между приготовлением раствора и началом стерилизации.

Из инъекционных жидких лекарственных форм легче всего обсеменяются микробами настои и отвары; при их хранении появляются признаки порчи: муть, изменение цвета, пленка, необычный запах. Срок хранения этих препаратов ограничен. Спиртовые настойки меньше подвержены порче вследствие антимикробного действия алкоголя.

Сухие порошкообразные средства, особенно тальк и крахмал, мягкие лекарственные формы также подвержены микробному загрязнению. Их микробная порча носит очаговый характер и состоит в изменении цвета и консистенции вещества.

*Микробный состав готовых лекарств представлен следующими группами:*

1. плесневые грибы - Penicillium, Aspergillus, Mucor;
2. дрожжевые грибы;
3. кокки - сарцины, стафилококки;
4. спороносные палочки - B. subtilis, B. mesentericus.

**Предупреждение** микробной порчи готовых лекарственных веществ возможно при соблюдении условий, исключающих их микробное загрязнение: соблюдение правил личной гигиены фармацевтами, качественное обеззараживание воздуха аптечных помещений, правильная обработка посуды, оборудования.

# *САНИТАРНО- БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В АПТЕКАХ*

В аптеках работниками государственного санитарно-эпидемиологического надзора согласно инструкции, утвержденной приказом Министерства здравоохранения, не менее двух раз в квартал осуществляется бактериологический контроль, объектами которого служат:

- 1) вода дистиллированная;
- 2) инъекционные растворы до стерилизации;
- 3) инъекционные растворы после стерилизации;

- 4) глазные мази после стерилизации;
- 5) глазные капли, приготовленные в асептических условиях на стерильной основе;
- 6) сухие лекарственные вещества, используемые для приготовления инъекционных растворов;
- 7) нестерильные лекарственные формы;
- 8) аптечная посуда, пробки, прокладки, прочие материалы;
- 9) инвентарь, оборудование, руки, санитарная одежда персонала;
- 10) воздух аптечных помещений.

Микроорганизмы, попадающие в лекарства, **приводят к их порче и могут изменить их качество**, разлагая своими ферментами действующее начало и переводя его в другие соединения. Таким образом, микроорганизмы могут изменять свойства лекарств, делая **их неактивными или даже токсичными**, например, в результате образования микробных токсинов и пирогенов. Они **могут вызывать инфекционные заболевания** у людей, использующих препараты, загрязненные микроорганизмами родов *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* и др..



Среди готовых лекарственных форм **наиболее загрязненными** являются препараты растительного происхождения – *настои и отвары*

При хранении этих лекарств, особенно в теплом месте, количество микробов в них возрастает до высоких цифр, и появляются признаки порчи. **Признаками микробной порчи жидких лекарственных форм** является помутнение, если лекарственная форма должна быть прозрачной, появление осадка, увеличивающегося в объеме, образование пленки на поверхности, появление запаха, несвойственного данной лекарственной форме.

В связи с этим осуществляется **бактериологический контроль** **соблюдения санитарно-гигиенического режима** **изготовления** лекарственных препаратов на предприятиях и в аптеках и проводится **санитарно-микробиологический контроль** каждой серии ***выпускаемой лекарственной формы***, т.е. проводится определение ***микробной загрязненности*** различных ***готовых лекарственных препаратов***.

# *МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ МИКРОБНОЙ ЧИСТОТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ.*

## Определение микрофлоры в лекарственных формах:

Определение микрофлоры в лекарственных формах состоит из следующих этапов:

1. определение общего микробного числа (микробная обсемененность);
2. определение бактерий группы кишечной палочки;
3. определение дрожжевых и плесневых грибов;
4. определение условно-патогенных и патогенных

## *Определение микробной обсемененности растительного лекарственного сырья:*

1) В асептических условиях (в стерильной чашке Петри, обоженными ножницами и пинцетом) из листа или верхнего слоя корневища вырезают кусочек площадью 1 см<sup>2</sup>, который помещают в пробирку с 10 мл стерильного физиологического раствора и взбалтывают в течение 5 мин.

2) 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.

3) В стерильную чашку Петри вносят 1 мл смыва, после чего в нее наливают 15 мл расплавленного и остуженного до 45°C МПА, перемешивают и после застывания агара посева инкубируют при 37°C 24-48 ч.

4) Производят подсчет выросших колоний на поверхности и в глубине агара. Полученное число колоний следует умножить на степень разведения.

*Для оценки микробной обсемененности растительного сырья используется метод смывов:*

- 1) В асептичных условиях, используя стерильные инструменты, взвешивают 1 г сырья, помещают в стерильную пробирку с 5 мл изотонического раствора хлорида натрия и встряхивают на шуттель-аппарате в течение 10 мин;
- 2) берут 1 мл смыва, делают разведения 1:10, 1:100; из каждого разведения делают посев в глубину питательной среды в чашках Петри.
- 3) подсчитывают число выросших колоний и, зная разведение смыва, подсчитывают микробную загрязненность сырья.

Микробную загрязненность лекарственного сырья выражают количеством клеток микроорганизмов в 1 г (мл) сырья.

Для выявления роста грибов и дрожжей используют среду Сабуро или сусло-агар, для выявления бактерий – МПА. При этом засевают 2-3 параллельные чашки на каждое разведение. Оставляют в термостате при 37°С и при 24°.



*Источники микробного загрязнения лекарственных препаратов:*

- 1) лекарственные растения;
- 2) вода
- 3) аптечная посуда, оборудование и пр.;
- 4) воздух производственных помещений;
- 5) руки персонала.

Микроорганизмы могут попадать в лекарственные средства в процессе неправильного анализа, особенно органолептического.

Лекарственные средства для парентерального введения в виде инъекций, **глазные капли, мази, пленки, средства для новорожденных**, должны быть стерильными.

Стерильные инъекционные растворы могут обладать **пирогенными свойствами**, т.е. вызывать повышение температуры тела. Это обусловлено наличием в них убитых бактерий или продуктов их распада.

Пирогены – это сложные по своей структуре вещества, которые содержат протеины, липиды и полисахариды, и вызывают в макроорганизме комплекс изменений, характеризующихся повышением температуры тела, вазомоторными расстройствами, в тяжелых случаях – шоковым состоянием. Пирогенами являются бактериальные эндотоксины.

Все растворы, предназначенные для инъекций не должны содержать пирогенов. Но освободить от них готовый продукт не удастся, т.к. пирогены проходят через бактериальные фильтры и устойчивы к нагреванию.

Для этого необходимо соблюдать *специальные требования* при изготовлении стерильных лекарственных средств:

- 1) дистиллированная вода уже до стерилизации не должна содержать кишечной палочки;
- 2) общее количество микробов в воде не должно превышать 10 – 15 клеток на 1 мл;
- 3) препараты готовят в асептических условиях, пользуются стерильной посудой, соблюдают стерильность при их упаковке, после приготовления стерилизуют.

Проверку стерильности производят в боксах со строгим соблюдением правил асептики. Делают посев на **тиогликолевую среду** (для выявления различных бактерий, в том числе анаэробов) и посев на среду **Сабуро** (для выявления грибов, г.о. рода Кандида). Если нет роста микробов на средах, то препарат является стерильным.

Если лекарственное

*средство* обладает **антимикробным** действием, то стерильность определяют путем ***мембранной фильтрации***.

После фильтрации исследуемого препарата фильтр делят на части и вносят для роста задержанных микроорганизмов в жидкие питательные среды. При отсутствии роста препарат считается стерильным

Лекарственные средства, не требующие стерилизации, содержат микроорганизмы. Но их содержание не должно превышать предельно допустимых значений для различных лекарственных форм.

## *Оценка микробной загрязненности нестерильных препаратов.*

### Определяют:

1) количество жизнеспособных бактерий в 1 г или 1 мл препарата;

2) количество жизнеспособных грибов в 1 г или 1 мл препарата;

3) кишечную палочку и представителей семейства энтеробактерий, синегнойную палочку и золотистого стафилококка, которые не должны присутствовать в нестерильных лекарственных средствах.



*Методы определения микробной  
загрязненности лекарственных средств,  
не обладающих антимикробным  
действием.*

От каждой серии препарата отбирают 10 проб из 10 разных упаковок, в целом не меньше 50 г или мл.

На анализ берут 30 г т(мл), разделив на 3 части по 10 г (мл).

*Определение общего количества бактерий и грибов.*

1) 10 г (мл) разводят в 10 раз 0,1 М раствором фосфатного буфера, доводя конечный объем до 100 мл.

2) Делают посев по 1 мл разведенного препарата двухслойным агаровым методом в 2 чашки Петри с МПА, содержащим 0,1% глюкозы для определения бактерий и по 1 мл в 2 чашки Петри со средой Сабуро с антибиотиками для грибов.

3) Затем подсчитывают число колоний, находят среднее арифметическое для 2-х чашек и высчитывают количество бактерий и грибов в 1 г (мл) отобранного на анализ образца. °С 5 дней, а со средой Сабуро для определения грибов при 24° ашки с МПА для определения бактерий инкубируют при 37

## *Определение бактерий семейства Enterobacteriaceae.*

1) Из каждой пробирки с чистой культурой делают пересевы на :24 – 48 час.

На среде Эндо бактерии семейства Enterobacteriaceae образуют малиновые колонии с металлическим блеском.

На висмут-сульфитном агаре – черные или зеленовато-бурые, светло-зеленые или коричневые колонии.

2) Колонии исследуют микроскопически и выявляют грам «-» неспоровые палочки.

3) Подозрительные колонии пересевают на скошенный в пробирках МПА с 0,1% глюкозой и инкубируют при 37°C 24 – 48 час. При наличии роста делают пересев на **среду Эндо** и **висмут-сульфитный агар**.

4) Инкубируют при 37°C Следующие 10 г(мл) образца вносят в 90 мл среды обогащения, перемешивают и инкубируют при 37 С.

- 1) среду с глюкозой и феноловым красным (энтеробактерии ферментируют глюкозу и среда становится желтой);
- 2) среду с нитратом калия (энтеробактерии восстанавливают нитраты в нитриты и не имеют фермента цитохромоксидазы).

Если в образце обнаружены грам «-» неспоровые палочки, которые дают отрицательную реакцию на цитохромоксидазу, ферментируют глюкозу и восстанавливают нитраты в нитриты, то делают вывод, что исследуемый препарат содержит бактерии семейства *Enterobacteriaceae*.

## *Определение бактерий S. aureus и P. aeruginosa.*

Стафилококк на солевом агаре образует желтые колонии, окруженные желтыми зонами. При микроскопии обнаруживаются грам"+" кокки. С чистой культурой стафилококка ставят реакцию плазмокоагуляции.

Для этого:

1) в пробирку с 0,5 мл разведенной (1:4) плазмой крови человека или кролика вводят петлю агаровой культуры стафилококка и инкубируют 1-24 час при 37°C 24 – 48 час.

2) При наличии роста делают пересев петлей на чашки Петри с соевым агаром с маннитом для стафилококка и на чашки Петри со средой для идентификации синегной палочки.

3) Инкубируют при 37°С. Следующие 10 г (мл) образца вносят в 90 мл накопительной среды и инкубируют при 37 С.

*P. aeruginosa* на диагностической среде образует **зеленые флюоресцирующие колонии**. Их идентифицируют микроскопически и биохимически. Под микроскопом обнаруживают грам «-» палочки. Реакция на цитохромоксидазу положительна (бумажка с индикатором синее).

## Нормативы.

В нестерильных лекарственных средствах для приема внутрь в 1 г (мл) должно быть не более 1000 бактерий и 100 дрожжевых и плесневых грибов, а также должны отсутствовать патогенные и условно-патогенные микроорганизмы - представители семейства энтеробактерий, синегнойная палочка и золотистый стафилококк.

Лекарственные средства для местного применения (полость уха, носа, интравагинально) не должны содержать более 100 (суммарно) микробных клеток в 1 г (мл).

В таблетированных препаратах не должно быть патогенной микрофлоры, а общая обсемененность не должна превышать 10 тыс. микробных клеток на 1 таблетку.



# *Бактериологическое исследование стерильных лекарственных средств*

Инъекционные растворы, глазные капли, лекарственные средства для новорожденных, а также другие лекарственные препараты, стерилизуемые в процессе их изготовления, засевают неразведенными в тиогликолевую среду для определения микробной обсемененности и среду Сабуро для выявления дрожжевых и плесневых грибов. Посевы на тиогликолевой среде выдерживают 14 сут при 37<sup>0</sup>С, на среде Сабуро 14 сут при 24<sup>0</sup>С. Учет результатов посевов проводят по отсутствию видимых изменений в посевах.

## *Определение микробной обсемененности готовых лекарств*

- 1) Жидкие лекарственные формы разводят стерильным физиологическим раствором 1:10 (или 1:100) и засевают в объеме 0,5 мл на МПА в чашке Петри.
- 2) 1 г порошка или таблеток помещают в пробирку с 10 мл физиологического раствора и после растворения производят посев на МПА.

3) Мягкие лекарственные формы (мази, пасты) в количестве 1 г взвешивают в асептических условиях, переносят в пробирки с 10 мл стерильного 1,4% раствора натрия гидрокарбоната для диспергирования, которое производят вращательным движением пробирки между ладонями в течение 2-4 мин. 0,5 мл полученного раствора засевают на МПА в чашках Петри.

Чашки с посевами помещают в термостат на 48 ч, затем подсчитывают число бактериальных колоний и определяют количество бактерий в 1 мл или 1 г образца.

## *Определение общего количества грибов*

Определение общего количества грибов проводят на твердой среде Сабуро, на которую засевают 0,5 мл цельного или разведенного 1:10 препарата. Посевы инкубируют при 240С в течение 5 сут, затем подсчитывают число выросших колоний и определяют количество грибов в 1 мл или 1 г препарата.

# Качественное определение условно-патогенных

## и патогенных микроорганизмов

### 1. Определение бактерий

семейства Enterobacteriaceae (роды Escherichia, Salmonella, Shigella). Посев лекарственных средств производят на среду Эндо и висмут-сульфитный агар. Идентификацию энтеробактерий осуществляют следующим образом: если в образце обнаружены грамотрицательные неспоровые палочки, дающие отрицательную реакцию на цитохромоксидазу, ферментирующие глюкозу и восстанавливающие нитраты в нитриты, исследуемый препарат содержит бактерии семейства Enterobacteriaceae

## 2. Определение патогенных стафилококков.

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

### 3. Выявление *Pseudomonas aeruginosa*.

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

### 4. Выявление протей.

Производят посевом на МПА по Шукевичу.

Наличие условно-патогенных и патогенных микроорганизмов в лекарственных препаратах недопустимо.

*Нормативы предельно допустимого содержания  
непатогенных микроорганизмов в лекарственных формах  
(содержание микроорганизмов  
в 1 г/мл).*

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



# *Бактериологическое исследование в аптеках*

С целью проверки качества мытья посуды, санитарного состояния аптек, соблюдения правил личной гигиены персоналом проводят санитарно-бактериологическое исследование аптечной посуды, оборудования, рабочих столов, полотенец, санитарной одежды и рук аптечных работников.

Для определения микробной загрязненности используют метод смывов с поверхности исследуемых объектов стерильным физиологическим раствором.

## Приготовление смывов.

Для исследования используют 3 флакона. В один из флаконов наливают 10 мл стерильного физиологического раствора, ополаскивают внутреннюю поверхность сосуда, переливают во второй и третий флаконы, последовательно ополаскивая их.

Пробки (корковые, полиэтиленовые, резиновые) в количестве 5 штук стерильным пинцетом помещают в широкогорлую стерильную колбу, закрытую ватно-марлевой пробкой, заливают 10 мл стерильного физиологического раствора и тщательно прополаскивают.

Воронки, пробирки, пипетки ополаскивают 10 мл стерильного физиологического раствора.

Смыв со стола производят с поверхности 100 см<sup>2</sup>, для чего используют специальные трафареты из проволоки или жести, стерилизуемые прокаливанием перед взятием смывов. Смыв осуществляется стерильным ватным тампоном, помещенным в пробирку с 2 мл стерильного физиологического раствора.

Непосредственно перед взятием смыва тампон смачивают физиологическим раствором, тщательно протирают поверхность стола ограниченную трафаретом, помещают в пробирку, в которую добавляют 8 мл стерильного физиологического раствора и тщательно тампон прополаскивают.

Смывы с рук берут влажным тампоном (тампон находится в пробирке с 2 мл стерильного физиологического раствора), протирая ладони, подногтевые, межпальцевые пространства обеих рук. Тампон помещают в пробирку, добавляют 8 мл стерильного физиологического раствора и тщательно его прополаскивают.

Смывы исследуют на общее бактериальное загрязнение (ОМЧ), на наличие кишечной палочки и золотистого стафилококка; обнаружение которых свидетельствует о грубых нарушениях санитарного режима в аптеках.

## Определение микробного числа.

1. 1 мл смыва вносят в стерильную чашку Петри, заливают 12-15 мл расплавленного и остуженного до 45°C МПА, тщательно перемешивают содержимое чашки и после застывания агара ее помещают в термостат на 24-48 час.
2. Подсчитывают количество выросших колоний, умножают на 10 и определяют общую микробную обсемененность объекта.

Определение бактерий кишечной палочки как показателя фекального загрязнения.

1. Остаток смывной жидкости (около 8 мл) засевают в пробирку, содержащую 1 мл концентрированной среды Эйкмана. Посев инкубируют при 43°C 24 ч.
2. При наличии газообразования в среде производят высев на дифференциально-диагностическую среду Эндо в случае появления типичных темно-красных колоний производят микроскопию и ставят оксидазную пробу.

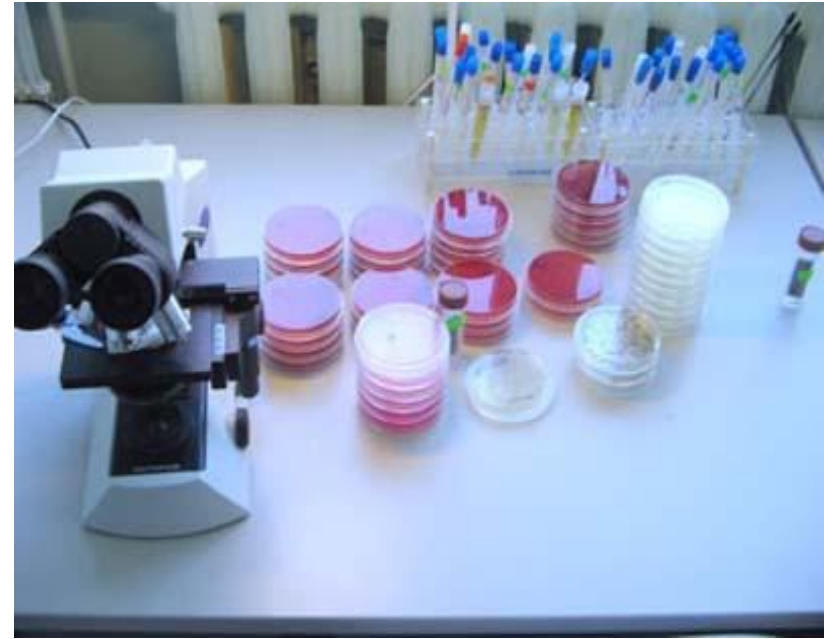
*Критерии оценки микробной обсемененности аптечной посуды, рабочих столов, рук персонала.*

1. При исследовании микробной загрязненности посуды, оборудования, рук аптечных работников количество мезофильных аэробов и факультативных анаэробов не должно превышать 150 в 10 мл смывной жидкости.
2. При бактериологическом исследовании в аптеках наличие бактерий группы кишечной палочки и золотистых стафилококков не допускается.

## *Количество микробов в 1 м3 воздуха.*

Наименование помещений	Условия работы	общее	золотистого стафилококка	плесневых и дрожжевых грибов
Асептический блок, стерилизационная	до работы после работы	до 500 до 1000	не должно быть не должно быть	не должно быть не должно быть
Ассистентская, расфасовочная, дефектарная, материальная	до работы после работы	750 1000	не должно быть не должно быть	не должно быть не должно быть
Моечная	во время работы	1000	не должно быть	до 12
Зал обслуживания	во время работы	1500	до 1000	до 20





# Список используемой литературы

- Учебник по микробиологии и вирусологии, 2003г. авт. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.Б.
- Медицинская микробиология авт. Покровский В.И., Позднев О.Г. 2001г.
- Санитарная микробиология авт. Лабинская А.С. 2008г.