

О.М. Павленко, Л.Л. Павленко*,*

М.Г. Павленко, І.А. Павленко**

**(м. Мелітополь, Україна)*

МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ НЕСТЕРИЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Abstract. This article about microorganisms-contaminants of drugs and their role in human disease are discussed. The method of detection of microorganisms-contaminants in the presence of the tested product is proposed.

Keywords: drug, microorganism, contaminant, disease, microbiology, pharmacology.

Анотація. В даній статті розглядаються мікроорганізми-контамінанти лікарських засобів та їх роль в захворюванні людини. Запропоновано методіку можливості виявлення мікроорганізмів-контамінантів у присутності випробуваного продукту.

Ключові слова: лікарський засіб, мікроорганізм, контамінант, препарат, захворювання, мікробіологія, фармакологія.

Рівень мікробної чистоти – один з основних показників якості фармацевтичної продукції. За цим показником всі препарати ділять на:

➤ Стерильні – препарати, в яких не допускається вміст життєздатних клітин мікроорганізмів (~ 20% від загальної кількості лікарських засобів);

➤ Нестерильні – препарати, в яких допускається вміст живих мікроорганізмів, вимоги до кількості та якісним складом яких залежить від лікарської форми і способу введення препарату і нормується відповідної документацією (~ 80% від загальної кількості лікарських засобів). Важливість мікробіологічного контролю в фармацевтичному виробництві обумовлена наслідками присутності мікроорганізмів як в стерильних, так і в нестерильних лікарських засобах (ЛЗ), що створюють небезпеку для здоров'я і життя людини.

При розгляді ролі мікроорганізмів-контамінантів ЛЗ в патології людини були встановлені наступні факти [1]. Мікроорганізми-контамінанти можуть призводити до серйозних інфекційних захворювань або до отруєння організму внаслідок утворення токсинів. Вони можуть призводити до біодеградації ЛЗ, в зокрема діючих речовинах (АФІ) – в результаті відбувається зниження або відсутність терапевтичної дії препарату. Ще однією особливістю мікроорганізмів-контамінантів є те, що вони сприяють появі і поширенню лікарської стійкості, тобто мають здатність зберігати життєдіяльність, незважаючи на контакт з хіміопрепаратами.

Природа захворювань, що викликаються мікроорганізмами-контамінантами ЛЗ:

- Неінфекційні: обумовлені продуктами біодеградації АФІ;
- Інфекційні: викликаються проникненням в організм патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Токсикоз – захворювання, що викликані ентерально діючими екзотоксинами мікроорганізмів (*S. aureus*, *C. botulinum*.). Токсикоінфекції – захворювання, викликані ендотоксинами мікроорганізмів (*B. cereus*, рід *Klebsiella*).

Виникнення, розвиток і результат захворювання залежать: від рівня мікробної контамінації; вірулентності мікроорганізму-контамінантами; резистентності людини; способу введення препарату. Для стерильних ЛЗ наявність мікроорганізмів навіть в малій кількості може стати летальним, враховуючи безперешкодне потрапляння мікроорганізмів в кров або на слизові оболонки, за

умови ослабленого імунітету людини. При місцевому застосуванні ймовірність розвитку інфекційного процесу різко зростає при великих пошкодженнях тканин в результаті травми, опіку, хірургічного втручання.

Наприклад: *Staphylococcus aureus* при попаданні з контамінованих ЛЗ: на шкіру або слизові може викликати гнійно запальні процеси; при інгалаційному введенні – стафілококову пневмонію; при пероральному введенні – токсикоінфекцію; при попаданні в кров'яне русло – генералізовану інфекцію (Сепсис). Можна зробити висновок, що нормування щодо стерильності і мікробіологічної чистоти ЛЗ, регламентоване вимогами фармакопеї, призначене для захисту споживачів ЛЗ від можливих наслідків їх контамінації мікроорганізмами.

Таблиця 1

Живильні середовища, що використовуються для визначення мікробіологічної чистоти

Мікроорганізми	Живильне середовище
Загальна кількість аеробів (ЗКА)	Агаризоване середовище на основі гідролізату казеїну і соєвих бобів (Агаризоване середовище №1)
Загальна кількість грибів (ЗКГ)	Декстрозний агар Сабуро (Агаризоване середовище №2)
<i>Escherichia coli</i>	Бульйон на основі гідролізату казеїну і соєвих бобів, бульйон Макконкі, агар Макконкі

Можливість виявлення мікроорганізмів-контамінантів у випробуванні в присутності випробуваного продукту (ЛЗ, АФІ або допоміжна речовина) повинна бути доведена.

I. Перевірка придатності поживних середовищ.

A. Перевірці підлягає кожна партія приготованих поживних середовищ (~ 5% від кількості в партії);

Б. Перевірка стерильності: термостатують зразок кожної серії живильного середовища після його стерилізації протягом 5-ти діб при 30-35°C (якщо середовище використовується для виявлення бактерій) і 20-25°C (якщо середовище використовується для виявлення грибів). Після закінчення заданого терміну на (в) поживних середовищах повинні відсутні візуально визначаються ознаки зростання мікроорганізмів.

В. Перевірка ростових властивостей:

➤ Ростові якості поживних середовищ забезпечуються двома факторами:

- наявністю поживних речовин (пептиди, вуглеводи) і факторів росту, таких як амінокислоти, вітаміни, мікроелементи та інші;

- відсутністю інгібіторів росту мікроорганізмів, наприклад, залишків протеолітичних ферментів, домішок важких металів, антибіотичних речовин;

➤ Контролем при визначенні ростових якостей середовища служить:

- стандартне середовище з гарантованими ростовими властивостями, на якому правильно проявляється кількісне та якісне зростання мікроорганізмів (морфологія колоній);

- у разі відсутності стандартного середовища для контролю ростових властивостей в якості контролю використовують деякий кількість середовища з попередньої партії.

II. Перевірка наявності (відсутності) антимікробної дії ЛЗ (АФІ, допоміжної речовини).

1. Деякі ЛЗ (АФІ, допоміжні речовини) мають виражену антимікробну дію:

➤ Специфічну антимікробну дію: антибіотики, антисептики, похідні фторхінолонів, сульфаніламідів та інші, тобто речовини і препарати з них, які призначені для лікування інфекційних захворювань.

➤ Неспецифічну антимікробну дію: цитостатики, спирти, S-місткі препарати, деякі анальгетики та інші, тобто речовини і препарати з них, які безпосередньо не

призначені для лікування інфекційних процесів, але володіють супутньою антимікробною дією.

2. Наявність антимікробної дії ЛЗ перевіряється в тих же умовах, що і визначення мікробіологічної чистоти, з використанням тест-культур, застосовуваних для перевірки ростових властивостей поживних середовищ.

3. В основі методу визначення антимікробної дії лежить порівняння інтенсивності росту тест-мікроорганізмів в присутності і під час відсутності випробуваного продукту (АФІ, допоміжної речовини, ЛЗ).

4. Приготування випробуваного зразка:

- водорозчинні продукти: розчиняють або розводять (зазвичай в співвідношенні 1:10) в буфері або живильному середовищі;
- нерозчинні в воді продукти: суспендують (зазвичай в співвідношенні 1:10) в буфері або живильному середовищі;
- жири: продукт розчиняють в невеликій кількості стерильного ізопропілміристат. При необхідності підтримують температуру в водяній бані; додають попередньо підігрітий до потрібної температури розчинник до отримання розведення продукту 1:10, перемішують до утворення емульсії.

5. Контроль-розчинник, який використовується для приготування зразка ЛЗ (буфер або живильне середовище).

6. Інокуляція зразка і контролю, висів на поживні середовища:

- обсяг суспензії мікроорганізму не повинен перевищувати 1% обсягу зразка або контролю;
- роблять висів на чашки Петрі глибинним або поверхневим способом, інкубують. Для кожного мікроорганізму використовують не менше 2-х чашок.

7. Негативний контроль: контролю піддається розчинник, який використовується для приготування вихідної і робочої суспензій тест-мікроорганізмів, шляхом висіву на поживні середовища. Не повинно спостерігатися зростання мікроорганізмів.

8. Облік зростання і інтерпретація результатів:

- підраховують кількість вирослих колоній бактерій і грибів в чашках з додаванням зразка препарату і контролю, розраховують середнє арифметичне;
- якщо середня кількість колоній в чашках з досліджуваним зразком відрізняється від середньої кількості колоній в чашках з контролем, менш ніж в 2 рази (відсоток відновлення – більше 50%), то вважається, що продукт не має антимікробної дії;
- в іншому випадку продукт має антимікробну дію, необхідно його усунути (нейтралізувати).

III. Нейтралізація (усунення) антимікробної дії:

- розведення вихідного зразка;
- додавання нейтралізуючого агента (специфічного або неспецифічного) до розчинника;
- комбінація двох методів;
- мембранна фільтрація.

Розведення вихідного зразка – використання того ж самого розчинника, що і для приготування зразка ЛЗ (буфер або живильну середу);

- розведення повинно проводитися з урахуванням критеріїв прийнятності за змістом мікроорганізмів в продукті. Наприклад: якщо зміст ЗКА – 103 КУО/г, а ЗКГ – 102 КУО/г, то останнім допустиме розведення зразка для усунення антимікробної дії складе - 1:500 для бактерій і 1:50 для грибів (при посіві 1 мл зразка з культурою глибинним способом);

- якщо бажаний результат досягається при мінімальному розведенні, використовують це розведення;

- контроль, негативний контроль, проведення випробування та інтерпретацію результатів (аналогічно як при «Перевірка наявності (відсутності) антимікробної дії ЛЗ»).

Додавання нейтралізуючого агенту – перелік можливих неспецифічних нейтралізуючих агентів: натрію гідросульфід, гліцин, лецитин, полісорбат, тіогліколят, тіосульфат, іони Mg, Ca;

- специфічні інактиватори: β -лактамаза (пеніциліназа) – для β -лактамних антибіотиків (пеніцилінів, цефалоспоринов, карбапенемів і монобактами), параамінобензойна кислота – для сульфаніламідів та інші.

- необхідно підтвердити ефективність і відсутність токсичної дії нейтралізуючих агентів на мікроорганізми в випробуваннях без випробуваного продукту;

- проведення випробування, облік та інтерпретація результатів – аналогічне перевірці наявності антимікробної дії.

Якщо на агаризованому живильному середовищі для виявлення бактерій виявляються колонії грибів, вони розраховуються як частина загальної кількості аеробів (ЗКА). Якщо на агаризованому живильному середовищі для виявлення грибів виявляється зростання колоній бактерій, вони розраховуються як загальна кількість грибів (ЗКГ).

Визначення мікробіологічної чистоти: випробування на наявність специфічних мікроорганізмів

Приклад: виявлення *Escherichia coli* (метод чашкового підрахунку)

1. Зразок готують аналогічно як і для виявлення ЗКА і ЗКГ.
2. Випробуванню піддають кількість, еквівалентну 1 г або 1 мл продукту
3. Інокують потрібну кількість бульйону на основі гідролізату казеїну і соєвих бобів, перемішують, інкубують при температурі 30-35°C протягом 18-24 год.
4. Струшують контейнер, переносять 1 мл зразка, отриманого при виконанні п.3, в 100 мл бульйону Макконкі та інкубують при температурі 42-44°C протягом 24 – 48 год.

5. Пересівають підходящу кількість зразка, отриманого при виконанні п.4, на чашки з агаром Макконкі і інкубують при температурі 30-35°C в протягом 18-72 год. – індикація

6. Інтерпретують результати: зростання характерних колоній свідчить про можливу присутність *Escherichia coli*. Результат підтверджується ідентифікаційними випробуваннями.

7. Продукт витримує випробування, якщо подібні колонії не виявляються або випробування ідентифікації дають негативний результат.

ДЖЕРЕЛА ТА ЛІТЕРАТУРА

1. Верещага, В. М., Адоньєв Є.О., Павленко О.М. Спосіб згортання (розгортання) чарунок // Сучасні проблеми моделювання. – 2016. – №. 7. – С. 32–38.

2. Верещага В.М., Конопацький Є.В., Павленко О.М. Визначення площі, обмеженої топографічною замкненою плоскою кривою // Науковий журнал: комп'ютерно-інтегровані технології: освіта, наука, виробництво. – 2015.

3. Голынкин В.А., Заикина Н.А., Кочеровец В.И. Питательные среды, для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов: Справочник / Под ред. В.А. Голынкина и В.И. Кочеровца.-СПб.: Проспект науки, 2006.- с.336.

4. Sutton S. How do you decide which Microbial Identification System is best? / S.Sutton // Pharm.-Microbiology Forum Newsletter.-2007.- Vol.13 (1).-P. 4-14.

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

1. Павленко Олександр Михайлович – кандидат технічних наук, старший викладач кафедри ботаніки та садово-паркового господарства Мелітопольського державного педагогічного університету імені Богдана Хмельницького;

тел.0673482971; alexander8944@gmail.com; сертифікат: ТАК; про конференцію дізнався з особистого запрошення.

2. Павленко Лариса Львівна – викладач організації та економіки фармації Мелітопольського медичного коледжу; тел. 0965669070; сертифікат: ТАК; про конференцію дізналася від колег.

3. Павленко Михайло Григорович – лікар-хірург вищої категорії, викладач хірургії Мелітопольського медичного коледжу; тел. 0677049206; mgpavlenko59@ukr.net; сертифікат: ТАК; про конференцію дізнався від колег.

4. Павленко Ірина Андріївна – викладач біології і екології, хімії Мелітопольського вищого професійного училища; тел. 0975184359; klimyshka2903@gmail.com; сертифікат: ТАК; про конференцію дізналася від колег.