


ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Кафедра технології ліків

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
 (Борисюк І.Ю.)
« 27 » серпня 2021 р

МЕТОДИЧНА РОЗРОБКА ПРАКТИЧНОГО ЗАНЯТТЯ

Факультет фармацевтичний


Навчальна дисципліна «Розробка лікарських засобів»

Практичне заняття № 5. Тема: «**Методи мікробіологічного контролю лікарських засобів.**

для аспірантів

Практичне заняття розробив:

асистент

 (Молодан Ю.О.)

Практичне заняття обговорено на
методичній нараді кафедри

«27» серпня 2021 р.

Протокол № 1

Одеса 2021

Практичне заняття № 5

Тема: «Методи мікробіологічного контролю лікарських засобів.

Мета: ознайомитися з сучасними методами мікробіологічного контролю лікарських засобів, орієнтуватися в сучасних етапах мікробіологічного контролю лікарських засобів, розширити свої знання мікробіологічної чистоті лікарських засобів, узагальнити знання про поняття стерильності і асептичності при виготовленні лікарських засобів.

Основні поняття: антитіла, апірогенність, асептика, асептичні лікарські форми, мікробна контамінація, ендотоксини, нестерильні лікарські засоби, пірогени або пірогенні речовини, стерильність, стерильні (безмікробні) лікарські форми.

Обладнання: чашки Петрі, аналізатор ІФА, фотометричний лабораторний посуд, фільтри, пробірки, стерильні циліндри, стерилізатори, автоклав тощо.

Навчальний час: 8 год.

I. План практичного заняття

- Характеристика мікробіологічного контролю лікарських засобів.
- Поняття біотестування. Основні етапи біотестування ТТГ.
- Методи стандартизації ферментних препаратів.
- Характеристика впливу мікроорганізмів на якість лікарських засобів.
- Характеристика понять мікробна чистота та стерильність. Дослідження на стерильність. Характеристика основних поживних середовищ.
- Дослідження на мікробіологічну чистоту. Кількісне визначення мікроорганізмів. Характеристика антимікробіологічної активності антибіотиків методом в агар.
- Мікрофлора готових лікарських форм. Мікрофлору нестерильних лікарських форм. Шляхи підвищення мікробної чистоти нестерильних ЛЗ. Стерильні і асептичні лікарські форми.
- Основні фази процесу належної розробки мікробіологічних методик.

Основні завдання практичного заняття:

- поглиблення та уточнення знань, здобутих на лекціях та в процесі самостійної роботи;
- формування навичок і вмінь планування, аналізу й узагальнень, опанування навичок організації професійної діяльності;
- накопичення знань стосовно основних методик мікробіологічного контролю лікарських засобів, мікробіологічної чистоті лікарських засобів, дізнатися про поняття стерильності і асептичності при виготовленні лікарських засобів.

II. Питання для перевірки базових знань за темою практичного заняття

1. В чому полягає сутність мікробіологічного контролю лікарських засобів?
2. Охарактеризуйте поняття «біотестування». Назвіть основні етапи біотестування ТТГ.
7. Дайте характеристику впливу мікроорганізмів на якість лікарських засобів.
8. Які поживні середовища вам відомі? З якою метою їх використовують?
9. Дайте коротку характеристику поняттю «стерильність». Які дослідження на стерильність вам відомі?
10. Які дослідження на мікробіологічну чистоту ви знаєте? В чому сутність кількісного визначення мікроорганізмів. Охарактеризуйте метод антимікробіологічної активності антибіотиків методом в агар.
11. Мікрофлора готових лікарських форм. Мікрофлора нестерильних лікарських форм. Які шляхи підвищення мікробної чистоти нестерильних лікарських засобів вам відомі? Охарактеризуйте стерильні і асептичні лікарські форми.
12. Дайте характеристику основним фазам процесу належної розробки мікробіологічних методик.

Рівень мікробної контамінації препарату залежить від типу дії (бактеріостатичний, бактерицидний), потрапляння в нього мікробів з набутою стійкістю, наявності у складі речовин, що знижують антимікробну дію препарату. Контамінація лікарських препаратів патогенними або умовно-патогенними мікроорганізмами може призвести до розвитку «лікарської» інфекції, що було зареєстровано в ряді країн світу. Описані випадки захворювання очей внаслідок застосування лікарських препаратів (гідрокортизонова мазь), забруднених бактеріями роду *Pseudomonas*; епідемії сальмонельозу внаслідок споживання пігулок, виготовлених на основі забрудненого екстракту щитоподібної залози; правця - у дитини внаслідок застосування тальку; випадки легневих і шкірних інфекцій, викликаних контамінованими мікроорганізмами лікарських препаратів. Найчастіше в ліках, що викликали захворювання, виявляли ентеробактерії, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*.

Ознаками наявності мікроорганізмів можуть бути поява осаду, каламуті, плівки, газоутворення в рідких лікарських формах, зміни кольору внаслідок окиснення або утворення пігментів. На твердих лікарських формах можуть з'явитися колонії бактерій і грибів. Мікроорганізми можуть викликати зміну консистенції речовин, смакових властивостей, запаху ліків. Основні джерела мікробної контамінації лікарських препаратів можна розділити на екзогенні та ендогенні. При екзогенній контамінації мікроорганізми проникають у препарат унаслідок забруднення виробничих приміщень, повітря, обладнання, інвентаря й технологічного одягу, а також у разі недотримання особистої гігієни персоналом, безпосередньо зайнятим у технологічному процесі. Внаслідок екзогенної контамінації у препарат може проникнути 60–80% мікроорганізмів, які знаходяться у виробничому оточенні. Основними джерелами ендогенної контамінації є сировина (діючі та допоміжні речовини), вода і первинна упаковка. Причиною мікробної

контамінації найчастіше є сировина природного походження, напр. желатин, крохмаль, цукор, тальк, пепсин, панкреатин та ін. Менш забруднені мікроорганізмами синтетичні речовини, хоча серед них є й дуже контаміновані. Так, високомолекулярні жирні кислоти можуть служити субстратом і стимулювати ріст бактерій. Для дріжджів роду кандиди, деяких молочнокислих бактерій і псевдомонад олеїнова кислота є важливим чинником росту. При аналізі даних підприємств, що виробляють ліки, виявляється чіткий взаємозв'язок їх мікробної контамінації з умовами виробництва, використанням забрудненої сировини, допоміжних речовин і матеріалів, умовами зберігання. Зміни фізико-хімічних, біологічних і органолептичних властивостей можливі лише при високому забрудненні сировини, висушуванні напівфабрикатів при температурі від 20-40 °С, а також при неправильних умовах зберігання. При порушенні режимів зберігання й транспортування (підвищена вологість, температура 25–30 °С) навіть невелика кількість мікроорганізмів, якщо вони розмножуються, може бути причиною псування фармацевтичного продукту. Час розмноження мікроорганізмів при сприятливих умовах становить близько 20 хв, так що одна клітина за добу може дати потомство $1 \cdot 10^{18}$ клітин.

Вміст мікроорганізмів у сировині залежить значною мірою від його походження, способу й умов виробництва, особливо якщо при цьому мав місце контакт із повітрям і водою. Вода з низькою електропровідністю (дистильована або деіонізована) може бути чистою з хімічної точки зору, але представляти велику мікробіологічну небезпеку, тому що може адсорбувати мікроби з насосів, водопровідних труб тощо. Деякі грамнегативні бактерії можуть розмножуватися у воді, призначеній для виготовлення ліків для ін'єкцій, виділяючи токсичні ліпосахариди, пірогени, які зберігаються після стерилізації й викликають пірогенні реакції при ін'єкції. Тому вода має регулярно підлягати мікробіологічному контролю. Водорозподільні установки повинні утримуватися в чистоті й періодично дезінфікуватися, насамперед у місцях з'єднання, вигинах, кранах.

Лікарські трави й інша рослинна лікарська сировина, свіжа й висушена, містять різні види мікроорганізмів. У висушеному стані вона має велику гігроскопічність і притягає вологу, внаслідок чого є сприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів, особливо цвілевих грибів. Збір і умови сушіння рослинна лікарська сировина також суттєво впливають на її мікробіологічну чистоту, активність і визначають придатність для подальшого використання. Внаслідок розвитку мікроорганізмів якість рослинна лікарська сировина знижується. Наприклад, виявлене різке зниження активності наперстянки, конвалії під впливом цвілевих грибів в умовах підвищення вологості. Установлено зменшення діючих речовин у рослинній лікарській сировині під впливом не тільки фітопатогенних, але й сапрофітних бактерій. Унаслідок розмноження мікроорганізмів рослинна лікарська сировина може бути потенційно небезпечною, непридатною для виготовлення лікарських препаратів.

ВООЗ та Міжнародною федерацією фармацевтів було рекомендовано ввести мікробіологічний контроль лікарських препаратів у національні фармакопеї. Згідно із запропонованою схемою аналізу в лікарських препаратах слід визначати загальну кількість життєздатних бактерій і грибів та виявляти деякі види патогенних мікроорганізмів, наявність яких у ліках неприпустима. Дослідження проводять в асептичних умовах з використанням наведених у ДФ XI вип. 2 методів (методу глибинного або поверхневого висівання на чашки Петрі або метод мембранної фільтрації) і живильних середовищ для контролю всіх видів лікарських препаратів, а також сировини, яка використовується при їх виробництві.

Відповідно до категорії препарату визначені кількісні нормативи, які характеризують рівень мікробної контамінації лікарських препаратів:

1-ша категорія - препарати, відносно яких висуваються вимоги щодо стерильності відповідно до загальних статей на лікарських препаратів (парентеральні, офтальмологічні; для введення у порожнини тіла, де в нормальному стані відсутні мікроорганізми) та інші, марковані як стерильні, повинні бути стерильними;

2-га категорія - препарати для місцевого, трансдермального, інтравагінального застосування, для введення у порожнини вуха, носа і застосування у ротовій порожнині, ліки для інгаляцій (за винятком тих, до яких висуваються вимоги щодо стерильності) - в 1 г (мл) цих препаратів загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів повинна бути не більше 10^2 ;

3-тя категорія - препарати для орального застосування й ректального введення - в 1 г (мл) загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів повинна бути не більше 10^3 бактерій і 10^2 грибів (пліснявих і дріжджових сумарно). Якщо до складу препарату входять речовини рослинного і тваринного походження, які неможливо піддати деконтамінації, то загальна кількість життєздатних мікроорганізмів може бути збільшена до 10^4 ;

4-та категорія - препарати, що складаються лише з рослинних компонентів - в 1 г (мл) загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів повинна бути не більше 10^7 бактерій і 10^5 грибів (пліснявих і дріжджових сумарно).

Визначені також кількісні нормативи, які характеризують рівень мікробної контамінації допоміжних речовин. Допоміжні речовини за ступенем мікробної контамінації запропоновано розділити на три категорії: до першої належать допоміжні речовини, що містять не більше $1 \cdot 10^2$ життєздатних мікроорганізмів, у т.ч. грибів, в 1 г (мл); до другої - не більше $1 \cdot 10^3$ життєздатних мікроорганізмів, у т.ч. не більше $1 \cdot 10^2$ грибів в 1 г (мл); до третьої - не більше $1 \cdot 10^4$ життєздатних мікроорганізмів, у т.ч. не більше $1 \cdot 10^2$ грибів в 1 г (мл). ЛП і допоміжні речовини не повинні містити бактерій родин *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*. Однак на сьогодні не існує єдиних для всіх країн вимог щодо припустимого рівня мікробної контамінації ліків, а тому в національних фармакопеях у показнику «мікробіологічна чистота» є суттєві відмінності. Для забезпечення якості лікарських препаратів, у т.ч. мікробіологічної чистоти,

необхідне виконання правил GMP, які передбачають систему заходів щодо профілактики можливих відхилень у процесі виробництва. Ці правила спрямовані на виявлення та усунення тих несприятливих виробничих умов, які можуть призвести до виготовлення неякісної продукції.

В останні роки на зміну біотестам *in vivo* на лабораторних тваринах приходять методи біотестування *in vitro* з використанням антитіл, тканин-мішеней, іммобілізованих клітин-мішеней.

Кількісне та якісне визначення гормонів може ґрунтуватися як на структурних, так і на функціональних особливостях їх молекул. Залежно від цього відокремлюють 2 основні групи методів.

До першої групи відносять методи визначення та розпізнання різних молекулярних форм гормонів. їх називають структурно-специфічними, оскільки вони засновані на специфічності зв'язування з антитілами, експериментально ідукованими до певної молекулярної конформації будь-якого гормону. До методів, заснованих на аналізі взаємодії гормон-антитіло, відносять найбільш відомих і широко поширених метод радіоіммунологічного аналізу (РІА) і імуноферментний аналіз (ІФА). Обидва методи забезпечують високу специфічність і чутливість.

Для проведення РІА гормонів, а також інших ліків або токсичних речовин необхідно мати радіоактивно мічене досліджуване з'єднання і суміш сироваткових гамма-глобулінів, що містять антитіла до цього з'єднання.

Антитіла - це білки, синтезовані зрілими формами В-лімфоцитів (В-клітинами), які виникають при диференціюванні стовбурових клітин в кістковому мозку. Антитіла забезпечують високу специфічність радіоіммунологічного методу, висока ж чутливість забезпечується використанням радіоактивного антигену.

Імуноферментні методи аналізу мають високу чутливість за рахунок застосування не радіоактивності, а ферментів. Специфічність також обумовлена застосуванням антитіл. Фермент використовується для утворення з'єднання, яке можна визначити в дуже малих кількостях, використовуючи, наприклад, чутливий метод флуоресцентного аналізу.

До другої групи відносять функціонально специфічні методи (або біотести) визначення біологічної активності гормонів. Вони засновані на зіставленні дії гормонів на фізіологічні функції органів або клітин-мішеней. Завдяки функціональній специфічності відповіді тканини-мішеней, вона буде «впізнавати» тільки молекули, що володіють по відношенню до неї певною біологічною активністю, в той час як інші молекули, навіть з дуже схожою структурною, жодної

відповіді не в клітка-мішенях не викличуть і, отже, не будуть визначені за допомогою даного біотесту.

Необхідно відзначити, що величина специфічного відповіді клітинній культурі на дію гормону пропорційна кількості зайнятих рецепторів клітинної поверхні і тому залежить від концентрації біологічно активної речовини в пробі, дії якого піддають тканину-мішень. На практиці при біотестуванні порівнюють величини відповіді тканини-мішені після інкубації з тестованим і контрольним (стандартним) розчинами.

Прикладом практичного застосування методу є розроблений в лабораторії Стефана Бідея (США) метод біотестування тиреопропного гормону (ТТГ) за допомогою іммобілізованих клітин щитовидної залози людини. Ці експерименти дозволили отримати стандартний препарат бичачого ТТГ в якості альтернативного «вторинного стандартного препарату» по відношенню до менш доступним препаратам ТТГ людини в рутинних лабораторних біотестах.

Основні етапи біотестування ТТГ:

1. *Виділення з тканини щитовидної залози, отриманої при тиреєктомії, життєздатних фолікулярних клітин.* Ізольовані клітини отримують, піддаючи подрібнені і промиті зразки тканини ферментативному диспергуванню за допомогою трипсину в спеціальній колб, клітини осідають центрифугуванням, промивають сольовим розчином і оцінюють їх життєздатність за допомогою гемоцітомера під мікроскопом.
2. *Іммобілізація клітин у вигляді моношарів.* Як приклад медичного застосування досягнення біотехнології можна привести іммобілізацію клітин щитовидної залози для визначення тиреотропного гормону в біологічних рідинах або тканинних екстрактах.
3. *Оцінка активності тестованих препаратів.* Здатність препаратів стимулюють накопичення внутрішньоклітинного ц-АМФ в первинних моношарових культурах фолікулярних клітин щитовидної залози порівнюється зі стандартним препаратом (стандарт – Test International Reference Preparation № 68/3 з активністю 150 ЕД на ампулу). Вимірюють ц-АМФ методом, заснованим на використанні антитіл, специфічних до ц-АМФ. По даним про накопичення внутріклітинного ц-АМФ при дії стандартного та тестованого препарату будують залежності «доза-відповідь» та розраховують активність тестуємого препарату.

Іммобілізовані ферменти знайшли своє застосування в автоматичному аналізі біологічних субстратів і лікарських засобів.

Дуже часто ферментативна активність партії готового препарату помітно відрізняється від попередніх. Споживач же повинен отримувати препарат з певною

стор.7

стандартною активністю. Тому на основі тривалого аналізу практичної роботи підприємств за даною технологією для кожного виробленого препарату встановлюється середній рівень активності з запасом 20 - 30%. Активність стандартного препарату визначається в одиницях ФА на 1 м. Для отримання постійної активності в препарати вводиться наповнювач в певній кількості, яке залежить від отриманої на даному підприємстві активності в культурі і препараті. Бажано, щоб наповнювач по відношенню до ферменту виступав і в ролі стабілізатора, а не просто інертного з'єднання. Важливо також враховувати властивість наповнювачів відсорбувати водяні пари. Так, наприклад, крохмаль, доданий до ферментному препарату, перешкоджає його зволоженню, а хлористі солі калію і натрію сприяють зволоженню препаратів, тому при використанні останніх виникає необхідність в герметичній упаковці препаратів.

Стандартизацію препарату можна проводити, додаючи наповнювач, наприклад, перед концентруванням, якщо продукт випускається в рідкому вигляді, або ж перед сушінням розпиленням з урахуванням втрат на стадії концентрування або при розпилювальної сушки, або в уже готовий сухий препарат. При змішуванні готового сухого препарату з наповнювачем необхідно, щоб препарат і наповнювач мали приблизно одну і ту ж ступінь подрібнення і вологість не більше 10 - 12%. При перемішуванні наповнювача і препарату, наприклад, в кульової млині за 30 - 40 хв виходять цілком однорідні ферментні препарати.

Сучасний арсенал лікарських засобів включає великий асортимент препаратів, у тому числі і рослинного походження. При цьому технологія їх виробництва далеко не завжди гарантує повну мікробну чистоту. Мікробна контамінація лікарської сировини порушує її стабільність, а іноді і властивості, призводить до зменшення вмісту корисних компонентів і одночасно сприяє накопиченню токсичних речовин, що може спричинити захворювання у людини. Одним з найважливіших джерел інфікування лікарської рослинної сировини є власна мікрофлора рослин. Крім того, існує ціла група так званих фітопатогенних мікроорганізмів, які спричиняють хвороби рослин і псування лікарської рослинної сировини, що призводить до неможливості її використання і економічних втрат.

Мікробна контамінація лікарських засобів і способи її зниження

Забруднення (контамінація) мікроорганізмами лікарський препарат представляє собою небезпеку для хворого.

В процесі еволюції організм дорослої людини за допомогою різних систем пристосувався до захисту від мікрофлори (лущення епідермісу, кисле середовище шлунка, лізоцим в слізній рідині і т.п.), але найбільш важливі органи і біологічні рідини (мозок, серце, кров, спинномозкова рідина) завжди залишаються стерильними. Захисні механізми новонародженого недосконалі, а у хворої людини ослаблені, тому різко зростає небезпека інфікування при застосуванні нестерильних зовнішніх лікарських форм (мазей, масел та інше). Велика небезпека інфікування

організму і при введенні ін'єкційних розчинів, при лікуванні травм, опіків, обморожень.

Мікроорганізми, що містяться в лікарській формі, можуть викликати розкладання діючих та допоміжних речовин. Це призводить до втрати терапевтичного ефекту препарату, зміни зовнішнього вигляду лікарської форми, іноді до утворення токсичних продуктів. На відміну від патогенних мікроорганізмів багато сапрофітів володіють великим набором ферментів і здатні розкласти найрізноманітніші речовини, білки, ліпіди та інші.

Інтенсивність руйнування лікарських форм і речовин залежить від їх концентрації, вологості, температури навколишнього повітря, а так само природи і ступеня початкової контамінації. Важливе значення має і термін зберігання лікарських препаратів.

Джерелами мікробного забруднення лікарських засобів (в аптеці та в заводських умовах можуть бути:

- Повітря приміщень. Відомо, що 1 л повітря в великому місті містить від 1 тис. до 1 млн. різних частинок, які є носіями мікрофлори - один мікроорганізм доводиться на 1000 зважених часток.
- Вихідні лікарські та допоміжні речовини тваринного, рослинного і синтетичного походження (наприклад, сильно контаміновані - панкреатин, пепсин, глюкоза, тальк, крохмаль, агар та інші).
- Дисперсійні середовища, в тому числі вода очищена, мікробна контамінація якої відбувається при транспортуванні, зберіганні.
- Допоміжні матеріали (фільтруючі - вата, папір, марля; пакувальні - папір, флакони, банки, коробки, пробки);
- Людина. У спокійному стані людина в 1 хв виділяє до 200 тис. різних частинок (лусочки, клітини епідермісу і інше), при русі - до 1 млн., тому присутність в торговому залі аптеки значної кількості відвідувачів, занос ззовні пилу, бруду призводить до збільшення в повітрі мікрофлори, проникаючої і в виробничі приміщення.
- Персонал аптеки. Навіть в спеціальному одязі в чистих приміщеннях в навколишнє середовище співробітники виділяють до 2 млн. часток розміром від 0,5 мкм до 5 мкм, 300 тис. частинок розміром 5 мкм і більше 160 частинок, на яких знаходяться мікроорганізми.
- Джерела забруднення в основному є рот і ніс. При розмові кількість частинок, що виділяються людиною, зростає;
- Технологічний процес (обладнання, прилади, апарати тощо).

Виділяють чотири категорії мікробіологічної чистоти лікарських форм і препаратів:

- ін'єкційні, інфузійні, очні лікарські форми, препарати, що вводяться в стерильні порожнини тілі, на відкриті рани, опіки, стерильні препарати для новонароджених;
- препарати, що застосовуються місцево, трансдермально, інтервагінально, для інгаляцій і вводяться в порожнини вуха, носа;
- лікарські форми для прийому всередину;
- препарати для ректального введення.

Нестерильні лікарські засоби (субстанції, різні форми препаратів - таблетки, капсули, гранули, розчини, суспензії, сиропи, мазі, супозиторії та інші) можуть бути контаміновані мікроорганізмами. У них допускається наявність лімітованої кількості мікроорганізмів, при відсутності певних видів бактерій, які становлять небезпеку для здоров'я людини.

Існують різні категорії лікарських препаратів, відповідно до яких пред'явлені вимоги мікробіологічної чистоти, наприклад: по ОФС 42-0067-07 XII ДФ представлені в табл. 1.

Таблиця 1. Різні категорії лікарських препаратів, відповідно до яких пред'явлені вимоги до мікробіологічної чистоти

Препарати, до яких ставиться вимога «стерильність»	Препарати повинні бути стерильними
Для застосування місцево, зовнішньо, вагінально	Загальна кількість аеробних бактерій і грибів (сумарно) не більше 100 в 1 г або в 1 мл, або на 1 пластир (включаючи клейку сторону і основу).
Для введення в порожнині вуха, носа	Відсутність ентеробактерій та інших грамнегативних бактерій на 1 пластир (включаючи клейку сторону і основу).
Респираторно	Не більше 10 ентеробактерій та інших грамнегативних бактерій в 1 г або в 1 мл інших препаратів.
Трансдермальні пластирі	Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1г або в 1 мл, або на 1 пластир (включаючи клейку сторону і основу). Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г або в 1 мл, або на 1 пластир (включаючи клейку сторону і основу).

Визначення мікробної контамінації лікарських засобів

Згідно з вимогами ВООЗ та Державної Фармакопеї України існують певні нормативи, що обмежують мікробну контамінацію лікарських препаратів. Для виявлення мікроорганізмів в лікарських препаратах використовують методи мікробіологічного аналізу. Зазвичай визначають кількість мікроорганізмів в 1 г сухого препарату або в 1 мл розчину. Методики мікробіологічного аналізу конкретної лікарської форми індивідуальні. Це пов'язано з бактерицидною та бактериостатичною дією самих препаратів, а також з чутливістю або резистентністю мікроорганізмів до даного лікарського засобу.

Мікробіологічна чистота лікарських засобів, субстанцій та допоміжних матеріалів для виробництва лікарських засобів повинна відповідати вимогам, викладеними в Настанові МОЗУ 42-3.1:2004 «Лікарські засоби. Настанови з якості. Фармацевтична розробка».

Термін «стерильність» означає відсутність в препараті життєздатних мікроорганізмів будь-якого виду. Випробування на стерильність вперше було запропоновано для вакцин, токсинів, сироваток, адреналіну, інсуліну. У 1930-х рр. випробування на стерильність було введено в фармакопеї Великобританії і США.

Стерильність лікарських засобів досягається дотриманням необхідних санітарно-гігієнічних умов їх виготовлення і режиму стерилізації.

Для стерильних лікарських форм наявність мікроорганізмів, навіть в малому кількості, може стати летальним, враховуючи безперешкодне потрапляння мікроорганізмів в кров або на слизові оболонки організму, при умови ослабленого імунітету людини. Вперше тест на визначення стерильності лікарських засобів був внесений до фармакопеї Великобританії і США в 1932 і 1936 роках відповідно.

Мета випробування на стерильність - підтвердження повної відсутності життєздатних бактерій і грибів в випробуваному об'єкті (АФІ, ЛС).

Випробування застосовується для препаратів, які повинні бути стерильні:

- ЛЗ для парентерального застосування (розчини, ліпофільно висушені і стерильно розфасовані порошки для ін'єкцій та інфузій).
- Офтальмологічні ЛЗ.
- Розчини антисептиків для зовнішнього застосування.
- Мазі, гелі для зовнішнього застосування (для нанесення на поверхню рани).
- АФІ, призначені для виробництва лікарських засобів в формі стерильно розфасованих порошків і інші.

Однак, задовільний результат випробування свідчить лише про те, що в умовах випробування в випробуваному зразку не виявлено мікроорганізмів. Для стерильних продуктів обґрунтовані і документовані фактичні докази правильного

протікання процесу їх приготування дають велику гарантію в порівнянні з випробуванням на стерильність.

Умови для проведення випробування по визначенню стерильності:

- Випробування на стерильність повинні проводитися в тих же умовах, що і асептичне виробництво: при використанні ламінар-боксів з ламінарним потоком повітря класу А, розташованим в чистому приміщенні класу В, або з допомогою ізолятора.
- Підготовка повітря, що подається в чисте приміщення, за допомогою НЕРА-фільтрів (НЕРА – High Efficiency Particulate Absorption – високоефективна затримка частинок). Ці фільтри служать для практично повного очищення повітря навіть від самих найдрібніших частинок, аж до 0.1 мкм.
- Доступ до приміщення повинен бути організований через повітряні шлюзи - конструкції з односпрямованим односторонніми шляхами проходження. Повітряний шлюз запобігає переміщення повітря між приміщеннями. Коли все двері повітряного шлюзу закриті, подавання в нього повітря розбавляє забруднення, що надійшло з зовнішнього коридору через двері, або виділяються присутнім персоналом.

Випробувана продукція повинна подаватися через передавальні вікна.

- Виконавці повинні бути переодягнені в стерильний одяг.
- Виконавці повинні пройти відповідну підготовку.
- Запобіжні заходи, прийняті проти контамінації, що не повинні впливати ні на один з мікроорганізмів, які можуть бути виявлені в ході випробування.
- Умови, в яких проводяться випробування, повинні регулярно контролюватися шляхом відбору проб повітря і поверхонь робочої зони.

Методи визначення стерильності:

1. Мембранна фільтрація – найбільш кращий метод, якщо випробуваний препарат фільтрується;
2. Метод прямого посіву.

Прямий посів:

А) Переваги:

- швидкий, простий, економічний;
- нефільтровані зразки.

Б) Обмеження:

- обмежений обсяг зразка: низька чутливість;
- проблеми з антимікробною дією.

Мембранна Фільтрація:

1. Переваги:

- можливість ефективного усунення антимікробної дії;
- висока надійність виявлення нестерильності антимікробних препаратів через відсутність розведення, що має місце при усуненні антимікробної дії;
- можливість фільтрування великого обсягу;
- статистично більш достовірний;
- більш чутливий: висока ефективність виявлення мікробної контамінації при низькій концентрації клітин в одиниці зразка завдяки можливості концентрування або утримання на мембрані навіть поодиноких клітин (1 КУО на зразок).

2. Обмеження:

- нефільтровані зразки, закупорювання мембрани.

Для випробування стерильності використовують рідкі середовища тіогліколеве, соєво-казеїнове або Сабуро. Тіогліколеве середовище застосовують для виявлення аеробних і анаеробних бактерій. Рідке соєво-казеїнове середовище для виявлення грибів і аеробних бактерій. Рідке середовище Сабуро використовують для виявлення грибів.

При випробуванні на стерильність ЛП не рекомендується використовувати рідку середу Сабуро. При випробуванні на стерильність ЛП, в тому числі, що містять ртутні консерванти, допустимо використання тільки тіогліколевого середовища в якості універсального для виявлення аеробних і анаеробних бактерій і грибів (за умови попереднього визначення його ростових і нейтралізуючих властивостей з використанням тест-мікроорганізмів). Інкубацію посівів здійснюють при двох температурних режимах.

Живильні середовища готують в лабораторії, використовуючи сухі поживні середовища промислового виробництва або окремі компоненти. Допускається застосування середовищ, готових до використання, з сертифікатом виробника. Приготовлені в лабораторії поживні середовища перевіряють на стерильність і визначають їх ростові властивості. Живильні середовища і рідини для промивання

фільтрів стерилізують в автоклаві при температурі 121°C протягом 15 хв, якщо немає інших вказівок в фармакопейній статті або нормативної документації.

Лікарські засоби (таблетки, капсули, гранули, розчини, екстракти, сиропи мазі і т.п.), що не стерилізуються в процесі виробництва, можуть бути контаміновані мікроорганізмами і тому повинні бути випробувані на мікробіологічну чистоту. Випробування на *мікробіологічну чистоту* включає кількісне визначення життєздатних бактерій і грибів, а також виявлення певних видів мікроорганізмів, наявність яких недопустимо в нестерильних лікарських засобах. Для уникнення неправильної оцінки результатів випробування визначають дію лікарського засобу по відношенні до тест-мікроорганізмів: *Bacillus subtilis* (*B. cereus*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* і т.п.

Визначення антимікробної дії лікарського засобу. П'ять зразків лікарського засобу по 1 г (мл) кожен розводять 1:10 фосфатним буферним розчином рН 7,0 (2 зразки), середовищем № 3 (один зразок) і середовищем № 8 (2 зразки). Культури *Bacillus subtilis* (*B. cereus*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* вирощують на рідкому середовищі № 1 при температурі від 30 до 35° С протягом 18-20 годин, *Candida albicans* - на рідкому середовищі № 2 при температурі від 20 до 25° С протягом 48 годин. Культури розводять 1:1000 стерильним 0,9 % розчином натрію хлориду ізотонічним, вносять по 1 мл суспензії кожного тест-штаму (окремо) в приготовані зразки лікарського засобу в буферному розчині (*Bacillus subtilis*, *Candida albicans*), у середовищі № 3 (*Escherichia coli*) і в середовищі № 8 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*). У разі відсутності росту тест-штамів на відповідних поживних середовищах відзначають **антимікробну дію лікарського засобу.**

Для усунення антимікробної дії лікарського засобу використовують різні методи: 1) збільшують розведення ЛЗ, взявши великий обсяг розчинника; 2) додають необхідну кількість відповідного специфічного інактиватора, який нейтралізує антимікробну дію ЛЗ, але не пригнічує ріст мікроорганізмів (наприклад, пеніциліназа - для пеніцилінів у цефалоспоринів, пара-амінобензойну кислоту - для сульфаніламідів); 3) комбінують методи 1 і 2; 4) вводять неспецифічні інактиватори в поживні середовища, що нейтралізують антимікробну дію ЛЗ (наприклад, 4% твін-80, 0,5% соєвого лецитину); 5) якщо всі перераховані вище методи неефективні, а ЛЗ розчинено, використовують метод мембранної фільтрації; 6) якщо у зв'язку з природою ЛЗ не можна використовувати метод мембранної фільтрації, а всі перераховані вище методи усунення його антимікробної дії щодо даного тест-штаму неефективні, цей вид випробування не проводять.

Кількісне визначення мікроорганізмів

Випробування проводять двошаровим агаровим методом в чашці Петрі діаметром 90-100 мм. Зразок лікарського засобу в кількості 10 г (мл) розчиняють,

стор.14

суспензують або емульгують в фосфатному буферному розчині з рН 7,0 так, щоб об'єм розчину (суспензії, емульсії) був 100 мл. Посіви переглядають щодня.

Визначення загальної кількості бактерій. Приготовлений розчин (емульсію, суспензію) зразка вносять по 1 мл в кожну з 2-х пробірок з 4 мл розплавленого та охолодженого до температури від 45 до 50 °С середовища 1. Вміст пробірок швидко перемішують і переносять в чашку Петрі, що містять 15-20 мл застиглому живильного середовища 1. Швидким погойдуванням чашок Петрі рівномірно розподіляють верхній шар агару. Після застигання середовища чашки перевертають та інкубують протягом 5 діб при температурі від 30 до 35 °С. Через 48 годин і остаточно через 5 діб підкреслюють число бактеріальних колоній на двох чашках, знаходять середнє значення і, помножуючи його на показник розведення, обраховують число бактерій в 1 г (мл) зразка. Для отримання достовірних результатів враховують тільки ті чашки, на яких виросло від 30 до 300 колоній. Якщо при розведенні зразка 1:10 немає зростання, результати відзначають так: «в 1 г (мл) ЛЗ менше 10 бактерій». Якщо колонії перевищують 300, роблять ряд подальших послідовних розведень.

Визначення антимікробіологічної активності антибіотиків методом дифузії в агар

Визначення антимікробної активності антибіотиків засновано на їх здатності пригнічувати ріст мікроорганізмів. Визначення проводять методом дифузії в агар на щільному живильному середовищі шляхом порівняння розмірів зон пригнічення росту тест-штамів мікроорганізмів, які утворюються при випробуванні розчинів стандартного зразка і випробуваного препарату певних концентрацій. Метод заснований на логарифмічній залежності розмірів зон пригнічення росту тест-мікроорганізмів від концентрації антибіотика, яка повинні бути лінійної.

Антимікробна активність антибіотиків виражається в одиницях дії - ОД або «мкг» на одиницю об'єму препарату. Для більшості антибіотиків 1 ОД або 1 мкг відповідають 1 мкг активної речовини (кислоти або підстави); для антибіотиків, що мають інше кількісне вираження одиниці, відповідні вказівки даються в фармакопейних статтях. При визначенні антимікробної активності антибіотиків використовують стандартні зразки, активність яких, як правило, встановлюють відповідно до міжнародних біологічних стандартів. При відсутності останніх для зазначених цілей можуть бути використані хімічні стандартні зразки, антимікробну активність яких розраховують на підставі показників якості, встановлених фізико-хімічними методами. Антимікробну активність стандартних зразків антибіотиків, які не мають аналогів в міжнародній колекції стандартів, розраховують також на підставі показників якості, встановлених фізико-хімічними методами. Стандартні зразки антибіотиків зберігаються і використовуються відповідно до рекомендацій, зазначеними на етикетці стандартного зразка.

Методика дослідження

У скляні або пластмасові чашки Петрі розміром 20×100 мм або 20×90 мм, встановлені на столиках зі строго горизонтальною поверхнею, розливають розплавлені поживні середовища певного складу в 1 або 2 шари. Для нижнього шару використовують стерильні незасіяні середовища, для верхнього або одного шару - стерильне агарове середовище, попередньо засіяне відповідним тест-мікроорганізмом. Кількість посівної дози визначають дослідним шляхом, починаючи з обсягу суспензії мікроорганізмів. Оптимальна кількість посівної дози повинно бути таким, щоб діаметр зон пригнічення для мінімальної концентрації антибіотика був не менше 14 мм.

Стерильні циліндри (6 штук) єдиного розміру і маси висотою ($10,0 \pm 0,1$) мм і внутрішнім діаметром ($6,0 \pm 0,1$) мм з нержавіючої сталі або алюмінію розставляють на поверхні засіяної середовища на рівній відстані один від одного і від краю чашки. Замість циліндрів можуть бути використані лунки діаметром від 6 до 8 мм, зроблені в товщі агару за допомогою стерильного свердла, або іншого відповідного пристосування.

У циліндри або лунки кожної чашки вносять рівні об'єми робочих розчинів стандартного та досліджуваного зразків антибіотика. Основні розчини стандартних і випробуваних зразків готують в стерильних розчинниках з концентрацією 1 мг / мл. Потім з основних розчинів в залежності від застосовуваного варіанта методу дифузії в агар (трехдозного або з побудовою стандартної кривої) готують робочі розчини трьох або однієї концентрацій випробуваного зразка і розчини трьох або п'яти концентрацій стандартного зразка. Робочі розчини досліджуваних зразків готують з основних розчинів таким чином, щоб їх концентрації не мали суттєвих відмінностей від концентрацій розчину стандартного зразка.

Для зменшення впливу коливань у часі між закапуванням розчинів, використовуваних в досвіді, рекомендується після внесення витримувати їх в чашках при кімнатній температурі протягом 1-2 ч. Потім чашки інкубують при температурі (36 ± 1) ° С протягом 16-18 год.

Діаметри зон пригнічення росту тест-мікроорганізму за допомогою відповідних приладів вимірюють з точністю до 0,1 мм.

Визначення антимікробної активності антибіотиків з використанням трехдозного варіанту методу дифузії в агар. Для проведення випробування готують 3 розчина стандартного зразка (C_1, C_2, C_3) і 3 розчина випробуваного зразка (I_1, I_2, I_3). Концентрації розчинів, що мають незначну, середню і велику дози, повинні перебувати між собою в кратному співвідношенні (1:2:4). При необхідності це співвідношення може бути змінено. Концентрація розчину C_2 повинна бути близька до контрольної концентрації розчину стандартного зразка.

Всі розчини стандартного та досліджуваного зразків вносять в циліндри або лунки однієї чашки Петрі таким чином, щоб розчини з великими концентраціями не стикалися між собою. Пропонований варіант закапування: $C_1I_3C_2I_1C_3I_2$. Число чашок, використовуваних в кожному досвіді, має бути достатнім для забезпечення статистичної достовірності результатів, але не менше 6 штук.

Послідовність внесення розчинів стандартного та досліджуваного зразків в циліндри або лунки кожної чашки повинна бути наступною: першим вносять розчин з малою концентрацією стандартного зразка (C_1) і відповідний розчин випробуваного зразка (I_1), потім розчини із середньою концентрацією (C_2 і I_2), останніми вносять розчини з великими концентраціями (C_3 і I_3).

Мікробному псуванню піддаються готові лікарські форми: сухі (порошки, збори), рідкі (мікстури, настої, відвари, краплі), м'які (мазі, пасти, кульки, свічки) і стерильні ін'єкційні препарати. Ліки з високим обміненіям мікробами, особливо патогенними, можуть викликати інфекційні захворювання у людей. До фітозоонозів - інфекцій, що викликаються патогенними мікроорганізмами, загальними для теплокровних (включаючи людину) і рослин найчастіше відносять кишковий ерсініоз, лістеріоз, псевдотуберкульоз, мікотоксикози. Розмноження мікроорганізмів в готових ліках веде до зміни їх фізичних і органолептичних властивостей, появи токсичності. Мікробне обміненіям лікарських препаратів залежить від дотримання в аптеці санітарно-епідемічного режиму, що регламентується в даний час наказом МОЗ України № 139 від 14.06.1993 «Про затвердження Інструкції по санітарно-протиепідемічному режиму аптек».

Причиною мікробного обміненіям готових ліків може бути мікробне забруднення рослинної лікарської сировини, повітря виробничих приміщень, устаткування, посуду, води, що дистилує, рук персоналу.

Ін'єкційні препарати, очні краплі і мазі, препарати для новонароджених повинні бути стерильними. У ряді випадків ін'єкційні засоби, залишаючись стерильними, володіють *пірогенними* властивостями. Пірогенна реакція організму людини, що виникає за рахунок застосування ліків, характеризується підвищенням температури, вазомоторними розладами, у важких випадках - шоковим станом. Пірогенні речовини (пірогени), що є *ендотоксинами* (переважно *грамнегативних бактерій*), не інактивуються при кип'ятінні, для їх руйнування необхідне автоклавування протягом 3 год.

Причиною пірогенності лікарських препаратів (поява ендотоксинів і в результаті - пірогенності) є мікробне забруднення води, що дистилується, порушення асептики технологічного процесу, збільшення часу між приготуванням розчину і стерилізацією. З рідких ін'єкційних лікарських форм найлегше обміненіям мікробами настої і відвари; при їх зберіганні з'являються ознаки псування: помутніння, зміна кольору, плівка, незвичний запах. Термін зберігання

цих препаратів обмежений. Спиртні настоянки менше схильні до псування унаслідок антимікробної дії алкоголю.

Сухі порошкоподібні речовини, особливо тальк і крохмаль, м'які лікарські форми також схильні до мікробного забруднення. Їх мікробне псування носить осередковий характер і виявляється зміною кольору і консистенції речовини.

Мікробний склад готових ліків може бути представлений наступними групами:

- цвілеві і дріжджові гриби - *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*;
- коки - сарцини, стафілококи;
- спороносні паличкоподібні бактерії - *B. subtilis*, *B. mesentericus*.

Попередження мікробного псування готових лікарських речовин можливе при дотриманні умов, що знижують їх мікробне забруднення: дотримання правил особистої гігієни, якісне знезараження повітря аптечних приміщень, правильна обробка посуду, устаткування, при необхідності (стерильні ліки) - асептичне виготовлення.

Мікрофлора нестерильних лікарських форм

Нестерильними називаються лікарські форми, в яких допускається вміст певної кількості непатогенних мікробів.

Основні лікарські форми: настої, настоянки, порошки, пігулки, мазі, краплі і ін.

Ознаки псування нестерильних лікарських препаратів: зміна кольору, неприємний запах, помутніння, осад, плівка, зміна консистенції.

У рідких і м'яких лікарських формах умови для зростання і розмноження мікроорганізмів більш відповідні. Це пов'язано з високим вмістом води, рослинних масел і відсутністю консервантів у складі багатьох мазей. Більш того, вміст у складі мазей антимікробних речовин не завжди гарантує їх мікробну чистоту. У рідких лікарських формах метаболіти мікроорганізмів можуть змінити його хімічний склад, а також привести до утворення токсичних продуктів. У твердих лікарських формах ризик мікробного псування мінімальний, оскільки відсутні умови для розмноження мікробів. Висока забрудненість сировини, її неправильне зберігання може приводити до зміни властивостей.

Обсіменіння лікарської сировини може проходити на всіх етапах його заготівки і при зберіганні. Активному розмноженню мікроорганізмів сприяє зволоження рослин і рослинної сировини. Мікроорганізми, що розмножилися, приводять до зміни фармакологічних властивостей препаратів, отриманих з лікарських рослин. Мікроорганізми можуть також потрапляти з навколишнього середовища, від людей і обсіменяти лікарські препарати в процесі їх виготовлення з рослинної сировини.

Для дотримання санітарного режиму виготовлення лікарських препаратів проводиться санітарно-мікробіологічний контроль об'єктів навколишнього середовища підприємства і кожної серії лікарської форми, що випускається. Контроль стерильності лікарських засобів проводиться шляхом посіву на

тіогліколеве середовище для виявлення різних бактерій, зокрема анаеробів; при посіві на середовище Сабуро виявляють гриби, головним чином роду Кандида. Стерильність лікарських засобів з антимікробною дією визначають шляхом мембранної фільтрації: фільтр після фільтрації досліджуваного препарату ділять на частини і вносять для підрощування затриманих мікроорганізмів до рідких живильних середовищ. За відсутності росту препарат вважається стерильним.

Лікарські засоби, що не вимагають стерилізації, містять мікроорганізми, тому їх досліджують на мікробну чистоту: проводять кількісне визначення життєздатних бактерій і грибів в 1г або 1мл препарату, а також виявляють мікроорганізми (бактерії родини ентеробактерій, синегнійна паличка, золотистий стафілокок), які не повинні бути присутніми в нестерильних лікарських засобах.

У нестерильних лікарських формах визначають:

1. Мікробне число - кількість бактерій і грибів в 1 г (мл).
2. Наявність кишкової палички, золотистого стафілокока, синегнійної палички.

Норми мікробів в нестерильних лікарських формах:

1. У 1г (мл) препарату для прийому всередину не більше 1000 бактерій і 100 грибів.
2. В 1г (мл) препарату для місцевого застосування - не більше 100 мікробів, в т.ч. грибів.
3. У таблетованих препаратах не повинно бути патогенної мікрофлори, а загальне обсіменіння не повинно перевищувати 10 тис. мікробних клітин на пігулку.
4. Не допускається наявність кишкової палички, золотистого стафілокока, синегнійної палички.

Шляхи підвищення мікробної чистоти нестерильних лікарських засобів

Залежно від джерел і шляхів попадання мікроорганізмів в лікарські засоби можливі різні підходи до забезпечення необхідного рівня мікробної чистоти нестерильних лікарських засобів. Якщо мікробне обсіменіння викликане попаданням разом з сировиною, то для досягнення необхідного рівня мікробної чистоти досить очистити від мікроорганізмів сировину. Якщо обсіменіння мікробами відбувається в процесі виготовлення, то проводять деконтамінацію готової лікарської форми. Попереднього знезараження можна досягти пресуванням сипких матеріалів (за відсутності споривих мікроорганізмів, низькій вологості початкового порошку і високому тиску). На практиці застосовують чотири способи деконтамінації сировини і готових лікарських засобів.

Термічний спосіб. Широко поширений метод промислової деконтамінації. Не придатний для обробки термолабільних лікарських форм, для яких застосовують прогрівання до 60-70 °С гарячим повітрям, інфрачервоне і високочастотне випромінювання.

Хімічний спосіб. Придатніший для стерилізації світлонепроникних речовин (бактерицидна дія реалізується лише на глибині 1 мм). Найчастіше його використовують для обробки пакувального матеріалу і технологічної води.

Можлива обробка УФ-ЛУЧАМИ формоутворювальних речовин (крохмалю, тальку, цукру) в дисперсному стані (при перемішуванні).

Іонізуюче випромінювання. Найбільш перспективний спосіб деконтамінації сировини і готових лікарських форм. Іонізуюче випромінювання володіє високою проникаючою здатністю. При опромінюванні не утворюються канцерогенні, мутагенні, токсичні речовини, зберігаються фізико-хімічні і біологічні властивості оброблюваних ліків. Метод використовують для обробки антибіотиків, вітамінів, ферментів, гормонів і алкалоїдів.

Стерильні (безмікробні) лікарські форми готують в асептичних умовах і стерилізують. До них відносяться розчини для ін'єкцій, очні краплі, препарати для дітей до 1 року.

Асептичні лікарські форми готують в асептичних умовах без стерилізації. **Асептика** - попередження попадання мікробів в лікарський препарат. Асептичні і стерильні лікарські форми готують в асептичних умовах.

При дослідженні лікарських форм здійснюють визначення мікрофлори в лікарських формах:

- визначення загального мікробного числа (мікробна обсімененість);
- визначення бактерій групи кишкової палички;
- визначення дріжджових і цвілевих грибів;
- визначення умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів.

Якісне визначення умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів

1. Визначення бактерій родини *Enterobacteriaceae* (роди *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*). Посів лікарських засобів проводять на середовище Ендо і вісмут - сульфатний агар. Ідентифікацію ентеробактерій здійснюють таким чином: якщо в зразку виявлені грамнегативні неспоріві палички, що дають негативну реакцію на цитохромоксидазу, ферментують глюкозу і відновлюють нітрати в нітрити, досліджуваний препарат містить бактерії родини *Enterobacteriaceae*.

2. Визначення патогенних стафілококів. Визначення патогенних стафілококів проводять посівом на жовтково- сольовий агар. На цьому середовищі патогенні стафілококи викликають розщеплювання лецитину, що виявляється в провітлінні навколо колоній зони помутніння з веселковим віночком по периферії. Виділену чисту культуру досліджують на наявність плазмокоагулази.

3. Виявлення *Pseudomonas aeruginosa*. Здійснюють на середовищі з гліцерином. Синегнійна паличка на цьому середовищі утворює зеленуваті флуоресціюючі колонії, що виділяють в середовище синьо, - зелений пігмент.

4. Виявлення протей. Проводять посівом на МПА по Шукевичу. Наявність умовно - патогенних і патогенних мікроорганізмів в лікарських препаратах неприпустимо.

Відповідно до вимог Державної фармакопеї XI видання прийняті наступні критерії оцінки мікробної обсемененості лікарських засобів.

Основні фази процесу належної розробки мікробіологічних методик

Існують три послідовні фази процесу належної розробки мікробіологічних методик:

1. Розробка методики на зменшеній кількості зразка, розчинників, середовищ при збереженні їх певного співвідношення.
2. Масштабування методики та підтвердження її придатності на тих кількостях, котрі будуть використовуватись у рутинному контролі (проводиться на одній серії продукту).
3. Валідація методики для підтвердження придатності та відтворюваності методики незалежно від серії продукту, що вивчається, персоналу, серії середовищ та інших умов (проводиться на не менше як трьох серіях продукту з використанням трьох партій приготування поживних середовищ).

Перший етап включає в себе теоретичний аналіз властивостей лікарських засобів, визначення та вибір умов проведення досліджень, розробку методик визначення загального числа мікроорганізмів у нерозчинних ЛЗ, розробку методик визначення загального числа мікроорганізмів у розчинних лікарських засобах методом мембранної фільтрації.

Другий етап – масштабування методики та перевірка придатності. На відміну від процедур розробки методики, які дозволяють масштабування в процесі пробопідготовки лікарського засобу, при перевірці придатності методики необхідно строго дотримуватися зазначених у проекті методик (менеджменту контролю якості – МКЯ) умов: наважки препарату, об'єму розчинника для приготування проби зразка, процедур отримання його послідовних розведень тощо. Спосіб внесення тест-мікроорганізмів у пробу препарату при перевірці придатності методики має бути аналогічним способу, що використовувався при розробці методики. Проведення перевірки придатності здійснюється на одній серії лікарського засобу, належно протоколюється та може розглядатись як підготовчий етап валідації методики.

Третій етап – валідація методики – має наступні особливості. Валідація мікробіологічних методів контролю – мінімально статистично підтверджена придатність методики, яка проводиться на трьох різних серіях препарату з врахуванням усіх можливих факторів впливу на достовірність результатів експериментальних досліджень. Окрім самого лікарського засобу, на відтворюваність методики можуть впливати умови, які в ній використовуються: поживні середовища та розчини, що також можуть мати відмінності залежно від партії приготування. Тому для оцінки впливу на придатність методики можливих

змінних властивостей серій лікарських засобів і партій поживних середовищ і розчинів валідаційні дослідження проводять на трьох різних серіях препарату та трьох різних партіях поживних середовищ і розчинів. Таким чином, у процесі валідації умовно доводиться, що зазначені в методиці умови проведення досліджень з визначення мікробіологічної чистоти препарату дозволяють отримувати достовірні результати контролю якості даного лікарського засобу в цілому, незалежно від серії.

У процесі валідації перевірку придатності методики для кожної серії ЛЗ рекомендується проводити в різні дні, місяці та навіть роки, із залучанням трьох спеціалістів, для дослідження кожним із них по одній серії препарату. Час і виконавці також є змінними факторами, що певним чином впливають на відтворюваність результатів методики, але, враховуючи ситуаційні обставини, ними можна знехтувати.

Існують чотири стадії проведення валідації аналітичної методики, а саме: планування досліджень (складання протоколу досліджень), підготовки умов проведення досліджень придатності методики, дослідження придатності не менше як на трьох серіях лікарського засобу, оформлення звіту валідації. Також вона наголосила, що валідація мікробіологічних методик повинна здійснюватись згідно з чинною СОП (стандартною операційною процедурою) з валідації аналітичних методик.

III. Формування професійних вмінь, навичок: вивчити особливості мікробіологічного контролю лікарських засобів, розширити свої знання мікробіологічної чистоти лікарських препаратів, узагальнити знання про поняття стерильності і асептичності при виготовленні лікарських препаратів.

3.1. Зміст завдання практичної роботи:

Завдання 1: Дайте визначення поняттям «мікробіологічна чистота» та «контамінація».

Завдання 2: Опишіть основні джерела мікробного забруднення лікарських засобів.

Джерела мікробного забруднення	Характеристика
Повітря приміщень	
Вихідні лікарські та допоміжні речовини	
Дисперсійні середовища	
Допоміжні матеріали	
Людина	

Персонал аптеки	
Технологічний процес	

Завдання 3: Назвіть відомі вам методи визначення стерильності препаратів.

Завдання 4: Дайте визначення поняттю «живильні середовища». Охарактеризуйте їх призначення.

Завдання 5: Охарактеризуйте основні фази процесу належної розробки мікробіологічних методик.

Фаза	Характеристика
I	
II	
III	

Вимоги до результатів оформлення: ефективність методу практичних робіт залежить від можливостей викладача відповідно до мети заняття раціонально «вписати» в його структуру практичні завдання й організувати роботу студентів з їх виконання, врахувавши попередню їх підготовленість, Викладач пояснивши їхню поточну й перспективну значущість, допомогти у виконанні завдань, вказати правильність й послідовність виконуваних дій і технологічних операцій.

3.2. Матеріали контролю для заключного етапу заняття:

1. *Інфікування лікарських рослин мікроорганізмами виключає їхнє наступне використання фармацевтичною промисловістю. Інвазивні властивості фітопатогенних мікроорганізмів обумовлені такими ферментами:*

- A. ізомерази;
- B. оксидоредуктази;
- C. гідролітичні;
- D. ліази;
- E. трансферази.

2. *Як називаються поживні середовища, які використовують для культивування певних видів мікроорганізмів, які не розмножуються на універсальних середовищах?*

- A. спеціальні;
- B. диференціальні;
- C. синтетичні;
- D. основні і.

3. *Визначення патогенної синєгнійної палички проводять посівом на...*

- A. жовтково-сольовий агар;
- B. на середовищі з гліцерином;
- C. среда Блаурокка;

D. среда типа АГВ.

4. Які поживні середовища використовують для визначення ферментативних властивостей мікроорганізмів?

- A. спеціальні;
- B. диференціально-діагностичні;
- C. основні;
- D. селективні;
- E. синтетичні.

5. Дослідження зібраних лікарських рослин показало їх значну обсіменінність різними бактеріями. Який метод треба використати, щоб виділити чисті культури цих бактерій?

- A. фазово-контрастна мікроскопія;
- B. центрифугування у градієнті щільності;
- C. зараження лабораторних тварин;
- D. посів на щільне живильне середовище;
- E. використання фільтрів з порами певного діаметру.

6. Одним з джерел забруднення лікарських засобів мікроорганізмами може бути лабораторний посуд. Який метод доцільно використовувати для його стерилізації?

- A. пастеризація;
- B. тиндалізація;
- C. сухий жар;
- D. висушування;
- E. кип'ятіння.

7. Комплекс заходів, спрямованих на запобігання проникненню мікроорганізмів у рану і в організм в цілому...

- A. асептика;
- B. знезараження;
- C. дезінфекція;
- D. дезинсекція;
- E. консервування.

8. Метод промислової деконтамінації носить назву...

- A. ВЕРХ;
- B. іонізуюче випромінювання;
- C. рідинна хроматографія;
- D. асептичний спосіб;
- E. термічний спосіб підвищення мікробної чистоти нестерильних лікарських засобів.

9. Наявністю в стерильних лікарських препаратах продуктів розпаду бактерій (ліпополісахаридів) має назву...

- A. асептика;
- B. знезараження;
- C. дезінфекція;
- D. пірогенність;

Е. валідація.

10. Причиною пірогенності лікарських препаратів є...

- А. порушення асептики;
- В. усі перераховане;
- С. більшення часу між приготуванням розчину і стерилізацією;
- Д. порушення асептики технологічного процесу;
- Е. мікробне забруднення води, що дистилується.

11. Методи стерилізації, які застосовуються для приготування лікарських засобів в умовах асептики можна розділити на фізичні, механічні, хімічні. Вкажіть метод стерилізації, що належить до хімічних:

- А. стерилізація сухим жаром;
- В. радіаційна стерилізація;
- С. стерилізація паром під тиском;
- Д. стерилізація УФ-променями;
- Е. додавання консервантів.

12. Виробництво стерильних лікарських засобів проводять у приміщеннях:

- А. з класом чистоти С;
- В. з класом чистоти В;
- С. з класом чистоти D;
- Д. для персоналу;
- Е. для готової продукції.

13. Оберіть метод, за допомогою якого під час заводського виробництва парентеральних лікарських засобів видаляють пірогенні речовини:

- А. фільтрування;
- В. центрифугування;
- С. термічна обробка при 120 °С;
- Д. ультрафільтрування;
- Е. відстоювання.

14. Згідно ДФУ стерильні лікарські засоби, які призначені для введення в організм людини чи тварини шляхом ін'єкцій, інфузій або імплантацій, мають назву:

- А. ректальні;
- В. вагінальні;
- С. оральні;
- Д. парентеральні;
- Е. сублінгвальні.

15. Стерилізація допоміжних матеріалів відбувається методом автоклавування при температурі 120 °С протягом:

- А. 45 хв;
- В. 1 год;
- С. 15 хв;
- Д. 30 хв;
- Е. 2 год.

16. Яким терміном позначається небажане внесення чужорідних речовин в лікарські засоби під час їх виробництва (виготовлення)?

- А. абсорбція;
- В. елімінація;
- С. контамінація;
- Д. пірогенізація;
- Е. ліофілізація.

17. Причиною пірогенності лікарських препаратів є...

- А. захворювання рослин;
- В. нездужання людини;
- С. є мікробне забруднення доквілля;
- Д. є мікробне забруднення води.

18. Контроль стерильності лікарських засобів проводиться шляхом...

- А. посіву на тіогліколіве середовище для виявлення різних бактерій;
- В. агаризована дріжджі молочно-сольова середа (АДМС)
- С. середа Блаурокка;
- Д. середа типу АГВ.

19. Метод промислової деконтамінації носить назву...

- А. іонізуюче випромінювання;
- В. термічний спосіб підвищення мікробної чистоти нестерильних лікарських засобів;
- С. рідинна хроматографія;
- Д. асептичний спосіб.

20. Комплекс заходів, спрямованих на запобігання проникненню мікроорганізмів у рану і в організм в цілому...

- А. дезінсекція;
- В. знезараження;
- С. дезінфекція;
- Д. асептика.

IV. Підведення підсумків: підведення результатів виконаних завдань, повідомлення оцінок, повідомлення теми наступного заняття: «Доклінічні випробування лікарських засобів. Вибір методів оцінки. Основні фази клінічних випробувань нових лікарських засобів».

Список рекомендованої літератури:

Основна:

1. Аналітична хімія. Якісний аналіз неорганічних та органічних речовин: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / М.В. Шевряков, Г.О. Рябініна, С.М. Іванищук, М.В. Повстяний. – Херсон: Олді-плюс, 2017. – 516 с.
2. Вивчення мікробіологічної чистоти лікувально-косметичних засобів, що призначені для корекції алопеції М. І. Федоровська, Н. П. Половко, Р. В. Куцик // Зб. наук. прац. співробіт. НМАПО імені П. Л. Шупика – № 28 (5). - С.470–477.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. —

Доповнення 1. - Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. — 416 с.

4. Мікробіологія з основами імунології: Підручник для студ. мед. ЗВО, фармацевтів та провізорів. — 2-ге вид., перероб. і доп. Рекомендовано вченою радою Львів. НМУ / За ред. В.В. Данилейченка, Й.М. Федечка. - К., 2019. - 376 с.

Додаткова література:

1. Ал Нукарі Абдулкарим, О. С. Кошелєв, О. Л. Дроздов / Оцінювання мікробіологічної чистоти назальної мазі «Мнемастим» Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2018. – Т. 11, № 1(26). – С. 40–43

2. Аналітична хімія. Якісний аналіз: Навчально-методичний посібник / Т.Д. Рева, О.М. Чхало, Г.М. Зайцева та ін. – К.: «Медицина», 2017. – 280 с.

3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учеб. для студентов учреждений высш. проф. образования: в 2 т. Т. 1 / под. ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: Изд. группа "ГЭОТАР-Медиа", 2017. - 447 с.

4. Навчальний посібник для самостійної підготовки студентів фармацевтичного факультету до ліцензійного тестового іспиту «Крок - 2. Фармація» / під редакцією І.Ю. Борисюк, Н.С. Фізор, А.В. Замкова - Одеса.: ОНМедУ, 2019. – 88 с.

5. Павленко, О. М., Павленко, Л. Л., Павленко, М. Г., Павленко, І. А. Мікробіологічний контроль нестерильних лікарських засобів. Тенденції та перспективи розвитку науки і освіти в умовах глобалізації: матеріали Міжнар. наук. інтернет-конф. // Міжнар. наук. інтернет-конф. - 2018–№ 40 - С.639-642.

6. Generalov, I. I. Medical microbiology, virology & immunology. In 2 p. P. 1. General microbiology & medical immunology = [Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2 ч. Ч. 1. Общая микробиология и медицинская иммунология]: lecture course for stud. of med. universities / I. I. Generalov; VSMU. - Vitebsk: [VSMU], 2016. - 281 p.