

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ЛС

Выполнил: Коновалов Антон

Группа: МФ-502

АКТУАЛЬНОСТЬ

Особое место в фармацевтическом анализе занимают биологические методы исследований фармацевтических препаратов, относящиеся в первую очередь к области фармакологии и микробиологии.

Особенностью микробиологических видов анализов является специфика объекта исследования – живого микроорганизма, обладающего индивидуальными свойствами. К наиболее значимым особенностям ЛС, влияющим на результаты анализа, относятся следующие:

- Наличие антимикробного действия самих ЛС или их компонентов, а также присутствие в некоторых из них консервантов, препятствующих выявлению микроорганизмов.
- Опережающий рост сопутствующей микрофлоры, затрудняющий определение микроорганизмов-контаминантов.
- Возможность присутствия в аналитических образцах микроорганизмов в «стрессовом» состоянии под воздействием условий технологического процесса производства ЛС, и неравномерное распределение контаминантов в образцах.

ФАКТОРЫ

Основными факторами, влияющими на вариабельность результатов микробиологических исследований, являются: **специфичность пробы** (физико-химические свойства и биологические особенности выделяемой популяции микроорганизмов), **компетентность персонала** и условия его работы, **отбор образцов и подготовка пробы**, условия инкубации, **характеристики используемых питательных сред**. Последние три фактора подлежат обязательной стандартизации и валидации.



МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

Уровень микробной чистоты – один из основных показателей качества фармацевтической продукции. По этому показателю все препараты делят на:

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



МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Основные задачи микробиологического контроля нестерильной продукции: 1. Имеются ли в образце жизнеспособные микроорганизмы (бактерии, грибы)? (качественный анализ)
2. Если да, то в каком количестве? (количественный анализ)
3. Что именно? (идентификационный анализ).

Микробиологические требования к нестерильной продукции: - должна содержать ограниченное количество микроорганизмов; - не должна содержать определенные виды микроорганизмов; - допустимое количество и виды микроорганизмов зависят от лекарственной формы и пути введения препарата;



КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

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

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛС

- 1.Метод высева на чашки Петри с питательной средой:
 - - метод глубинного посева
 - - метод поверхностного посева
- 2. Метод мембранной фильтрации
- 3. Метод наиболее вероятного числа (наименее точный метод, используется для продуктов с очень низкой бионагрузкой).

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

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

ЭТАПЫ

- 1. Проверка пригодности питательных сред

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

Б. Проверка стерильности: термостатируют образец каждой серии питательной среды после ее стерилизации в течении 5-ти суток при 30-35° С (если среда используется для выявления бактерий) и 20-25° С (если среда используется для выявления грибов). По истечении заданного срока на (в) питательных средах должны отсутствовать визуально определяемые признаки роста микроорганизмов.

В. Проверка ростовых свойств:

- Ростовые качества питательных сред обеспечиваются двумя факторами: наличием питательных веществ (пептиды, углеводы) и факторов роста, таких как аминокислоты, витамины, микроэлементы и пр.; отсутствием ингибиторов роста микроорганизмов, например, остатков протеолитических ферментов, примесей тяжелых металлов, антибиотических веществ, и т.д.;

- Контролем при определении ростовых качеств среды служит: стандартная среда с гарантированными ростовыми свойствами, на котором правильно проявляется количественный и качественный рост микроорганизмов (морфология колоний); в случае отсутствия стандартной среды для контроля ростовых свойств в качестве контроля используют некоторое количество среды из предыдущей партии.

ЭТАПЫ

2. Проверка наличия /отсутствия антимикробного действия ЛС.

-Некоторые ЛС обладают выраженным антимикробным действием:

•Специфическое антимикробное действие: антибиотики, антисептики, производные фторхинолонов, сульфаниламиды и др.

3. Нейтрализация (устранение) антимикробного действия:

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



МЕМБРАННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ : ИСПЫТАНИЯ НА НАЛИЧИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

1. Образец готовят аналогично как и для выявления ОКА и ОКГ
2. Испытанию подвергают количество, эквивалентное 1 г или 1 мл продукта
3. Инокулируют подходящее количество бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают, инкубируют при температуре 30-35°C в течение 18-24 ч.
4. Встряхивают контейнер, переносят 1 мл образца, полученного при выполнении п.3, в 100 мл бульона Макконки и инкубируют при температуре 42-44°C в течение 24 - 48 ч. – обогащение
5. Пересеваяют подходящее количество образца, полученного при выполнении п.4, на чашки с агаром Макконки и инкубируют при температуре 30-35°C в течение 18-72 ч. – индикация
6. Интерпретация результатов: рост характерных колоний свидетельствует о возможном присутствии *Escherichia coli*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.
7. Продукт выдерживает испытания, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

СХЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ



МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Стерильность – отсутствие живых микроорганизмов. Для стерильных лекарственных форм наличие микроорганизмов, даже в малом количестве, может стать летальным, учитывая беспрепятственное попадание микроорганизмов в кровь или на слизистые оболочки организма, при условии ослабленного иммунитета человека.

Испытание применяется для препаратов, которые должны быть стерильны:

- ЛС для парентерального применения (растворы, лиофильно высушенные и стерильно расфасованные порошки для инъекций и инфузий);
- Офтальмологические ЛС;
- Растворы антисептиков для наружного применения;
- Мази, гели для наружного применения (для нанесения на раневую поверхность);

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Методы определения стерильности:

- Мембранная фильтрация – наиболее предпочтительный метод, если испытуемый препарат фильтруется;
- Метод прямого посева.

Питательные среды, используемые для определения стерильности:

- Жидкая тиогликолевая среда: снижает окислительно-восстановительный потенциал и способствует росту анаэробных микроорганизмов
 - Выявление анаэробных бактерий
 - - Аэробных бактерий
- Жидкая среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (среда Сабуро)
 - Выявление грибов
 - Выявление аэробных бактерий.

СХЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРИЛЬНОСТИ

Проверка пригодности питательных сред (стерильность, ростовые свойства)

Проверка наличия/отсутствия антимикробного действия продукта

Продукт не обладает антимикробным действием

Продукт обладает антимикробным действием

Мембранная фильтрация и перенос фильтров в жидкие питательные среды

Прямой посев в жидкие питательные среды

Нейтрализация антимикробного действия (для нефильтруемых и плохо фильтруемых препаратов – разведение, добавление нейтрализующего агента, комбинированный метод; для фильтруемых – мембранная фильтрация)

Прямой посев в жидкие питательные среды с учетом результатов устранения антимикробного действия

Мембранная фильтрация и перенос фильтров в жидкие питательные среды

Инкубирование, визуальная оценка наличия/отсутствия роста, интерпретация результатов

