

Учреждение образования  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**М. В. Рымовская**

# **ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ АСЕПТИКИ**

Электронный курс лекций  
для студентов специальности  
1-48 02 02 «Технология лекарственных препаратов»  
специализации 1-48 02 02 01 «Промышленная технология  
лекарственных препаратов»

Минск 2018

УДК [661.12+579.6](0.034)(075.8)  
ББК 35.66я73  
Р95

Рассмотрен и рекомендован к изданию редакционно-издательским советом Белорусского государственного технологического университета.

**Р е ц е н з е н т ы :**

доктор медицинских наук, профессор, директор  
РУП «Научно-практический центр ЛОТИОС»

*В. Н. Гапанович;*

доктор биологических наук, профессор,  
заведующая кафедрой генетики

Белорусского государственного университета

*Н. П. Максимова;*

кандидат фармацевтических наук, заместитель директора  
по инновационному развитию ООО «БиоамидБел»

*Ю. Г. Чернецкая*

**Рымовская, М. В.**

Р95 Основы промышленной асептики : электронный курс лекций для студентов специальности 1-48 02 02 «Технология лекарственных препаратов» специализации 1-48 02 02 01 «Промышленная технология лекарственных препаратов» / М. В. Рымовская. – Минск : БГТУ, 2018. – 127 с.

Рассмотрены вопросы микробной контаминации объектов и продуктов фармацевтического производства, пути и способы предотвращения их микробного загрязнения. Приведены прикладные направления микробиологии (медицинской, санитарной, промышленной), нужные для разработки, исследования, производства и контроля качества фармацевтических препаратов.

УДК [661.12+579.6](0.034)(075.8)  
ББК 35.66я73

© УО «Белорусский государственный  
технологический университет», 2018  
© Рымовская М. В., 2018

# ВВЕДЕНИЕ

Производство лекарственных средств должно соответствовать требованиям надлежащей производственной практики (GMP). Одним из главных требований к такому производству является сведение к минимуму риска микробной контаминации продукции.

Микроорганизмы попадают в сферу технологических процессов и готовую продукцию из основного и вспомогательного сырья, воздуха, от персонала, с поверхности оборудования и стен рабочего помещения, упаковочных материалов, из питательных сред, посевного материала, пеногасителей, растворителей. Это происходит вследствие контакта объектов фармацевтического производства с природными средами и объектами окружающей среды, являющимися естественными местами обитания и накопления микроорганизмов. Человек одновременно является объектом окружающей среды и потому – биотопом для широкого круга микроорганизмов, в том числе патогенных, участником процесса промышленного производства лекарственных препаратов и потребителем продукции фармацевтических производств. По этой причине неотъемлемой частью учебного курса «Основы промышленной асептики» является освоение санитарной микробиологии объектов окружающей среды.

Для предотвращения попадания микроорганизмов из объектов промышленного фармацевтического производства в готовую продукцию на предприятиях по производству лекарственных средств предусматривается система организации асептических условий производства, включающая санитарно-гигиенические мероприятия (дезинфекцию, антисептику, стерилизацию), строительно-планировочные решения, подготовку помещений и оборудования, подготовку персонала и разработку правил его поведения. Для контроля производственной среды постоянно используют систему микробиологического мониторинга, заключающуюся в определении в объектах фармацевтического производства общей обсемененности и некоторых специфических микроорганизмов. Каждая партия стерильных и нестерильных лекарственных средств также подвергается обязательному микробиологическому контролю в соответствии с предъявляемыми к ним требованиями.

Знание проблемы микробной контаминации объектов фармацевтического производства, а также путей и способов ее предотвращения необходимо для разработки, исследования, производства и контроля качества фармацевтических препаратов, способствует сведению к минимуму риска микробной контаминации продукции.

# Глава 1

## ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

### УЧЕБНОГО КУРСА

В процессе производства лекарственного средства (рис. 1) в его состав могут попадать микроорганизмы из природных сред (воды, почвы, воздуха), живых и неживых объектов окружающей среды (человека, животных, растений, минерального сырья), объектов производства (обслуживающего и вспомогательного персонала, основных и вспомогательных компонентов лекарственных средств, воздуха рабочих помещений, упаковки, растворителей, стен, поверхности технологического оборудования).

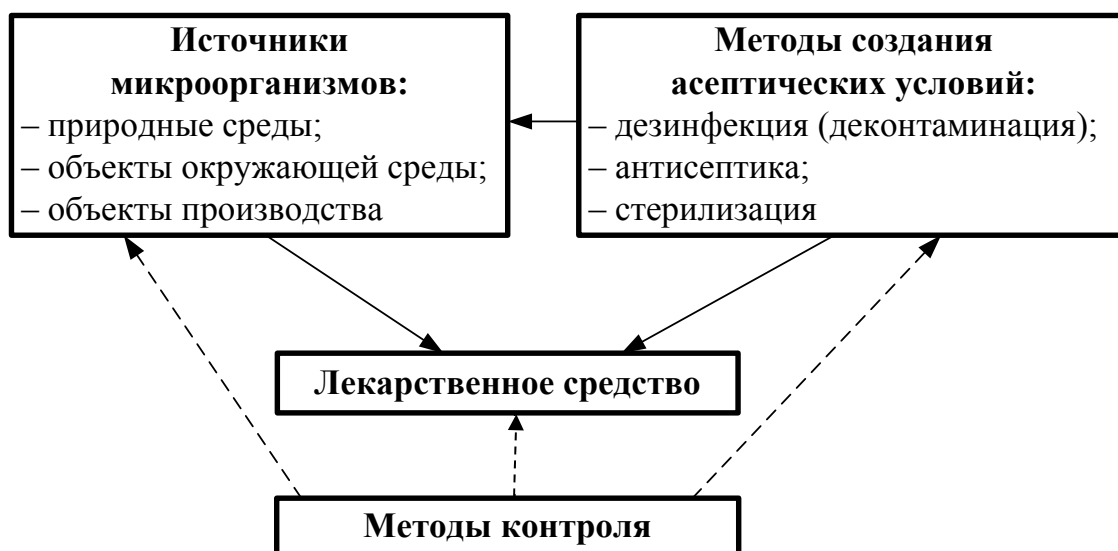


Рис. 1. Факторы, влияющие на содержание микроорганизмов в лекарственном средстве

Для предупреждения попадания микроорганизмов в готовое лекарственное средство в области рабочего пространства, контактирующего с компонентами лекарственного средства в процессе его производства, создаются асептические условия. **Асептика** – совокупность мер, направленных на предупреждение попадания микроорганизмов и механических частиц в среду, чистоту которой требуется сохранить, на всех этапах технологического процесса. В общем случае эти меры заключаются в обеззараживании (инактивации и/или удалении микроорганизмов) всего, что соприкасается с данной средой: дезинфекции, антисептике, деконтаминации, стерилизации.

Условия асептики применительно к технологии производства лекарственных средств – это условия работы, позволяющие в максимальной степени предохранить лекарственные средства от попадания в них микроорганизмов. Асептика применительно к биотехнологическим процессам получения лекарственных субстанций, предполагающим использование в технологических процессах живых клеток (растений, животных, микроорганизмов) – это условия работы, полностью исключающие попадание других живых клеток (в первую очередь – микроорганизмов) в производственную среду.

**Дезинфекция (деконтаминация)** – комплекс мероприятий, предусматривающих обработку загрязненного микроорганизмами (контаминированного) объекта с целью их инактивации до такой степени, чтобы они не смогли вызвать инфекцию при использовании обработанного объекта. При дезинфекции погибает большая часть микроорганизмов (в том числе все патогенные), однако споровые формы и резистентные вирусы могут остаться жизнеспособными.

Для дезинфекции используют следующие методы и средства:

– механические (фильтрование, проветривание, вентиляция, обработка пылесосом, стирка, влажная уборка) – обеспечивают удаление микроорганизмов с объектов, не вызывая их гибели;

– физические (воздействие высокой температуры, ультрафиолетового и радиационного облучения) – обеспечивают инактивацию микроорганизмов за счет действия физических агентов;

– химические (обработка помещений, изделий и материалов дезинфектантами) – обеспечивают инактивацию микроорганизмов за счет воздействия химических веществ.

**Антисептика** – совокупность мер, направленных на уничтожение и подавление роста микроорганизмов, находящихся в контакте с макроорганизмом (человеком).

Антисептическая обработка направлена на обеззараживание кожи и слизистых оболочек человека, для этого используются антисептики – дезинфектанты, при длительном контакте с кожей и слизистыми оболочками человека не вызывающие местного раздражающего действия и не наносящие вреда организму.

Действие дезинфектантов и антисептиков в основном основано на растворении липидов клеточных оболочек (детергенты) или разрушении белков и нуклеиновых кислот (денатуранты, оксиданты). Активность их неодинакова для различных микроорганизмов, зависит в первую очередь от температуры, рН, концентрации действующего вещества. Некоторые вещества, не оказывая прямого антимикробного действия, повышают эффективность дезинфекции в целом. Например,

обработка поверхностей раствором соды повышает растворение белков и жиров в составе загрязнений, предупреждает коррозию металлических частей, предупреждает оседание солей кальция на обрабатываемых поверхностях.

**Стерилизация** – обработка объекта с целью полной инактивации в объекте или удаления из него всех жизнеспособных форм микроорганизмов.

Для стерилизации применяют те же физические и химические методы и средства, но в дозах, обеспечивающих полную инактивацию всех жизнеспособных форм микроорганизмов. Из механических методов используется только стерилизующее фильтрование через мембраны, размер пор которых меньше размера клеток бактерий.

При получении инъекционных лекарственных форм, допускающих и не допускающих термическую стерилизацию, соблюдение асептических условий обязательно: стерилизация лекарства, приготовленного без соблюдения асептики и загрязненного вследствие этого микробиотой, не освобождает его от клеток инактивированных микроорганизмов, фрагментов клеточных стенок, экзо- и эндометаболитов. Инъекция такого препарата, хотя и простерилизованного, опасна тем, что может вызвать у больного повышение температуры (**пирогенную реакцию**) или побочные явления. Соблюдение асептики приобретает особое значение при приготовлении лекарственных средств, не выдерживающих термическую стерилизацию, например, растворов с термолабильными веществами, а также взвесей и эмульсий, которые являются малоустойчивыми системами: при нагревании резко усиливаются процессы рекристаллизации, флокуляции (для взвесей) и коалесценции (для эмульсий). Единственный путь получения таких лекарственных препаратов – строжайшее соблюдение асептических условий при их производстве.

Использование методов создания асептических условий (рис. 1) способствует снижению концентрации жизнеспособных клеток микроорганизмов как в производственной среде, так и в самом лекарственном средстве. Однако даже тщательный и постоянный контроль микробиологической чистоты основного и вспомогательного лекарственного сырья и готовых лекарственных средств не может дать полной уверенности в микробиологической чистоте реализуемой потребителю фармацевтической продукции. Поэтому объектами микробиологического контроля на фармацевтическом производстве становятся все объекты производственного процесса и даже растворы дезинфектантов и антисептиков. Такой контроль осуществляется в ходе **микробиологического мониторинга объектов производственной среды** – регулярного

контроля состояния производственной среды на фармацевтических производствах, который проводится с целью получения объективной информации о контаминации производственной среды и персонала для оценки эффективности управления факторами, влияющими на качество продукции и процессов. Мониторинг проводят в чистых зонах А, В, С, D, К и в неклассифицированных, но контролируемых производственных помещениях в оснащённом и эксплуатируемом состояниях.

**Чистое помещение (чистая зона)** – отдельное помещение либо его часть, построенная и используемая таким образом, что в ней сведено к минимуму проникновение, образование и накопление загрязнений в виде частиц и микроорганизмов. Концентрация частиц (механических, микроорганизмов) в воздушной среде постоянно контролируется и поддерживается в заданных пределах в соответствии с определенным классом чистоты.

**Оснащённое состояние** – состояние чистого помещения, в котором все системы готовы к работе, технологическое оборудование установлено и работает, но отсутствует персонал.

**Эксплуатируемое состояние** – состояние чистого помещения, в котором все системы помещения и технологическое оборудование функционируют установленным образом в присутствии персонала, выполняющего свою работу.

Микробиологический мониторинг включает контроль воздуха, поверхностей помещения и оборудования, рук и одежды персонала, первичной упаковки, антисептических и дезинфицирующих средств.

Расположение точек отбора проб определяется совместно специалистами производственного цеха и лаборатории, согласовывается с технологом и начальником цеха и отмечается на схемах чистых помещений. Периодичность отбора проб устанавливается с учетом типа чистоты зоны, результатов предыдущего контроля и загруженности производства. Внеочередной микробиологический мониторинг проводится в случае неудовлетворительных результатов предыдущего и при изменении производственных условий.

Для оценки результатов мониторинга используют предупреждающий предел и предел, требующий принятия мер.

**Предупреждающий предел** – установленный критерий, заранее предупреждающий о возможном отклонении от нормальных условий, который не обязательно является основанием для решительных корректирующих действий, но требует дополнительного расследования.

**Предел, требующий принятия мер** – установленный критерий, при превышении которого необходимо принятие дополнительных мер и корректирующих действий.

## Глава 2

# ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ КАК МЕСТ ОБИТАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Объекты окружающей среды условно делят на места естественного обитания и места временного сохранения микроорганизмов. **Места естественного обитания** – зоны, где есть условия для роста и размножения микроорганизмов (вода, почва, растения, организмы человека и животных). **Места временного сохранения** – зоны, где микроорганизмы находятся в состоянии, близком к анабиозу, не питаются и не размножаются (воздух).

В составе каждого объекта различают постоянную (автохтонная для воды и почвы, эпифитная для растений, нормальная для животных и человека) и случайную (аллохтонная для воды, почвы, растений; транзиторная для животных и человека) микробиоту. Постоянная (типичная) микробиота данной системы существует в виде сообществ и экосистем (биоценозов), тогда как состав случайной микробиоты может легко изменяться под действием различных факторов.

Численность микроорганизмов в объектах окружающей среды зависит от климатических и географических факторов, санитарного состояния среды, характера производственной деятельности человека.

### 2.1. Микробиота воды

На качественный состав микробиоты воды влияет ее происхождение: различают поверхностные, глубинные, проточные, стоячие, соленые, подземные, артезианские, атмосферные воды. Большая часть микроорганизмов и микроскопических гидробионтов находится в водоемах в свободноплавающем виде (планктон), прикрепленном на поверхности плотных объектов – животных и водорослей, технических сооружений (перифитон), обитает на поверхности грунта водоема или в его толще (бентос). Отбор проб воды для микробиологического анализа и забор воды для подготовки и использования производят из толщи водоема, поэтому наиболее важно представление об обитателях планктона. Подготовка питьевой воды (воды централизованного водоснабжения) в Республике Беларусь заключается в удалении взвешенных веществ и обеззараживании, в некоторых случаях – удалении



ионов железа и умягчении. Для обеззараживания воды чаще используют обработку препаратами активного хлора, реже – озонирование и ультрафиолетовое облучение.

Численность микроорганизмов воды определяется в первую очередь содержанием в ней органических и неорганических веществ (источников питания), также важна глубина водоема, определяющая степень освещенности и концентрацию растворенного в воде кислорода.

Состав автохтонных обитателей водных сред представлен микроорганизмами из всех групп: аэробные и анаэробные бактерии, дрожжеподобные и мицелиальные грибы, простейшие, вирусы. Эти микроорганизмы участвуют в круговороте химических элементов, обеспечивая создание пищевых цепей.

Аллохтонные микроорганизмы попадают в поверхностные водоемы вместе со сточными, талыми или ливневыми водами. Основной источник загрязнения – неочищенные бытовые и промышленные сточные воды.

Комплекс особенностей водоема, в том числе содержание микроорганизмов и веществ органического и неорганического происхождения, определяет его **сапробность** – степень чистоты (загрязненности) воды (табл. 1).

Таблица 1

**Критерии оценки степени загрязнения водоемов**

Критерий оценки	Наименование зоны		
	олигосапробная	мезосапробная	полисапробная
Общее микробное число (ОМЧ), кл./см <sup>3</sup>	10–10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> –10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> –10 <sup>6</sup>
Процессы, протекающие в водоеме	Чистая вода, процессы самоочищения и минерализации завершены	Зоны умеренной загрязненности, происходят процессы нитрификации и денитрификации	Зоны сильного загрязнения, характеризуются большим количеством легко разлагающихся органических веществ, в них мало или совсем нет кислорода
Преобладающие микроорганизмы	<i>Micrococcus candidans</i> , <i>M. roseus</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , бактерии типа <i>Cyanobacteria</i>	Нитрифицирующие бактерии родов: <i>Clostridium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Streptomyces</i>	Анаэробные бактерии, актиномицеты, дрожжеподобные грибы

Микробиота бытовых сточных вод включает нормальных и патогенных обитателей кишечника человека. Однако вода не является благоприятной средой для их размножения, поэтому они постепенно отмирают. Основным фактором самоочищения является конкурентная активация сапрофитной микробиоты, приводящая к быстрому разложению органических веществ и снижению численности посторонних микроорганизмов. Современные проблемы в экологии связаны с поступлением такого количества сточных вод, которое нормальные обитатели переработать не могут.

## 2.2. Микробиота почвы

Почва – главный резервуар сохранения микроорганизмов, они обитают в водных и коллоидных пленках, обволакивающих почвенные частицы. Наиболее активна микробиота почвы на глубине 10–20 см. Почвенные микроорганизмы участвуют в деградации и минерализации органических веществ, являясь неотъемлемой частью цепи питания, в трансформации органических и неорганических веществ и в формировании плодородного слоя.

Качественный и количественный состав микробиоты почвы зависит от времени года, вида почвы, глубины, деятельности человека.

Качественный состав микробитателей почвы очень разнообразен: широкое разнообразие бактерий, в том числе бактерии типа *Cyanobacteria*, рода *Actinomyces*; мицелиальные грибы; простейшие; вирусы. Микробиота почвы представлена аэробами и анаэробами, автотрофами и гетеротрофами, способными размножаться в широком диапазоне температур – от 20 до 60°C. Число жизнеспособных клеток микроорганизмов в песчаных почвах достигает  $10^7$  клеток/г, в унавоженных почвах – до  $10^9$  клеток/г. В нормально функционирующих почвах автохтонная микробиота осуществляет процессы самоочищения от органических загрязнений и благодаря выраженному антагонизму приводит к гибели патогенных представителей аллохтонной микробиоты. Загрязнение почвы происходит путем попадания выделений человека и различных видов сточных вод. Антропогенное загрязнение почвы может привести к ингибированию автохтонной микробиоты и подавлению ее самоочищающей способности. Например, подавление бактерий-аммонификаторов приводит к накоплению неразложившихся органических субстратов и исключению азота из круговорота веществ, а подавление нитрифицирующих бактерий приво-

дит к накоплению аммиака и солей аммония, что повышает рН почвы и также нарушает экологический баланс.

Попавшие в почву обитатели нормальной и патогенной микробиоты человека не могут долго выживать в ней, однако некоторые из них способны длительное время сохраняться и даже включаться в биоценоз.

### 2.3. Микробиота воздуха

Воздух не является естественной средой обитания микроорганизмов, поскольку в воздухе они не питаются и не размножаются. Недостаток влаги, питательных веществ, солнечная радиация действуют на микроорганизмы губительно, поэтому видовой состав микробиоты воздуха немногочислен.

Различают микробиоту атмосферного воздуха и воздуха закрытых помещений, которые отличаются по качественному и количественному составу (табл. 2).

Таблица 2

Микробиота атмосферного воздуха

Постоянная микробиота атмосферного воздуха	Временная микробиота	
	воздуха открытых пространств	воздуха закрытых помещений
<p>1. Формируется за счет водных и почвенных микроорганизмов, наибольшее их число содержится в приземном слое</p> <p>2. Бактерии родов <i>Micrococcus</i>, <i>Sarcina</i>, <i>Bacillus</i>, <i>Actinomyces</i>, эндоспores бактерий, конидии грибов родов <i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i>, <i>Mucor</i></p>	<p>Представители микробиоты атмосферного воздуха и нормальные обитатели тела человека из верхних дыхательных путей, возбудители заболеваний, передающихся воздушно-капельным путем, с кожных покровов, пыли одежды и почвы</p>	

Микроорганизмы в воздухе находятся в виде водного и пылевого аэрозоля – адсорбируются на частицах влаги или твердых частицах, удерживающихся (витающих) в воздухе. Различают пылевую фазу – крупные быстро оседающие или испаряющиеся частицы (более  $10^3$  нм), капельную фазу – мелкие капли, длительно сохраняющиеся в воздухе (до  $10^2$  нм), капельные ядрышки – мельчайшие капли аэрозоля (до 10 нм), которые, высыхая, остаются во взвешенном состоянии с образованием устойчивой аэродисперсной системы.

## Глава 3

# САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Основными источниками всех патогенных для человека микроорганизмов, вызывающих инфекционные заболевания, являются люди и теплокровные животные. Наибольшее число болезнетворных микроорганизмов поступает в окружающую среду фекальным и воздушно-капельным путем. Условия обитания для таких микроорганизмов в объектах окружающей среды неблагоприятны: относительно низкая температура, бедный состав питательных компонентов, высокая конкуренция со стороны автохтонных обитателей способствуют вытеснению и отмиранию аллохтонной микробиоты. Однако некоторые представители патогенных микроорганизмов способны довольно долго сохраняться и выживать в таких неблагоприятных условиях (табл. 3). Водным путем могут передаваться бактериальные возбудители холеры, брюшного тифа, дизентерии, лептоспироза, туберкулеза, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы, вирусные возбудители гепатита А, Е, полиомиелита, ротавирусы, аденовирусы, паразитарные возбудители амебиаза, лямблиоза, криптоспоридиоза.

Таблица 3

### Характеристика возбудителей инфекций, передаваемых с водой

Возбудитель	Срок выживания в воде, сут	Минимальная инфицирующая доза, клеток	Устойчивость к хлору
Бактерии			
<i>Shigella</i> spp.	5–30	10	Низкая
<i>Salmonella</i> spp.	15–280	10 000–1 000 000	Низкая
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Может размножаться	Более 10 000	Средняя
<i>Legionella pneumophilla</i>	230–360, может размножаться	Более 10 000	Высокая
Вирусы			
<i>Enteroviruses</i>	20–200	1–10	Средняя
<i>Rotaviruses</i>	10–70	1–10	Средняя
Простейшие			
<i>Giardia lamblia</i>	20–80	60–100	Высокая
<i>Cryptosporidium parvum</i>	50–120	1–30	Высокая

Сроки выживания микроорганизмов зависят от количества попавших в среду микроорганизмов, климатических условий, естественных факторов биоочистки природной среды.

Бактерии *Legionella pneumophila* колонизируют искусственные водные резервуары: системы холодного и горячего водоснабжения, водопроводные сети, кондиционеры, увлажнители, душевые установки, особо интенсивный рост может происходить в устройствах, содержащих ржавчину и осадок (фонтаны, сантехническое оборудование). Эти бактерии способны размножаться в воде и вызывать бронхолегочные повреждения при попадании в легкие в виде мелкодисперсного гидроаэрозоля, являются причиной примерно 50% случаев заболеваний легочными пневмониями.

В почве неопределенно долго сохраняются патогенные спорообразующие бактерии (*Clostridium botulinum*, *Bacillus anthracis*), в течение недель и месяцев сохраняются неспорообразующие бактерии – представители кишечной микробиоты человека и животных, а также возбудители сальмонеллеза, туляремии, лептоспироза, энтеровирусы. В почве всегда находятся мицелиальные грибы рода *Fusarium* – возбудители подкожных микозов, некоторых эпидермических микозов.

Попадая в воздух с пылью почвы, с поверхности водоемов, от человека и животных, устойчивые к высыханию микроорганизмы сохраняются достаточно длительное время. Воздух закрытых помещений имеет основное значение в передаче многих инфекционных заболеваний: бактериальных (скарлатина, дифтерия, менингит, туберкулез) и вирусных (грипп, корь, паротит, ветряная оспа). Известно, что микробактерии сохраняются до 18 дней (в маленьких ядрышках) и до 30 дней (в больших ядрышках).

Таким образом, вода, почва, воздух могут играть роль факторов передачи инфекционных болезней, а иногда – даже основных источников заболеваний.

### **3.1. Задачи, принципы и методы санитарной микробиологии. Санитарно-показательные микроорганизмы**

**Санитарная микробиология** – раздел экологической микробиологии, который изучает контаминацию внешней среды условно-патогенными и патогенными микроорганизмами и возможность их передачи человеку.

Перед санитарной микробиологией ставятся следующие *задачи*:

- предупреждение опасности возникновения массовых вспышек инфекционных заболеваний, раннее обнаружение патогенной микробиоты в окружающей среде;
- разработка мер по защите биосферы от контаминации (загрязнения) патогенными и условно-патогенными микроорганизмами;
- эпидемиологическая оценка объектов внешней среды по микробиологическим показателям;
- разработка и совершенствование микробиологических методов исследования объектов внешней среды;
- разработка нормативов (санитарных правил и норм) для объектов внешней среды и осуществление контроля выполнения требований этих нормативных документов.

Непосредственное обнаружение патогенных микроорганизмов имеет ряд *трудностей*:

- патогенные микроорганизмы находятся в окружающей среде не постоянно и обнаруживаются в основном в период эпидемии;
- количество патогенных микроорганизмов, поступающих в окружающую среду, значительно меньше, чем представителей нормальной микробиоты, в объектах они распространены неравномерно;
- при высеве на питательные среды патогенные микроорганизмы страдают от конкуренции с сапрофитами, плохо приспособлены к жизни в окружающей среде, для их культивирования требуются специальные дорогостоящие среды.

Из-за сложности обнаружения и количественного учета патогенных микроорганизмов оценку санитарного состояния объектов среды проводят непрямым путем, устанавливая факт их загрязнения выделениями человека и животных.

**Санитарно-показательные микроорганизмы** – обнаруживаемые в окружающей среде микроорганизмы – нормальные обитатели кишечника и ротовой полости теплокровных животных и человека, служащие показателем ее санитарного неблагополучия и потенциальной опасности. Чем обильнее загрязнение нормобиотой человека (чем большее количество санитарно-показательных микроорганизмов обнаружено), тем более вероятно попадание в объект патогенных микроорганизмов. Загрязнение объекта органическими веществами и как следствие – выявление большого количества сапрофитных микроорганизмов, также косвенно свидетельствует о присутствии в объекте патогенных микроорганизмов.

**Принципы и методы** микробиологических исследований санитарной микробиологии:

- правильный отбор проб;
- проведение серийных анализов (микроорганизмы распределены неравномерно и постоянно пребывают в антагонистических отношениях с нормальными обитателями воды, поэтому необходим отбор с разных участков);
- повторность отбора проб;
- применение только стандартных методик и унифицированных методов (для того, чтобы иметь возможность сравнивать результаты анализов, полученных в разных лабораториях);
- использование комплексных тестов для доказательства;
- проведение оценки загрязнений по совокупности полученных результатов;
- ответственность микробиологов за точность и обоснованность выводов о состоянии контролируемых объектов.

Санитарно-микробиологический контроль предусматривает подсчет всех обнаруживаемых в объекте микроорганизмов, а также выявление и количественный учет санитарно-показательных микроорганизмов.

Точный учет общего числа микроорганизмов невозможен, так как нельзя одновременно создать условия для размножения и роста всех присутствующих в объекте микрообитателей. В качестве критерия выбрано количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАМ), объединенных потребностями в питании и условиями культивирования. Показатель определяется путем подсчета колоний, выросших в полноценной агаризованной среде в чашках Петри при температуре  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 3 сут, выражается в числе колониеобразующих единиц (КОЕ) на единицу массы (объема) образца. Этот показатель наиболее полно характеризует определяемую принятыми методами группу микроорганизмов, поэтому сейчас этот термин часто используют вместо обозначений, применявшихся ранее (общее количество бактерий, общее микробное число, количество сапротрофов). Большое количество микроорганизмов свидетельствует о наличии компонентов питания (в первую очередь – органических веществ) и благоприятных условиях для жизнедеятельности. Для воды оценивается количество микроорганизмов в  $1\text{ см}^3$ , для почвы – в  $1\text{ г}$ , для воздуха – в  $1\text{ м}^3$ .

К санитарно-показательным микроорганизмам предъявляются следующие **требования**:

– антропогенный характер (должны являться нормальными обитателями организма человека и животных, выделяться в окружающую среду постоянно и в больших количествах);

– не должны иметь другого резервуара, кроме организма человека;

– после выделения в окружающую среду должны сохранять жизнеспособность в течение сроков, близких к срокам выживания патогенов, поступающих тем же путем;

– не должны размножаться в окружающей среде;

– должны иметь устойчивый генотип и не изменяться быстро под влиянием факторов внешней среды;

– должны быть типичными, легко диагностируемыми и учитываемыми на простых и доступных средах.

Кроме обитателей кишечника (показателей фекального загрязнения) и обитателей верхних дыхательных путей (индикаторов орального загрязнения объекта) в качестве санитарно-показательных микроорганизмов для природной воды и почвы определяют и наличие сапрофитных, автохтонных представителей внешней среды (индикаторов процессов самоочищения).

Для установления присутствия санитарно-показательных микроорганизмов в объектах окружающей среды используют следующие методы:

– прямой подсчет при микроскопировании;

– высеивание на полноценные, селективные, дифференциально-диагностические питательные среды и идентификация микроорганизмов;

– заражение лабораторных животных (для анализа содержания вирусных частиц).

Несмотря на простоту и экспрессность первого метода, его применение ограничено тем, что невозможно отличить живые клетки от мертвых, трудно анализировать непрозрачную воду, поэтому этот метод используют только в экстренных случаях, например, при авариях на трубопроводе.

Содержание санитарно-показательных микроорганизмов выражают в титрах, индексах и наиболее вероятном числе. **Титр** – минимальное количество субстрата (в см<sup>3</sup>, граммах), в котором еще обнаруживается санитарно-показательный микроорганизм. Например, коли-титр питьевой воды – 300 мл. **Индекс** – количество санитарно-показательных микроорганизмов, содержащееся в



единице объема какого-либо субстрата. Например: коли-индекс питьевой воды – 3 колиформные бактерии в 1 дм<sup>3</sup>. **Наиболее вероятное число** – количество санитарно-показательных микроорганизмов в единице объема (массы) субстрата (1 дм<sup>3</sup>, 1 см<sup>3</sup>, 1 г), определенное с вероятностью 95% и колеблющееся в пределах доверительных границ. Этот показатель используется, если содержание определяемых микроорганизмов очень мало.

### 3.2. Критерии санитарно-микробиологической характеристики воды

Требования к качеству питьевой воды приведены в СанПиН 10–124 РБ 99. Оценка санитарного состояния воды производится по общему микробному числу (ОМЧ), общим колиформным бактериям (ОКБ), термотолерантным колиформным бактериям (ТКБ), колифагам, спорам сульфитредуцирующих клостридий, цистам лямблий.

Колиформные бактерии – это бактерии семейства Enterobacteriaceae (рис. 2), которые могут ферментировать глюкозу и лактозу до кислоты и углекислого газа (общие – при 37,0°C, термотолерантные – при 43,0–44,5°C).



Рис. 2. Схема идентификации бактерий *E. coli*

Бактерии группы кишечной палочки (БГКП) – это не таксономическая, а условно выделяемая по морфологическим и культуральным

признакам группа бактерий, которая включает представителей четырех родов: *Esherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, являющихся обитателями кишечника человека и животных. По морфологии БГКП – это грамотрицательные, неспорообразующие, факультативно-анаэробные, оксидазоотрицательные бактерии, способные ферментировать глюкозу при 37°C.

Наиболее полно отражает фекальное загрязнение сама кишечная палочка (*Esherichia coli*), содержащаяся в фекалиях в концентрации  $10^6$ – $10^8$  КОЕ/г. Это грамотрицательная, не образующая спор палочка, ферментирующая лактозу при  $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , не имеющая оксидазы, образующая индол. *E. coli* являются показателем свежего фекального загрязнения объекта. Однако эти бактерии не используют как индикатор фекального загрязнения в связи с рядом недостатков: обилие аналогов во внешней среде, высокая вариабельность, недостаточная устойчивость к неблагоприятным факторам, способность к размножению в окружающей среде при концентрации органического углерода 0,28 мкг/см<sup>3</sup>. Кроме того, бактерии *E. coli* не являются четким индикатором фекального загрязнения: известны вспышки сальмонеллеза при концентрации бактерий рода *Salmonella* в воде 17 клеток/дм<sup>3</sup>, тогда как концентрация *E. coli* составляла 4 клетки/дм<sup>3</sup>. Полная идентификация *E. coli* отнимает много времени и средств. По этим причинам в практической санитарной микробиологии ограничиваются определением ОКБ и ТКБ.

В качестве дополнительного показателя фекального загрязнения объекта и показателя эффективности дезинфекции воды используют бактерии рода *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. salivarius*, *E. durans*). Это грамположительные кокки, образующие короткие цепочки, они постоянно находятся в кишечнике человека и выделяются в большом количестве ( $10^5$ – $10^7$  КОЕ/г), отличаются высокой устойчивостью к хлору, желчи, повышенному осмотическому давлению в растворе, температуре до 60°C, широкому диапазону рН, поэтому являются показателем качества обеззараживания (дезинфекции, пастеризации) объекта.

Колифаги (вирусы, способные лизировать *E. coli* при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  и формировать зоны лизиса бактериального газона (бляшки) через  $(18 \pm 2)$  ч на питательном агаре) из-за сходства с кишечными вирусами человека являются показателями вирусного и фекального загрязнения, а также загрязнения бытовыми сточными водами. В фекалиях содержатся в небольших количествах, но быстро размножают-

ся в сточных водах. Колифаги более устойчивы к обеззараживанию активным хлором, чем ОКБ.

Бактерии рода *Clostridium* (*Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*) – грам-положительные, спорообразующие палочки, представители нормальной микрофлоры кишечника человека и животных. Они постоянно выделяются из кишечника, но в меньших количествах, чем колиформные бактерии и БГКП (до  $10^3$  клеток/г). Бактерии рода *Clostridium* образуют эндоспores, поэтому способны значительно дольше сохраняться во внешней среде и более устойчивы к обеззараживанию.

Основное преимущество определения содержания спор сульфитредуцирующих клостридий – легкая индикация на железосульфитной среде с образованием колоний черного цвета, появление которых вызвано наличием у представителей этих бактерий фермента сульфитредуктазы, восстанавливающего сульфит железа (бесцветный) до сульфида (черного цвета). Этот признак отличает кишечные клостридии от клостридий, обитающих в окружающей среде.

Споры сульфитредуцирующих клостридий являются показателем давнего фекального загрязнения объекта и недостаточной эффективности обеззараживания таких объектов, как вода, почва, пищевые продукты, лечебные грязи.

К недостаткам использования спор сульфитредуцирующих клостридий для оценки санитарного состояния окружающей среды относят их высокую устойчивость и длительное сохранение в окружающей среде, возможность размножения в богатых почвах при температурах более  $18^{\circ}\text{C}$ , а также возможность включения их в почвенные природные биоценозы.

Лямблии – жгутиковые протисты, паразитирующие в тонком кишечнике человека и многих других млекопитающих, а также птиц. Цисты лямблий – показатель опасности воды по протозойным заболеваниям.

### **3.3. Критерии санитарно-микробиологической характеристики почвы**

Санитарно-микробиологическое исследование почвы является важным в плане оценки ее эпидемической безопасности и экологической полноценности (способности к самоочищению). Оценка эпидемической безопасности производится по ОМЧ, БГКП, числу

бактерий родов *Enterococcus*, *Salmonella*, количеству яиц гельминтов, личинок и куколок мух. По эпидемическим показаниям определяют цисты простейших, споры возбудителей сибирской язвы, патогенных бактерий рода *Clostridium*, энтеровирусы. Для характеристики экологической полноценности и биологической активности почвы оценивают ОМЧ, количество бактерий-аммонификаторов, нитрифицирующих бактерий, актиномицетов и целлюлозоразрушающих мицелиальных грибов, количество термофильных микроорганизмов и титр бактерий рода *Clostridium*. Эта характеристика дополняется данными анализа ферментативных процессов по показателям рН, окислительно-восстановительному потенциалу, соотношению азота аммиака и нитратов.

ОМЧ для почв определяется при 22 и 37°C: в чистых почвах преобладает автохтонная микробиота, растущая при 22°C, а высокое ОМЧ, определяемое при 37°C, свидетельствует об антропогенном биологическом загрязнении.

Соотношение количества нитрифицирующих бактерий и аммонификаторов ярко отражают степень биологической активности почвы. Нитрифицирующие бактерии (родов *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*) способны окислять аммиак до нитритов и нитратов. Они являются показателями активных процессов самоочищения объектов. Аммонификаторы разлагают белки и мочевины до аммиака и его солей, это гнилостные аэробные и анаэробные микроорганизмы: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Serratia marcescens*, бактерии рода *Proteus*, грибы родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium putrificum*. Большое их количество является показателем массивного органического загрязнения.

Целлюлозоразрушающие микроорганизмы – почвенные бактерии (в аэробных условиях – представители родов *Cytophaga* и *Sporocytophaga*, *Mycococcus*, *Archangium*, *Polyangium*, *Cellulomonas*, единичные виды родов *Pseudomonas*, *Vibrio* и *Bacillus*; в анаэробных условиях – бактерии рода *Clostridium*), актиномицеты (представители родов *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*) и мицелиальные грибы (представители родов *Fusarium*, *Dematium*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) утилизируют целлюлозу, попадающую в почву с растительными остатками, как источник углерода.

Актинобактерии (бактерии класса Actinobacteria) – группа грамположительных, ветвящихся микроорганизмов, активных участников превращений органических соединений. Отдельные виды актино-

бактерий отвечают за специфический запах, исходящий от почвы после дождя.

Термофильные микроорганизмы – систематически разнообразная группа, представители которой способны размножаться при температуре 55–60°C. Являются показателем загрязнения почвы компостами и навозом.

### **3.4. Критерии санитарно-микробиологической характеристики воздуха**

Для санитарно-микробиологической характеристики воздуха определяют ОМЧ и количество бактерий *Staphylococcus aureus*.

*St. aureus* («золотистый стафилококк») – грамположительные, коагулазоположительные кокки, растущие на желточно-солевом агаре в виде золотистых колоний при температуре 37°C в течение суток. Стафилококк устойчив во внешней среде, его носителями являются около 50% людей. Определение *S. aureus* рекомендуется при оценке воздуха лечебно-профилактических учреждений, аптек, жилых помещений, а также воды плавательных бассейнов, детских молочных смесей.

## Глава 4

# ТИПОВЫЕ ИСТОЧНИКИ, ПУТИ И СПОСОБЫ КОНТАМИНАЦИИ ОБЪЕКТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

### 4.1. Основные источники контаминации в производстве фармацевтических препаратов

Основными источниками попадания микроорганизмов в сферу фармацевтического производства являются персонал, сырье, вода, воздух, вспомогательные вещества, упаковочные материалы, производственные помещения, оборудование, питательная среда, посевной материал, пеногаситель (табл. 4).

Таблица 4

#### Источники попадания микроорганизмов в сферу производства субстанций и готовых лекарственных форм

Субстанция, полученная		Готовые лекарственные формы
микробным синтезом	из лекарственных растений и животного сырья	
Питательная среда	Сырье	Персонал
Добавки	Оборудование	Оборудование
Посевной материал	Персонал	Вода
Воздух	Растворители	Производственные помещения
Пеногаситель		Воздух
Оборудование		Вспомогательные вещества
Персонал		Упаковочные материалы

На этапах химического синтеза фармацевтических субстанций риск микробной контаминации минимален из-за жестких условий, агрессивных компонентов и отсутствия питательных веществ.

### 4.2. Воздух как источник контаминации объектов фармацевтического производства

#### 4.2.1. Причины попадания микроорганизмов в сферу производства с воздухом

Воздух производственных помещений в зависимости от степени подготовки можно разделить на атмосферный, вентиляционный и

технологический. Атмосферный воздух поступает в непроизводственные помещения фармацевтического предприятия из окружающей среды без предварительной очистки. Вентиляционный воздух (прошедший через специальные системы воздухоподготовки атмосферный воздух) подается для вентиляции производственных помещений. Технологический воздух (очищенный от механических частиц и стерилизованный атмосферный воздух) используется в технологических процессах изготовления лекарственных средств: для аэрирования при культивировании клеток-продуцентов, для передвижения технологических жидкостей и сыпучих материалов, для сухожаровой стерилизации материалов первичной упаковки.

Основными причинами попадания микроорганизмов в объекты производства с воздухом являются первичное высокое загрязнение атмосферного воздуха и неэффективность систем воздухоподготовки.

Микроорганизмов в атмосферном воздухе относительно немного, их количество уменьшается с увеличением расстояния от поверхности земли и снижением интенсивности приземных воздушных потоков. Например, в 1 см<sup>3</sup> горного воздуха содержится не более 5 жизнеспособных клеток и спор микроорганизмов, тогда как на оживленной улице города их количество может составлять около 5000. Микроорганизмы выделяются из дыхательных путей с водяными парами, водяной пар конденсируется и высыхает. Пыль увеличивает вероятность возникновения контаминации из воздуха, поскольку на всех твердых частицах могут быть адсорбированы микроорганизмы: количество жизнеспособных форм микроорганизмов в непроветриваемой пыльной комнате составляет около 300 000 клеток и спор.

Борьба с микроорганизмами в воздухе производственных помещений фармацевтических производств включает борьбу с пылью, влажную уборку, проветривание, обеззараживание путем ультрафиолетового облучения. Борьба с пылью важна для обеспечения качества и безопасности лекарственных средств не только из-за их микробной контаминации: механические включения в составе инфузионных и инъекционных лекарственных средств могут привести к образованию тромбов, гранулем, аллергических реакций; особенно опасен асбест как причина злокачественных новообразований. Очень эффективным методом является проветривание, после него загрязненность микроорганизмами падает на 70–80%. Ультрафиолетовое облучение с длиной волны 254 нм, соответствующей области наибольшего бактерицидного действия лучистой энергии, губительно для микроорганизмов, но если последние адсорбированы на частицах пыли или других поверхностях, то они защищены от этого воздействия. Для

очистки воздуха в производственных помещениях используют проветривание (принудительную вентиляцию) прошедшим через систему воздушных фильтров и облучение ультрафиолетовыми лучами воздухом.

На эффективность работы систем воздухоподготовки влияют:

– установка воздухозаборных устройств по высоте и направлению ветра. Чем ближе почва, тем выше вероятность контаминации. Для того чтобы ветром не задувало основные потоки пылевых частиц, воздухозаборные устройства рекомендовано устанавливать на уровне 1,5 м над самой высокой точкой здания;

– техническое решение при конструировании. Применяют многоступенчатые установки с HEPA-фильтрами (High Efficiency Particulate Air (Arrestance, Absorbing) – класс высокоэффективных фильтров для очистки воздуха от частиц, подробнее см. п. 4.2.2), число ступеней выбирают на стадии проектирования в зависимости от требований, представляемых к микробной чистоте воздуха. По GMP необходима трехступенчатая установка с HEPA-фильтрами. Например, грубый фильтр (металлическая сетка), установленный на воздухозаборном устройстве, удерживает 0–40% частиц, имеющихся в воздухе, следующая ступень фильтрования обеспечивает удержание 80–90% частиц (в зависимости от применяемого материала), а последняя (HEPA-фильтр) изымает до 99,9999% частиц и микроорганизмов. Этого обычно достаточно для подачи воздуха в помещение;

– технический уровень эксплуатации, эффективность фильтрующих материалов, установка фильтрующих элементов. При увлажнении фильтрующего материала возможен проскок микроорганизмов вдоль волокон, даже его колонизация;

– расположение в производственном помещении мест подачи и удаления воздушных потоков. Например, для ламинарно вентилируемых помещений (подробнее см. п. 4.2.3) подача воздуха производится сверху (отверстия в верхней части стены или потолке), а удаление – снизу (перфорированный пол, отверстия в стене у пола).

#### **4.2.2. Устройство и эксплуатация HEPA-фильтров**

HEPA-фильтр изготовлен из длинного листа волокнистого материала (диаметр волокон 0,5–5,0 мкм, расстояние между ними 5–50 мкм), сложенного гармошкой, а также корпуса с элементами, удерживающими лист в сложенном состоянии. Получается плотная кассета, собранная из случайно расположенных волокон. HEPA-фильтр задерживает частицы любого размера. Эффективная фильтрация крупных частиц (5 мкм и больше) происходит по механизму сита, а фильтрация мелкодисперсных фракций (0,01–1,00 мкм), когда фильтруемый объект меньше ячейки,



которой он должен удерживаться, происходит за счет адгезии (взаимодействия пыли с волокнами фильтра) и аутогезии (взаимодействия частиц между собой с образованием на волокнах многослойных конгломератов). При адгезии и аутогезии задействовано взаимодействие частиц друг с другом и с волокнами на молекулярном уровне (силы Ван-дер-Ваальса). Самые мелкие частицы обладают небольшой массой, постоянно находятся в хаотичном броуновском движении, в ходе колебаний частица выходит из общего воздушного потока, касается волокна и осаждается за счет эффекта диффузии. Более крупные частицы (с диаметром больше 0,3 мкм) весят больше, они выходят из воздушного потока за счет инерции и сталкиваются с волокном. Частицы с «промежуточным» размером с большей вероятностью остаются в потоке и огибают волокна вместе с воздухом, для их осаждения наибольшее значение имеет эффект зацепления. Он работает, когда частица приблизилась к поверхности волокна на расстояние своего радиуса. Этот механизм универсальный и действует для частиц любого размера.

Эффективность НЕРА-фильтра зависит от характеристик самого фильтра – материала, диаметра и плотности упаковки волокон. Если материал, из которого сделан фильтр, обладает высокой удельной проводимостью, то волокна могут заряжаться в воздушном потоке, возникают силы электростатического притяжения (силы Кулона). При осаждении частиц уменьшается расстояние между волокнами, площадь волокон увеличивается, и с этим связан парадоксальный факт: со временем эффективность НЕРА-фильтра не уменьшается, а растет. При дальнейшем загрязнении уменьшается проницаемость фильтра, увеличивается его сопротивление, растет перепад давления на фильтре и, как следствие, уменьшается производительность прибора, в котором тот установлен, тогда единственный выход – заменить фильтр.

#### **4.2.3. Использование ламинарных режимов движения воздуха**

Системы принудительной вентиляции имеют ограниченную эффективность: если воздух с высокой скоростью подается в помещение через отверстия в стенах или потолке и удаляется через выпускные отверстия у пола, в помещении возникает высокотурбулентный поток с перемешиванием слоев воздуха. Подающийся фильтрованный (стерильный) воздух смешивается с загрязненным воздухом помещения, разбавляя его. Очистка воздуха от загрязнений не достигается, создается лишь избыточное давление, исключающее поступление загрязненного воздуха извне.

Наиболее эффективная очистка достигается при использовании устройств с ламинарным (слоистым) потоком воздуха, когда вся масса

воздуха, заключенная внутри пространства, движется с одинаковой скоростью (около 0,5 м/с) параллельными слоями. Подготовленный стерильный воздух в этом случае вытесняет из ограниченного пространства через открытую сторону все взвешенные частицы. В рабочей зоне создается небольшое избыточное давление, исключающее попадание загрязненного воздуха из помещения. Поток воздуха может иметь горизонтальное или вертикальное направление. Устройства, использующие эффект ламинарного потока воздуха, были разработаны в 1961 году.

Ламинарные шкафы (подробнее в п. 5.2.1) изготавливают из материалов, устойчивых к обработке дезинфектантами, например, из эмалированного стального листа, а рабочий стол – из нержавеющей стали. Передняя стенка рабочей камеры изготавливается из прозрачного, но не пропускающего ультрафиолет материала (поликарбоната или закаленного стекла). Любое ламинарное устройство не является средством стерилизации, оно лишь создает и поддерживает пространство, свободное от взвешенных частиц и микроорганизмов.

В настоящее время реальностью являются целые «чистые» помещения – комнаты, которые впервые нашли применение на предприятиях электронной промышленности и на предприятиях по производству полупроводниковых приборов, а сейчас используются и в фармацевтической промышленности.

#### **4.2.4. Методы микробиологического контроля воздуха**

Для микробиологического контроля воздуха рабочих помещений на фармацевтических производствах используют аспирационный и седиментационный методы отбора проб воздуха. Контроль воздушной среды в помещениях классов чистоты А и В осуществляют аспирационным и седиментационным методом, в помещениях классов С, D, К (не классифицируемых, но контролируемых) – аспирационным.

Аспирационный метод заключается в активном принудительном осаждении микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды. Он осуществляется с использованием импакции – прокачивания заданного объема воздуха через перфорированную пластину на поверхность агаризованной питательной среды. Прибор для отбора пробы воздуха (импактор) с закрепленной чашкой Петри с питательной средой устанавливается или удерживается исполнителем на высоте уровня выполняемых работ, объем проходящего воздуха 1 м<sup>3</sup>. Импактор измеряет и поддерживает скорость воздушного потока 100 л/мин, компенсируя все факторы, которые могут повлиять на эту скорость. Перфорированная крышка прибора содержит 300 отвер-

ствий размером 0,6 мм, через которые всасывается воздух: микроорганизмы из воздуха попадают в разные места питательной среды и, таким образом, после инкубирования выросшие колонии не накладываются друг на друга. Исполнителем при проведении этого метода отбора является микробиолог отдела контроля качества.

Седиментационный метод простой, доступный в любых условиях и помещениях. Он используется для ориентировочной оценки степени обсемененности воздуха и предполагает осаждение микроорганизмов на поверхность полноценной плотной среды под действием силы тяжести. Седиментационный метод отбора осуществляют путем установки в каждой контрольной точке чашек Петри с питательной средой со снятыми крышками (их кладут внутренней стороной на рабочую поверхность тыльной стороной вверх) в течение всего производственного процесса. Каждые 4 ч чашки заменяются для исключения высыхания поверхности питательной среды и ухудшения сохранения микроорганизмов и их культивирования. Исполнитель, ответственный за правильную установку и своевременную замену чашек, – работник цеха.

Контроль воздушной среды осуществляют с использованием двух чашек Петри с агаризованной средой на основе гидролизата казеина и соевых бобов (либо средой № 1) для учета количества бактерий и с декстрозным агаром Сабура (либо средой № 2) для учета количества грибов. Эти чашки Петри после окончания отбора проб воздуха помещают для инкубирования в суховоздушный термостат при 30–35°C и 20–25°C соответственно на 5 сут.

Пределы содержания микроорганизмов в воздухе рабочих помещений приведены в табл. 5.

Таблица 5

**Допустимое количество микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> воздуха помещений фармацевтического производства**

Категория помещения	Состояние помещения			
	Оснащенное		Эксплуатируемое	
	Предупреждающий предел	Предел, требующий принятия мер	Предупреждающий предел	Предел, требующий принятия мер
A	–	Менее 1	–	Менее 1
B	(3) 1	(5) 2	(7) 3	(10) 5
C	(50) 20	(70) 30	(70) 30	(100) 50
D	(90) 30	(130) 50	(130) 70	(200) 100

*Примечание.* В скобках приведено допустимое количество микроорганизмов при контроле воздушной среды аспирационным методом, без скобок – седиментационным методом; присутствие спорообразующих бактерий и грибов не допускается.

Контроль чистого пара, сжатого воздуха, сжатого газа, а также мониторинг частиц в воздухе чистых помещений производятся с помощью приборов, работающих по принципу импакции.

### **4.3. Оборудование и производственные помещения как источник контаминации объектов фармацевтического производства**

#### **4.3.1. Причины контаминации производственных помещений от оборудования**

Микробная контаминация фармацевтической продукции от оборудования возможна при неудовлетворительной подготовке оборудования к работе – некачественной мойке, дезинфекции, стерилизации, при нарушении правил эксплуатации, а также использовании некачественных материалов внутренней поверхности: подверженных биообрастанию и биоповреждению, плохо отполированных.

При получении лекарственной субстанции микробиологическим синтезом контаминация фармацевтической продукции от оборудования для ферментации дополнительно к перечисленным причинам может случиться из-за:

- разгерметизации ферментационного комплекса во время работы;
- конструкционных особенностей оборудования и коммуникаций (трубопроводов), не обеспечивающих стерилизуемость всех точек внутренних полостей:

- а) открытых трубных окончаний для отбора проб из ферментатора, штуцеров малого диаметра, гильз (температура в них при стерилизации меньше, чем в зонах большого диаметра);

- б) придонной части ферментатора (температура при стерилизации ниже за счет скапливающегося конденсата);

- в) несоответствия конструкционных материалов требованиям гарантированной стерильности во всех точках (материал не выдерживает частой стерилизации или дезинфекции);

- г) несоответствия диаметра или длины трубопровода, редкое использование его части;

- д) обрастания застойных зон.

#### **4.3.2. Биоповреждения в фармацевтических и биотехнологических производствах: факторы, объекты и виды повреждений**

Свойства материалов, инструментов и оборудования могут изменяться при хранении и эксплуатации под воздействием физико-

химических, механических и биологических факторов. Эти повреждения возникают параллельно или последовательно, усиливая друг друга.

**Биоповреждение** – это любое нежелательное изменение в свойствах материалов и изделий, вызванное жизнедеятельностью организмов. Живые организмы своей деятельностью вызывают изменения структурных и функциональных характеристик объектов антропогенного происхождения (кирпича, бетона, бумаги, текстильных и полимерных материалов, резины) или природных объектов, используемых в качестве сырья (древесины, шерсти, камня).

Микроорганизмы вызывают активную коррозию в нефтяной промышленности (70% повреждений), разрушение памятников культуры, закупорку магистральных водопроводов и водозаборных сооружений; насекомые и грызуны повреждают кабельные сети, коммуникации и архитектурные сооружения; птицы являются причиной замыканий энергосети и разрушения сталкивающихся с ними самолетов. Ущерб от биоповреждений достигает 5–7% стоимости произведенной продукции. Наиболее активные возбудители повреждений – мицелиальные грибы и бактерии, на долю которых приходится до 20% от общего числа повреждений.

Основными типами биоповреждений являются механический (например, повреждение дорожных покрытий грызунами, насекомыми, растениями) и химический. Химический тип биоповреждений подразделяют на ассимиляционный и диссимиляционный. Типичным примером биоповреждений ассимиляционного типа является использование живыми существами в качестве источника питательных веществ субстратов типа древесины, кератина, шерсти. К диссимиляционному типу биоповреждений относятся повреждения, произошедшие под действием какого-либо продукта метаболизма живого организма (например, лишайники повреждают керамическую черепицу при действии выделяемой ими щавелевой кислоты) либо участие живых организмов в одной или нескольких электрохимических реакциях на поверхности металлов или сплавов.

Повреждение материала микроорганизмами начинается с адгезии их на поверхности материала. Для того чтобы живой организм начал воздействовать на материал или изделие, нужны определенные экологические условия: наличие подходящего субстрата, благоприятные кислотность, температура, влажность. В природных условиях в микробной коррозии обычно участвует не один вид, а ассоциация микроорганизмов: аэробов и анаэробов, взаимно влияющих друг на друга и усиливающих свой рост и активность в зависимости от окружающих

условий. Состав микробиоты определяется составом субстрата и условиями среды. В благоприятных для них условиях микроорганизмы, размножаясь, колонизируют поверхность. Это явление называется **биообрастанием**. В результате их жизнедеятельности происходит повреждение и далее разрушение поверхности материала. Этому способствуют наличие механических повреждений и накопление воды, изменяющей свое агрегатное состояние (замерзание и оттаивание).

Биоповреждение с участием микроорганизмов может происходить путем:

- использования материала в качестве субстрата для роста;
- непосредственного воздействия продуктов метаболизма микроорганизмов ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$ , органических и неорганических кислот, образования хелатных комплексов между минералами и органическими кислотами, экзополимерами, выделяемыми микроорганизмами) на металлические и неметаллические конструкции. Такой механизм микробиологической коррозии реализуется некоторыми аэробными микроорганизмами: бактериями, грибами и водорослями. Наиболее активно коррозию этого типа осуществляют прокариоты: нитрификаторы (окисляют аммиак до нитрит-ионов, нитрит-ионы до нитрат-ионов), серобактерии (окисляют восстановленные соединения серы), железобактерии (окисляют двухвалентное железо до трехвалентного);
- образования органических продуктов, которые могут действовать как деполяризаторы или катализаторы коррозионных реакций;
- протекания коррозионных реакций, являющихся отдельной частью метаболического цикла бактерий. Такой процесс обуславливают, например, сульфатредуцирующие бактерии, способные получать энергию за счет окисления в анаэробных условиях водорода, используя в качестве конечного акцептора электронов сульфат-ионы. Для осуществления этого процесса требуются анаэробные условия (окислительно-восстановительный потенциал менее  $-200$  мВ) и нейтральный pH.

Для защиты материалов от биоповреждений используют физические, химические и комплексные методы.

К физическим методам относятся поддержание низкой влажности, стерилизация нагреванием, радиационным и ультрафиолетовым облучением, ультразвуковые и акустические методы, электрохимическая (катодная) защита, а также использование защитных «рубашек» – непроницаемых физических барьеров между материалом и окружением (полиэтилен, поливинилхлорид, битум, лакокрасочные покрытия).

Химические методы основаны на использовании дезинфектантов в биоцидных и биостатических концентрациях (формальдегида, фено-

лов и их производных, хлорсодержащих соединений), ингибиторов коррозии (алифатических и ароматических соединений, имеющих в составе атомы серы, азота, кислорода), гидрофобизаторов. Химические методы борьбы с биоповреждениями включают также разработку и использование материалов, не подверженных или слабо подверженных воздействию микро- и макроорганизмов (например, металлических сплавов).

Комплексные методы защиты от биоповреждений включают комбинации физических и химических методов.

Наилучшей защитой при хранении и эксплуатации материалов и оборудования служит создание условий, препятствующих развитию микроорганизмов. Загрязнение, нарушение целостности поверхности материалов могут стимулировать биообрастания и биоповреждение, поэтому общим способом борьбы с ними является соблюдение санитарно-гигиенических правил при производстве, хранении и эксплуатации материалов и изделий, своевременное выявление и устранение биоповреждений в начальной стадии.

#### **4.3.3. Методы микробиологического контроля поверхностей оборудования и помещений**

Контроль поверхностей оборудования и помещений осуществляют с использованием контактного метода (метода отпечатков) и метода смывов.

Контактный метод осуществляют с использованием контактных чашек (либо пластин, либо полосок) известной площади ( $25 \text{ см}^2$ ) с агаризованной средой путем прикладывания их к контролируемой поверхности на несколько секунд при одинаковом давлении на исследуемую поверхность без поворота. Место отбора проб персоналом чистой зоны очищается от остатков питательной среды и дезинфицируется 76%-м этанолом.

Для метода смывов используют стерильные трафареты площадью  $50 \text{ см}^2$ , с использованием одного трафарета и одного стерильного ватного тампона делают один смыв. В труднодоступных местах и с мелких предметов смыв производят со всей поверхности одним тампоном. Каждый тампон после процедуры смыва помещают во флакон с 10 мл фосфатного буферного раствора, интенсивно встряхивают и используют жидкость из флакона следующим образом:

– по 1 мл помещают в 2 чашки Петри с агаризованной средой на основе гидролизата казеина и соевых бобов (либо средой № 1) и с декстрозным агаром Сабуро (либо средой № 2);

– 2 мл используют для проведения испытания на наличие бактерий семейства Enterobacteriaceae;

– 2 мл используют для проведения испытания на наличие бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

Пределы содержания микроорганизмов на поверхностях оборудования и стен рабочих помещений при контроле контактным методом приведены в табл. 6.

Таблица 6

**Допустимое количество микроорганизмов на 25 см<sup>2</sup> поверхности оборудования и стен помещений фармацевтического производства**

Категория чистоты помещения	Оборудование		Стены помещений	
	Эксплуатируемое состояние	Оснащенное состояние	Эксплуатируемое состояние	Оснащенное состояние
A	–	Менее 1	–	Менее 1
B	2	3	3	5
C	10	15	15	25
D	15	25	25	50

*Примечание.* Присутствие спорообразующих бактерий и грибов, бактерий семейства Enterobacteriaceae, бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* не допускается.

Характеристика бактерий семейства Enterobacteriaceae и бактерий *Staphylococcus aureus* как санитарно-показательных микроорганизмов приведена в п. 3.2 и 3.4 соответственно. *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) – грамотрицательная палочковидная бактерия, строгий аэроб, обладающий ферментом цитохромоксидазой, способный расти при температуре 42°C, редуцирующий нитраты в нитриты, образующий водорастворимый пигмент пиоцианин (сине-зеленый). Эта бактерия широко распространена в окружающей среде: почве, воде, на поверхности растений, может входить в состав нормальной микрофлоры кишечника человека и животных, считается основным возбудителем инфекционных заболеваний, вызываемых псевдомонадами. Изначально *P. aeruginosa* была предложена как показатель фекального загрязнения, однако ее присутствие скорее свидетельствует об общем загрязнении органическими остатками.

#### **4.4. Сырье как источник контаминации объектов фармацевтического производства**

По происхождению сырье для фармацевтических производств делится на синтетическое (получаемое методами химического синтеза) и



природное. Последнее включает сырье животного (железы внутренней секреции, прополис, воски), растительного (цветки, трава лекарственных растений) и минерального (калийные и натриевые соли, мел, кислоты) происхождения.

Лекарственное сырье растительного происхождения – это высушенные, реже свежие цельные лекарственные растения или их части, используемые для промышленного производства, на которые имеются соответствующие документы о качестве (монографии, фармакопейные статьи). Оно содержит биологически активные (БАВ) и побочные вещества: алкалоиды, гликозиды, витамины, сапонины, слизи, флавоноиды, жирные и эфирные масла, пектины, камеди, смолы, органические кислоты, полисахариды, дубильные вещества. Лекарственное растительное сырье заготавливают как от дикорастущих, так и от культивируемых лекарственных растений. Используются надземные (сбор в фазу цветения – трава, листья, цветки, почки, кора, плоды, семена, ягоды) и подземные (сбор весной или осенью – корни, корневища, клубни, луковицы) органы в свежем и высушенном виде. Качество такого сырья определяют по внешним признакам и числовым показателям, из которых основным является содержание действующих веществ.

Сырье животного происхождения используется для изготовления питательных сред (экстракты, отвары, кровь), в производстве вирусных вакцин (почки морских свинок и обезьян), для получения желатина (кости, хрящи), в качестве основного сырья для получения органопрепаратов (поджелудочная железа в производстве панкреатина).

Сырье минерального происхождения используется в качестве основного (хлорид натрия, иодид калия) и вспомогательного (бентонит, тальк) сырья, компонентов питательных сред в микробном синтезе (источники азота, фосфора, микроэлементов).

#### **4.4.1. Микробиота животного, растительного, синтетического сырья**

Типичная микробиота лекарственного растительного сырья представлена эпифитными и фитопатогенными микроорганизмами.

Эпифитная микробиота – микроорганизмы, развивающиеся в норме на поверхности растения и не приносящие ему вреда: они не проникают внутрь тканей, растут за счет обычных выделений растений и органических загрязнений поверхности. Многие устойчивы к фитонцидам, высушиванию, ультрафиолетовому облучению и составляют конкуренцию фитопатогенным микроорганизмам. В норме обнаруживают бактерии родов *Cromobacterium*, *Phytomonas*, *Pseudomonas*,

*Bacillus*, некоторые виды грибов. Состав эпифитной микробиоты зависит от высоты стебля, вида и возраста растения, типа почвы, климатических особенностей.

Фитопатогенная микробиота представлена микроорганизмами – возбудителями заболеваний растений: бактериями рода *Erwinia*, вызывающими болезни типа ожога, увядания, мокрой гнили; рода *Pseudomonas* – бактериальную пятнистость; рода *Agrobacterium* – образование опухолей; рода *Corynebacterium* – бактериальный рак; грибы – мучнистую росу, гниль, спорынью; вирусы – мозаику, желтуху, карликовость, морфологические изменения.

Численность представителей микробиоты увеличивается с ростом влажности растительного сырья.

Кроме эпифитной и фитопатогенной микробиоты, в лекарственное растительное сырье попадают случайные представители бактерий и грибов, имеющие адаптивные возможности к размножению на растительных объектах – деструкторы. Они могут попадать в органы и ткани растений при его жизни (в результате механических повреждений, через устьица) и на всех этапах заготовки и хранения (во время сбора, первичной обработки, сушки, измельчения, упаковки, получения резаного сырья, растительных порошков, брикетов и гранул, хранения и транспортировки). Наиболее часто встречаются представители мицелиальных грибов (родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*) вследствие высокой способности у них к выделению различных ферментов гидролитического действия. При наличии благоприятных условий (влажность более 70% и температура более 20°C) их численность быстро увеличивается, приводя к порче сырья:

- изменению клеточных структур и химического состава тканей;
- размягчению и разрушению отдельных участков тканей;
- появлению налета;
- изменению цвета: пожелтению, потемнению, пятнистости;
- снижению содержания БАВ (листья наперстянки под действием деструкторов могут утрачивать до 50%, ландыши – около 30%), использование такого сырья становится невозможным.

В составе животного сырья есть представители нормальной и транзитной (случайной) микробиоты, а также микроорганизмы, оказавшиеся и размножившиеся в сырье из-за нарушения правил транспортировки и хранения. Среди представителей нормальной микробиоты можно назвать аэробные и факультативно анаэробные бактерии (семейства *Enterobacteriaceae*, родов *Pseudomonas*, *Clostridium*), вирусы (аденовирусы, энтеровирусы, вирус герпеса у обезьян), прионы. Пред-

ставители транзиторной микробиоты попадают в сырье при жизни из-за нарушения условий содержания (травмы, снижение иммунитета, утомленность), а также в процессе и сразу после убоя (с поверхности инструментов, с рук персонала, с оборудования для первичной разделки туш). Наибольшую опасность среди транзиторной микробиоты представляют условно-патогенные и патогенные виды: бактерии *Bac. cereus*, *Cl. perfringens*, *Salmonella sp.*, *Proteus sp.*, *Aeromonas sp.* Количество микроорганизмов на поверхности животного сырья может достигать  $10^3$ – $10^5$  кл./см<sup>2</sup> сырья, многие сохраняют жизнеспособность при длительном замораживании (бактерии рода *Salmonella* сохраняют жизнеспособность в замороженном мясе 13 месяцев, а в яйце – 12 месяцев). Признаками поражения тканей сырья животного происхождения микроорганизмами являются изменение цвета и консистенции, появление налета и характерного запаха.

Сырье минерального происхождения не содержит питательных компонентов для большинства микроорганизмов (хемоорганогетеротрофов), многие виды этого сырья практически не содержат влаги и даже ингибируют и инактивируют живые клетки, поэтому микробиота его представлена немногочисленными случайно попавшими микроорганизмами.

Вспомогательные вещества и сырье минерального происхождения могут стать причиной микробной контаминации в случае получения их в ненадлежащих условиях и нарушения требований к хранению и транспортировке.

#### **4.4.2. Возможные отрицательные последствия использования контаминированного сырья и его микробиологический контроль**

Последствия применения контаминированного лекарственного растительного и животного сырья:

- отсутствие терапевтического эффекта;
- развитие аллергических реакций;
- возникновение инфекционных заболеваний;
- развитие токсических реакций.

Для исключения контаминации полупродуктов и готовых лекарственных форм все сырье животного и растительного происхождения подлежит контролю в соответствии с требованиями государственной фармакопеи. Критерии приемлемости для микробиологической чистоты нестерильных субстанций для фармацевтического использования зависят от вида сырья, возможности его обеззараживания, специфики лекарственного средства, получаемого на основе

этого сырья (ГФ РБ II, Т. 1, 2012 г., табл. 5.1.4-1). В сырье синтетического происхождения и вспомогательных веществах допускается не более  $10^3$  КОЕ/г (КОЕ/см<sup>3</sup>), выросших на агаризованной среде на основе гидролизата казеина и соевых бобов (либо среде № 1), не более  $10^2$  КОЕ/г (КОЕ/см<sup>3</sup>), выросших на агаризованной среде Сабуро (либо среде № 2), бактерии *Escherichia coli* в 1 г или 1 см<sup>3</sup> должны отсутствовать. В сырье природного происхождения (растительного, животного, минерального), для которого предварительная антимикробная обработка невозможна, допускается не более  $10^4$  КОЕ/г (КОЕ/см<sup>3</sup>), выросших на агаризованной среде на основе гидролизата казеина и соевых бобов (либо среде № 1), не более  $10^2$  КОЕ/г (КОЕ/см<sup>3</sup>), выросших на агаризованной среде Сабуро (либо среде № 2). Бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* в этом виде сырья должны отсутствовать в 1 г или в 1 см<sup>3</sup>; бактерии рода *Salmonella* – отсутствовать в 10 г или 10 см<sup>3</sup>; допускается содержание не более  $10^2$  КОЕ/г (КОЕ/см<sup>3</sup>) грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, либо бактерий семейства Enterobacteriaceae.

#### **4.4.3. Вода как один из видов сырья в фармацевтическом производстве**

Вода в фармацевтическом производстве используется как основное (компонент питательных сред в биотехнологических процессах, компонент готовых лекарственных форм) и как вспомогательное (растворитель в процессах химического синтеза, процессах выделения и очистки биологически активных веществ, для санитарной подготовки оборудования и помещений, приготовления растворов дезинфектантов и антисептиков) сырье.

##### **4.4.3.1. Виды воды, используемые в производстве лекарственных средств.** В фармацевтическом производстве используют:

- питьевую воду из центральных систем хозяйственно-питьевого водоснабжения (компонент питательных сред при микробном синтезе);
- очищенную воду (получают из питьевой методами дистилляции, ионного обмена, обратного осмоса, электролиза);
- высокоочищенную воду (получают из питьевой воды методами подвижного обратного осмоса, ультрафильтрации, деионизации);
- воду для инъекций (получают из очищенной или питьевой воды на оборудовании, контактирующая поверхность которого выполняется из нейтрального стекла, кварца или металла с эффективным приспособлением для захвата капель, используют для изготовления стерильных лекарственных форм).

**4.4.3.2. Требования к микробиологической чистоте различных видов воды.** В табл. 7 приведены требования, предъявляемые к используемой в фармацевтическом производстве воде.

Таблица 7

**Требования, предъявляемые к воде в фармацевтическом производстве**

Требование	Вода питьевая	Вода очищенная	Вода высокоочищенная	Вода для инъекций
Руководящий документ	СанПиН 124-10 99	Требования фармстатей ГФ РБ, Т. 2, 2007 г., с. 93–100		
Допустимое содержание микроорганизмов в 1 см <sup>3</sup> , не более	50	100	10	10 (может возникнуть необходимость в более жестких пределах)
Санитарно-показательные микроорганизмы	(См. п. 3.2)	Не определяются		
Условно-патогенные микроорганизмы	Не определяются	Отсутствие всех представителей семейства Enterobacteriaceae, бактерий <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Дополнительные требования		Нет		Апирогенность

Более высокое допустимое содержание микроорганизмов в воде очищенной по сравнению с их допустимым содержанием в питьевой воде связано с неизбежным загрязнением ее во время хранения в резервуарах, количество микроорганизмов может достигать 10<sup>5</sup> кл./см<sup>3</sup>.

Оценка качества воды для инъекций производится по следующим химическим и микробиологическим показателям: стерильность, апирогенность, рН, наличие восстанавливающих веществ, углекислого ангидрида, нитритов, нитратов, хлоридов, сульфатов, кальция и тяжелых металлов; концентрация аммонийного азота и сухого остатка (растворенных веществ) должны быть в пределах установленных норм.

Приведенное в табл. 7 допустимое содержание микроорганизмов в 1 см<sup>3</sup> апирогенной воды (не более 10) относится к контролю ее качества при хранении.

**4.4.3.3. Микробные пирогены, их химическая природа и свойства. Методы обнаружения пирогенов и депирогенизации. Пирогены** – это продукты жизнедеятельности и распада микроорганизмов, погибшие микробные клетки. В химическом отношении пирогены представляют собой липополисахаридные или липополисахаридно-

протеиновые комплексы мембран микроорганизмов, в основном – грамотрицательных бактерий, реже – клеточно-тканевые продукты эндогенного происхождения и экзогенные клеточные продукты, выделяющиеся в процессе жизнедеятельности микроорганизмов. Молекулярная масса таких фрагментов клеток составляет до  $8 \cdot 10^6$  Да.

При введении раствора, содержащего пирогены, в макроорганизм мобилизуется врожденный иммунитет и начинается каскад воспалительных реакций: повышается температура тела, иногда артериальное давление, появляются другие симптомы (озноб, рвота, понос).

Пирогенные вещества термостойкие (разрушаются при 250–300°C в течении 1–2 ч), нелетучие (с водяным паром не перегоняются), фосфолипидная часть придает им отрицательный заряд, поэтому они могут адсорбироваться на положительно заряженных фильтрующих материалах.

**Апирогенность** – отсутствие пирогенных веществ, которые вызывают лихорадочное состояние организма при внутрисосудистом введении. Она достигается жестким соблюдением правил асептики, а также применением апирогенной воды для инъекций и апирогенных компонентов лекарственных средств.

Апирогенная вода должна выдерживать испытание на пирогенность биологическим методом (ГФ РБ, Т. 1, 2012 г., раздел 2.6.8) либо испытание на бактериальные эндотоксины (ГФ РБ, Т. 1, 2012 г., раздел 2.1.14).

Испытание на пирогенность биологическим методом состоит в измерении роста температуры тела трех здоровых взрослых кроликов массой не менее 1,5 кг, вызванного внутривенным введением стерильного раствора испытуемого образца. Вводимый объем – 0,5–10,0 см<sup>3</sup> на 1 кг массы тела. Испытание является качественным.

Биологический метод определения апирогенности имеет недостатки:

- необходимость содержать большое количество кроликов в строго регламентированных условиях;
- значительные колебания индивидуальной чувствительности кроликов к пирогенам;
- более сильное восприятие пирогенной реакции человеком по сравнению с кроликом;
- высокая стоимость анализа.

Предпочтение отдается испытанию на бактериальные эндотоксины, или ЛАЛ-тесту (сокращенное от лизат амебоцитов лимулюс – *Limulus polyphemus* (мечехвоста)). Это испытание может быть качественным и количественным.

Существует три способа проведения данного испытания: способ гель-тромба, турбидиметрический и хромогенный способы. Испытание может быть выполнено любым из них. В сомнительных и спорных случаях арбитражным является испытание на бактериальные эндотоксины, проведенное гель-тромб методом. В основе этого испытания лежит процесс физико-химического взаимодействия эндотоксинов микробного происхождения с лизатом клеток (амебоцитов) крови мечехвоста, в результате которого происходит образование геля. Гель обнаруживается по увеличению вязкости смеси.

Очень важна профилактика образования пирогенных веществ, которая достигается:

- созданием асептических условий изготовления;
- строгим соблюдением правил санитарного режима и поведения персонала;
- депирогенизацией трубопроводов;
- правильным хранением инструментов;
- депирогенизацией минеральных (NaCl) и других термостабильных веществ.

Методы депирогенизации делят на химические, физические и физико-химические.

Химические методы депирогенизации включают обработку поверхностей пероксидом водорода при кипении, 1%-м раствором  $\text{KMnO}_4$  в кислой среде в течение 30 мин, нагревание объектов депирогенизации в щелочной или кислой среде. При этих условиях обработки одновременно с пирогенами разрушаются и органические вещества лекарственного средства, поэтому методы используются для обработки стеклянных соединений, трубок, узлов и комплектующих оборудования.

Физические методы депирогенизации охватывают перегонку с исключением попадания капельной влаги в отгоняемый пар и мембранные методы (ультрафильтрацию, обратный осмос).

К физико-химическим методам относят адсорбцию на активированном угле, каолине, асбесте и ионообменных смолах, удержание пирогенных частиц диэлектрическими материалами, стерилизацию ионизирующим излучением. При реализации этих методов органические вещества лекарственного средства адсорбируются, часто возникает необходимость очистки депирогенизированных растворов от механических включений.

Для получения воды для инъекций, одним из определяющих свойств которой является апиrogenность, чаще всего используют пе-

регонку с исключением попадания капельной влаги в отгоняемый пар. Система для перегонки (аквадистиллятор) включает испаритель перегоняемой воды, сепаратор пара от капельной влаги, конденсатор пара с получением апиrogenной воды и сборник для нее.

Главная задача перегонки – отделение капель воды от паровой фазы при прохождении водяного пара через пленочные, центробежные и другие сепараторы. Пленочные сепараторы состоят из набора пластинок, через зазоры которых проходит пар, а капли и твердые частицы оседают на наклонных пластинах и стекают в кипящую воду. В центробежных сепараторах создается вращательное движение пара, под действием ускорений капли влаги отделяются и опускаются в нижнюю часть аппарата.

Использование метода дистилляции для получения воды для инъекций обеспечивает высокую степень очистки, надежность, возможность получения горячей апиrogenной воды, однако имеет сравнительно высокую стоимость, за счет большого потребления энергии и воды неэкономичен. Метод обратного осмоса экономичен, но возможна микробная контаминация из-за биообрастания материала мембран, необходима их частая замена (2–4 раза в год).

Качество апиrogenной воды улучшается при использовании водоподготовки для перегоняемой воды (очистки воды перед дистилляцией путем удаления из нее солей, ПАВ и других веществ), при этом уменьшается пенообразование, количество накипи и увеличивается срок службы дистилляторов.

**4.4.3.4. Основные пути микробного загрязнения воды и способы его предотвращения.** Питьевая вода, используемая в качестве сырья для получения остальных видов воды в производстве, не стерильна и может стать причиной контаминации при ее непосредственном использовании в микробном синтезе. Процессы, используемые для водоподготовки очищенной, высокоочищенной воды и воды для инъекций, приводят к удалению или инаktivации всех живых клеток. Единичные клетки микроорганизмов попадают в воду в процессе водоподготовки, затем могут прикрепляться к внутренним стенкам емкости при хранении и, размножаясь, формировать биопленки практически в любых местах соприкосновения твердых тел с жидкостями и газами. Грамотрицательные палочки способны размножаться при концентрации питательных веществ  $0,26 \text{ мкг/см}^3$  (требования для воды очищенной по общему органическому углероду – не более  $0,5 \text{ мг/дм}^3$ ). Максимальный срок хранения воды для инъекций составляет 24 ч в асептических условиях.



Меры по предупреждению контаминации воды микроорганизмами на стадии ее подготовки:

- правильная организация системы водоподготовки;
- выбор материалов трубопроводов (нержавеющая сталь, стекло, полимерные материалы особого изготовления и другие инертные материалы);
- соединение и расположение трубопроводов должно обеспечивать возможность стерилизации путем пропускания чистящих и стерилизующих растворов со скоростью не менее 1,5 м/с в трубах наибольшего диаметра.

Меры по предупреждению контаминации воды микроорганизмами на стадии ее хранения:

- хранят в закрытых емкостях, изготовленных из инертных материалов (полипропилен, стекло, тефлон);
- воду для инъекций хранят при температуре 3–7°C или 80–95°C. В случае длительного хранения воды для инъекций организуют ее циркуляцию при температуре 85–90°C;
- устанавливают и подтверждают время хранения, обеспечивающее сохранение свойств воды в соответствии с действующими нормативными документами.

#### **4.5. Упаковочные материалы как источник контаминации объектов фармацевтического производства**

К упаковочным материалам относятся:

- первичная (индивидуальная) упаковка – непосредственно контактирует с лекарственным средством и обеспечивает длительную защиту препарата от воздействий окружающей среды (контурные ячейковые упаковки из поливинилхлорида и фольги алюминиевой, ампулы и флаконы из стекла, тубик-капельницы из полиэтилена);
- вторичная упаковка – объединяет некоторое количество первичных (пачка);
- транспортная упаковка – служит для доставки продукции к месту хранения и реализации.

##### **4.5.1. Причины, по которым упаковочные материалы могут стать источником загрязнения микроорганизмами**

Причины контаминации упаковочного материала:

- неправильно выбран материал для изготовления (должен быть устойчив к биодegradации);

- адаптивная способность микроорганизмов использовать упаковочный материал в качестве субстратов в метаболических процессах;
- нарушение условий хранения (стеклянные флаконы и ампулы при хранении во влажных условиях контаминируются бактериями и грибами).

#### **4.5.2. Микробиологический контроль материалов первичной упаковки**

Контроль материалов первичной упаковки лекарственных средств осуществляют путем испытания 10 единиц объектов первичной упаковки.

Для контроля материалов первичной упаковки стерильных лекарственных средств объемом менее 20 см<sup>3</sup> (ампулы, флаконы, тубик-капельницы, укупорочные материалы, бутылки) на месте отбора помещают стерильным пинцетом в стерильные колбы с 350 см<sup>3</sup> жидкой питательной среды № 1 и № 2 по 5 единиц. Для контроля флаконов объемом до 400 см<sup>3</sup>, используемых в качестве материалов первичной упаковки, их на месте укупоривают стерильными пробками, подготовленными в боксе микробиологической лаборатории, затем в ламинарной зоне бокса заполняют по 5 единиц средой № 1 и № 2. Инкубируют при 30–35°C и 20–25°C соответственно 14 сут. Первичная упаковка должна быть стерильна. Дополнительно проводят испытания на отсутствие механических включений и пирогенность.

Для контроля материалов первичной упаковки нестерильных лекарственных средств каждый отобранный образец в боксе микробиологической лаборатории ополаскивают 10 мл фосфатного буферного раствора с хлоридом натрия и пептоном. Каждую пробу смывной жидкости испытывают на суммарное количество жизнеспособных аэробов и специфических микроорганизмов (спорообразующих бактерий и грибов, бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*) методом мембранной фильтрации. Допустимое количество жизнеспособных клеток, смытых с 10 единиц бутылок, флаконов, туб, ваты (3 г), укупорочных материалов – не более 30 КОЕ, с поливинилхлоридной пленки, алюминиевой фольги, ламинированной бумаги, комбинированного материала (100 см<sup>2</sup>) – не более 50 КОЕ, специфические микроорганизмы должны отсутствовать. Дополнительно проводят испытание на отсутствие механических частиц.

#### **4.6. Посевной материал как источник контаминации объектов фармацевтического производства**

Посевной материал представляет собой культуры микроорганизмов (прокариот и эукариот), животных, растений. Он может быть контаминирован представителями всех групп микроорганизмов: бактериями, мицелиальными и дрожжеподобными грибами, вирусами эукариот и фагами прокариот. Единственной причиной контаминации посевного материала является несоблюдение правил асептики при работе с культурами-продуцентами.

#### **4.7. Персонал как источник контаминации объектов фармацевтического производства**

##### **4.7.1. Характеристика микробиоты основных биотопов тела человека, поставляющих микроорганизмы в производственную среду**

Человек – носитель разнообразной и многочисленной микробиоты (постоянной и случайной) и активный участник технологического процесса производства лекарственных средств, поэтому именно он является основным источником контаминации объектов фармацевтического производства микроорганизмами и механическими частицами.

Человек рождается стерильным. В первые часы жизни происходит заселение его тела различными микроорганизмами. Постоянная микробиота человеческого тела – эволюционно сформированная характеристика для конкретных биотопов тела здорового человека, примерно постоянная для людей одного возраста и пола. Количественный и качественный состав постоянной микробиоты зависит от пола, возраста, социальных условий, состояния нервной и сердечно-сосудистой системы, особенностей питания. На протяжении жизни эта микробиота несколько раз меняется. В состав нормальных обитателей входят и условно-патогенные микроорганизмы, способные вызывать заболевания при снижении иммунитета. Тем не менее, в организме человека содержится большое количество различных специфичных антимикробных факторов, сдерживающих неконтролируемое развитие этой микробиоты. Некоторые полости человеческого организма благодаря им остаются стерильными: сердечная и кровеносная системы, головной и спинной мозг, лимфатическая система, спинномозговая жидкость, мочевого пузыря, полости среднего уха, матка, глубокие ткани, синовиальные жидкости суставов.

Постоянная микробиота кожных покровов представлена в основном эпидермальными и сапрофитными стафилококками – *St. epidermicus*, *St. saprophyticus*, встречаются представители родов *Micrococcus* и *Sarcina* (могут вызывать гнойно-воспалительные заболевания), *Corynebacterium*, *Propionibacterium*. Местами их постоянного обитания являются роговой слой, протоки сальных желез, волосяные мешочки. У некоторых людей обнаруживаются непатогенные бактерии рода *Streptococcus*. В местах выхода потовых желез присутствуют непатогенные кислотоустойчивые бактерии рода *Mycobacterium*, в складках кожи – дрожжеподобные грибы рода *Candida*. У некоторых людей (10–20%) на коже встречается *St. aureus*, что оценивается как резидентное носительство, однако чаще стафилококки колонизируют не кожу, а слизистые носа, верхних дыхательных путей и языка.

Волосистая часть головы по видовому составу бактерий похожа на микробиоту кожи открытых участков. Дополнительно в области роста волос обнаруживаются дерматофиты: мицелиальные грибы родов *Epidermiphyton*, *Microsporum* и *Trichophyton*. На поверхности волосистой части головы могут встречаться дрожжеподобные грибы *Pityrosporum ovale*.

Микробиота полости рта очень разнообразна вследствие благоприятных условий для роста и размножения (температура, влажность, источники питания), она имеет значение в развитии заболеваний слизистой оболочки, зубов и пародонта. Сдерживают развитие микроорганизмов бактерицидные компоненты среды (например, лизоцим в слюне), однако у иммунодефицитных людей факторы защиты слабо выражены. В составе микробиоты полости рта встречаются представители:

– кокков: *Streptococcus sp.* (ферментируют углеводы с выделением кислых продуктов, что приводит к декальцинированию зубной эмали, синтезируют из сахарозы полисахариды, с помощью которых происходит прикрепление кокков к ткани зуба), *Peptococcus sp.* (обладают слабой сахаролитической активностью), анаэробные грамотрицательные кокки *Veilonella sp.* (разлагают пировуват, лактат и ацетат до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O);

– палочек: грамположительных: *Lactobacillus sp.* (активные кислотообразователи), анаэробных грамотрицательных: *Bacteroides sp.* (обладают коллагеназами и гиалуронидазами, имеют значение в развитии пародонтоза), у некоторых людей встречаются представители *Corynebacterium sp.* (понижают окислительно-восстановительный потенциал и способствуют росту анаэробов);

– извитые формы: представлены Spirochaetales, *Treponema denticola*, *Tr. orale*, *Borrelia bucalis*.

Микробиота полости носа включает бактерии родов *Corynebacterium*, грамотрицательные кокки из непатогенных *Neisseria sp.*, *Staphylococcus sp.* (у некоторых людей резидентное носительство), аденовирусы. В гортани преобладают негемолитические представители *Streptococcus sp.*, в тканях миндалин присутствуют аденовирусы.

Глаз – сложный оптический прибор, присутствие большого количества микроорганизмов может нарушить его работу. Слизистая глаза в небольших количествах содержит лизоцим. Микробиота глаза представлена непатогенными представителями рода *Staphylococcus sp.*, встречается *Corinebacterium xeroris*.

Во внутреннем и среднем ухе микроорганизмов нет. В наружном ухе встречается некоторое количество кислотостойких микроорганизмов, представители *Pseudomonas sp.*, дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

Наиболее обсемененной является кожа открытых частей тела: руки (особенно первые фаланги трех рабочих пальцев, ладонная впадина, межпальцевые пространства, кожа у запястий и под ногтями), лицо (у крыльев носа), шея.

Количество микробиоты зависит от природы биотопа: количество жизнеспособных клеток на 1 см<sup>2</sup> кожи головы – до 10<sup>9</sup>, на 1 см<sup>2</sup> подмышечной области – до 10<sup>5</sup>, на 1 см<sup>2</sup> кожи спины – до 300.

Постоянная микробиота не может быть полностью удалена с поверхности кожи механическим путем при умывании. В первые часы после мытья количество микробных клеток полностью восстанавливается.

Структура кожи такова, что постоянно происходит процесс естественного обновления поверхностного слоя эпидермиса, он полностью обновляется за 4 дня. В процессе слущивания с поверхности кожи человека отделяется от 6 до 14 г частиц в сутки. С кожи мужчин выделяется большее количество микроорганизмов, а с кожи женщин – большее количество частичек. Количество частичек зависит не только от количества персонала в помещении, но и от вида выполняемой ими работы (чем интенсивней работа, тем больше выделения), а также от используемой технологической одежды (зависит от ткани, способа обработки швов и краев, степени изношенности).

#### **4.7.2. Пути попадания и причины возможной контаминации объектов производства от персонала**

Основные пути попадания микроорганизмов от персонала в сферу производства включают:

– воздушно-капельный (с выделениями из полости рта и верхних дыхательных путей);

– воздушно-пылевой и контактный (с участков кожи, не защищенных одеждой – шеи, лица, кистей рук, а также с индивидуальной технологической одежды).

Выделяют следующие причины контаминации объектов фармацевтического производства от персонала:

– человеческий организм – естественная среда обитания микроорганизмов (см. п. 4.7.1);

– технологические операции выполняются людьми, страдающими заболеваниями желудочно-кишечного тракта, кожи, дыхательных путей, а также имеющими повышенную потливость либо сухость кожных покровов;

– отсутствие или неудовлетворительное состояние технологической одежды, ее неудовлетворительная подготовка;

– несоблюдение персоналом требований к личной и производственной гигиене;

– несоблюдение правил поведения в ходе технологического процесса;

– неправильный подбор или обучение персонала, без учета характера человека и особенности работы его нервной системы.

Очаги заболеваний дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, кожи выявляют в результате систематического медицинского обследования персонала фармацевтических предприятий. Важно выявление и профилактика заболеваний, протекающих как в «острой», так и в хронической стадии: кариозных зубов, воспалительных заболеваний мочевыводящих путей, тонзиллита, бронхита и т. д. Обязательный минимум обследования включает общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, анализ крови на RW (реакцию Вассермана) и на антитела к ВИЧ, флюорографию грудной клетки, электрокардиограмму, заключение стоматолога о санации полости рта, заключение гинеколога и терапевта.

Одежда для чистых помещений предназначена для защиты технологического процесса, продукта и производственной среды от загрязнений, выделяемых человеком, для защиты человека от вредного влияния производственной среды, используемых в нем материалов и продуктов производства, а также для создания комфортных условий для персонала. Персонал, входящий в производственное помещение, должен быть одет в специальную одежду, соответствующую выполняемым им производственным операциям, а также классу чистоты той зоны, в которой он работает. Одежда и сменная обувь, предназначен-

ные для ношения в зонах чистоты класса D и K, должны быть чистыми. Одежда, предназначенная для ношения в зонах чистоты A, B, C – стерильной.

Весь персонал (включая занятый уборкой и техническим обслуживанием), работающий в чистых зонах, должен проходить систематическое обучение по предметам, которые относятся к правильному производству стерильных фармацевтических продуктов, включая гигиену и основы микробиологии.

Несоблюдение персоналом требований к личной гигиене чаще всего выражается в неправильном (недостаточном) уходе за чистотой собственного тела, к производственной гигиене – в использовании косметических средств во время работы, в том числе их несмывтии перед работой, несоблюдении правил обработки рук антисептическими растворами, проходе персонала в чистые помещения в несоответствующей одежде или обуви.

В зависимости от характера выполняемых движений в процессе производства количество выделяемых в минуту клеток микроорганизмов и механических частиц составит: не двигаясь – до  $10^4$ , в положении сидя с легкими движениями рукой и головой – до  $10^5$ , при интенсивной работе – до  $10^6$ . Среднее количество микроорганизмов, выделяемых человеком за 1 мин, достигает 1500–3000. При чихании человеческий организм выделяет до 100 000 капелек на площадь  $10\text{ м}^2$ .

Защита лекарств от загрязнений, источником которых служит человек, реализуется, в основном, благодаря личной гигиене сотрудников и использованию технологической одежды. Требования к личной гигиене персонала, производственной одежде, а также обязанностям персонала «чистых» помещений в отношении соблюдения этих требований определяет ТКП 030-2017 (02040) «Надлежащая производственная практика».

#### **4.7.3. Методы контроля и требования к микробной чистоте рук и технологической одежды персонала в производстве фармацевтической продукции**

Контроль персонала производства осуществляют методом смывов или контактным методом (методом отпечатков). Контролируют количество микроорганизмов на поверхности одежды (предплечья, грудь, маска, шапочка) с площади  $25\text{ см}^2$  для каждого объекта и рук в перчатках. 1 раз в месяц производится проверка рук персонала после обработки антисептиком. В оснащённом состоянии контролируют техническую одежду персонала из упаковки.

Контактный метод используют для контроля работников чистых зон А и В по окончании производственного процесса. Отпечатки пальцев каждой руки отдельно ставят на поверхность чашки Петри с плотной средой, осуществляя легкие скользящие движения по поверхности. Для контроля одежды используют контактные чашки (пластины, полоски) площадью 25 см<sup>2</sup> путем прикладывания к поверхности на 10 с при одинаковом давлении без поворота. Одежда далее не подлежит использованию, она передается на стирку и стерилизацию.

При осуществлении контроля методом смывов протирают стерильным тампоном перчатку (руку в перчатке) с обеих сторон, используя по одному тампону на каждую руку. Далее анализ ведут аналогично описанному в п. 4.3.3. В табл. 8 представлены требования, предъявляемые к поверхностям рук в перчатках и технологической одежды, при контроле персонала контактным методом.

Таблица 8

**Допустимое количество микроорганизмов на поверхности рук  
и технологической одежды**

Категория чистоты помещения	Руки		Технологическая одежда	
	Эксплуатируемое состояние	Оснащенное состояние	Эксплуатируемое состояние	Оснащенное состояние
А	–	Менее 1	–	Менее 1
В	1	2	1	2
С	7	10	10	15
Д	10	15	15	25

*Примечание.* Не допускается присутствие спорообразующих бактерий и грибов, бактерий семейства Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.



## Глава 5

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СТЕРИЛЬНЫХ И НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Уровень микробной чистоты – один из основных показателей качества фармацевтической продукции. По этому показателю все лекарственные препараты делят на стерильные (препараты, в которых не допускается содержание жизнеспособных клеток микроорганизмов) и нестерильные (препараты, в которых допускается содержание живых микроорганизмов). Требования к количеству и качественному составу микроорганизмов в составе нестерильных лекарственных средств зависят от лекарственной формы и способа введения препарата и нормируются соответствующей документацией (Государственной фармакопеей или фармацевтической статьёй производителя Республики Беларусь).

Важность микробиологического контроля в фармацевтическом производстве обусловлена последствиями присутствия микроорганизмов как в стерильных, так и в нестерильных лекарственных средствах, создающими опасность для здоровья и жизни человека.

Микроорганизмы-контаминанты лекарственных средств:

- могут приводить к серьезным инфекционным заболеваниям или к отравлению организма вследствие образования токсинов;
- могут приводить к биодegradации лекарственного средства, в частности действующих веществ, что является причиной снижения либо отсутствия терапевтического действия препарата;
- способствуют появлению и распространению лекарственной устойчивости – способности сохранять жизнедеятельность микроорганизмами-мишенями несмотря на контакт с химиопрепаратами.

Заболевания, вызываемые микроорганизмами-контаминантами лекарственных средств, делят на:

- неинфекционные (обусловленные продуктами биодegradации компонентов лекарственных средств);
- инфекционные (вызываемые проникновением в организм человека патогенных и условно-патогенных микроорганизмов).

Инфекционные заболевания вызывают ухудшение состояния больного из-за токсикозов (вызываемых энтерально действующими экзотоксинами микроорганизмов – например, бактерий *Staphylococcus*

*aureus*, *Clostridium botulinum*) или токсикоинфекций (вызываемых эндотоксинами микроорганизмов – например, бактерий *Bacillus cereus*, бактерий рода *Klebsiella*).

Возникновение, развитие и исход заболевания зависят от уровня микробной контаминации, вирулентности микроорганизма-контаминанта, резистентности человека и способа введения препарата.

Для стерильных лекарственных средств наличие микроорганизмов даже в малом количестве может стать летальным для пациента, учитывая беспрепятственное попадание микроорганизмов в кровь или на слизистые оболочки, особенно – при условии ослабленного иммунитета человека. При местном применении вероятность развития инфекционного процесса резко возрастает в случае обширных повреждений тканей в результате травмы, ожога, хирургического вмешательства. Например, бактерии *Staphylococcus aureus* при попадании с контаминированным лекарственным средством на кожу или слизистые может вызывать гнойно-воспалительные процессы, при ингаляционном введении – стафилококковую пневмонию, при пероральном введении – токсикоинфекцию, при попадании в кровяное русло – генерализованную инфекцию (сепсис).

Таким образом, нормирование относительно стерильности и микробиологической чистоты лекарственных средств, регламентированное требованиями фармакопеи, предназначено для защиты потребителей этих лекарственных средств от возможных последствий их контаминации микроорганизмами.

Оценка вероятности микробной контаминации нестерильных лекарственных средств во всем мире стала проводиться после фактического доказательства возможности инфицирования потребителей препаратами, загрязненными патогенными микроорганизмами. В 1966 г. в Швеции была зарегистрирована вспышка инфицирования сальмонеллезом, возникшая в результате использования препарата, загрязненного бактериями рода *Salmonella*, при этом пострадали более 200 человек. Чуть позже было установлено негативное деструктивное влияние продуктов жизнедеятельности бактерий и грибов на стабильность и эффективность лекарственных препаратов.

К концу 60-х гг. 20-го в. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) принимает рекомендации по введению максимально допустимого уровня микробной контаминации нестерильных лекарственных средств. В это же время нормы по микробиологической чистоте лекарственных средств начали устанавливаться в нормативных документах Великобритании, Европы и США. Для разработки условий

проведения микробиологических исследований лекарственных средств были привлечены специалисты-микробиологи в области методологии испытаний в пищевой и санитарной микробиологии.

Специфика определения качественного и количественного состава микробиоты лекарственных средств заключалась в их физико-химических и биологических свойствах, что потребовало разработки и введения ранее не применявшихся подходов к определению их микробиоты. С 1968 г. в разработанные методики и условия проведения микробиологических исследований по контролю качества лекарственных средств постепенно вносились изменения.

В странах бывшего Советского Союза контроль лекарственных средств по микробиологическим показателям долгое время проходил по требованиям самостоятельно разработанных инструкций 70-х гг. 20 в., которые включали другие подходы к методологии выявления микробиоты и не согласовывались с требованиями ведущих фармакопей мира. Тем не менее, результаты анализов, выполненных в период 1973–1975 гг. по этим методикам, позволили выявить, что из 5000 препаратов 65% не удовлетворяло предъявляемым требованиям по уровню обсемененности, 12% – содержали патогенные микроорганизмы, тогда как в 1979 г. только 30% проверенных препаратов не соответствовали требованиям и 0,9% содержали патогенные микроорганизмы. В 1989 г. в СССР были предприняты шаги в направлении создания системы микробиологического контроля лекарственных средств: была издана Государственная фармакопея СССР XI издания (выпуск 2), которая впервые содержала требования к определению качества лекарственных средств по показателям «Стерильность» и «Микробиологическая чистота», которые соответствовали рекомендациям ВОЗ. В 1996 г. вышли дополнения к ГФ СССР XI, которые стали базой микробиологического контроля фармацевтической продукции предприятий стран СНГ.

В европейских странах и США за последние 30 лет неоднократно менялись требования, предъявляемые к нестерильным лекарственным средствам по показателю «Микробиологическая чистота». Результатом этой работы стали международные и национальные стандарты (Фармакопея США, Европейская фармакопея, Британская фармакопея, ГФ РБ, ГФУ, ГФ XII).

Требования к микробиологической чистоте нестерильных и стерильных лекарственных средств изложены в ГФ РБ II, Т. 1, 2012 г. в разделе 2.6 «Биологические испытания».

## **5.1. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств**

### **5.1.1. Основные принципы определения микроорганизмов в нестерильных лекарственных средствах**

Основными задачами микробиологического контроля нестерильной продукции являются:

– установление наличия в образце жизнеспособных микроорганизмов и их качественный анализ на принадлежность к бактериям либо грибам;

– установление количества присутствующих в образце жизнеспособных бактерий и грибов;

– идентификация присутствующих в образце жизнеспособных бактерий и грибов.

Для решения поставленных задач используют только фармакопейные методы.

Нестерильные лекарственные средства должны содержать ограниченное количество микроорганизмов и не должны содержать определенные виды микроорганизмов, причем допустимое количество и виды микроорганизмов зависят от лекарственной формы и пути введения препарата.

Критериями выбора специфических микроорганизмов, нормирование которых предусмотрено государственными фармакопеями, определены опасность для здоровья населения и способность служить критерием оценки гигиенического состояния производства. В настоящее время перечень специфических микроорганизмов признан достаточным для получения результатов, адекватно отражающих качество продукции по микробиологическим показателям, со временем этот перечень может быть расширен.

### **5.1.2. Питательные среды, используемые для определения микробиологической чистоты, и проверка их пригодности**

Процедура испытания на микробиологическую чистоту включает определение общего количества мезофильных бактерий и грибов, способных расти в аэробных условиях, и испытания на наличие специфических организмов. Результаты испытаний на общее количество бактерий и грибов представляют в виде показателей «общее количество аэробов» и «общее количество грибов» соответственно.

Используемые для обнаружения бактерий и грибов питательные среды должны создать условия для размножения и роста всех присут-

ствующих в контролируемом лекарственном средстве микроорганизмов. Выживать с разной степенью успешности в присутствии молекулярного кислорода способны облигатные аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы и аэротолерантные анаэробы, поэтому ставится задача выявления их всех. Для испытания на общее количество аэробов используют тиогликолевую среду, среду на основе гидролизатов соевых бобов и казеина, среду Сабуро. Жидкая тиогликолевая среда предназначена для культивирования анаэробных бактерий ввиду добавления редуцирующего вещества и небольшого количества агар-агара, но также пригодна для обнаружения и аэробных бактерий. Тиогликолят натрия снижает окислительно-восстановительный потенциал, а также нейтрализует бактериостатический эффект соединений ртути и других тяжелых металлов, находящихся в исследуемом материале. Любое повышение концентрации кислорода сопровождается изменением цвета специального индикатора редокс-потенциала (резазурина) на красный. Небольшое количество агара в среде способствует поддержанию низкого редокс-потенциала за счет затруднения диффузии кислорода. Среда на основе гидролизатов соевых бобов и казеина и среда Сабуро подходят для культивирования как грибов, так и аэробных бактерий. В качестве альтернативы используются среда № 1 (для бактерий) и среда № 2 (для грибов). Могут быть использованы и другие среды при условии их соответствия требованиям испытаний на пригодность.

Проверка пригодности питательных сред, используемых для определения микробиологической чистоты, заключается в контроле каждой партии приготовленных питательных сред (примерно 5% от каждой партии) на стерильность (см. п. 5.2.3) и ростовые свойства.

Ростовые свойства сред обеспечиваются наличием питательных веществ (пептиды, углеводы) и факторов роста (аминокислоты, витамины, микроэлементы и пр.) и отсутствием ингибиторов роста микроорганизмов (остатков протеолитических ферментов, примесей тяжелых металлов, антибиотических веществ и т. д.). Для контроля ростовых свойств агаризованной среды и бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов (или среды №1) используют эталонные тест-культуры микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, для контроля ростовых свойств декстрозного агара Сабуро (или агаризованной среды №2) используют эталонные тест-культуры микроорганизмов *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*.

Для выявления специфических микроорганизмов используют селективные и диагностические среды, они должны избирательно поддерживать рост определенного вида (видов) микроорганизмов, характерным образом его идентифицировать (например, цвет колонии, зона ферментации вокруг колонии) и подавлять другие виды. Для этих питательных сред подтверждают ростовые, ингибирующие рост и индикаторные свойства.

Количество выросших колоний при испытании ростовых свойств не должно отличаться от значения, полученного для предыдущей партии такой же среды, более чем в 2 раза.

### **5.1.3. Современные требования по нормированию содержания микроорганизмов в нестерильных лекарственных средствах**

Чем больше масса взятого на анализ испытуемого образца, тем выше статистическая достоверность вывода об отсутствии патогенных микроорганизмов. Если иное не указано в частной статье, используют 10 г или 10 см<sup>3</sup> испытуемого продукта. Количество может быть уменьшено:

- для субстанций, содержание которых в лекарственном средстве очень мало – меньше или равно 1 мг в дозированной (таблетке, капсуле) и недозированной (мл или г) единице. В этом случае количество испытуемого образца должно быть не менее чем количество, содержащееся в 10 дозированных единицах или 10 г (10 см<sup>3</sup>) продукта;

- субстанций, количество которых ограничено или объем серии очень мал (1000 см<sup>3</sup> или 1000 г), количество образца для испытания составит 1% от размера серии;

- лекарственных средств, общее количество в серии которых менее 200 единиц (например, для клинических испытаний), размер отбираемого для контроля образца составит 2 единицы.

Методы определения микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств изложены в ГФ РБ II, Т. 1, 2012 г. в разделах 2.6.12, 2.6.13, 5.1.4, 5.1.6, 5.1.8. Допустимое содержание жизнеспособных клеток бактерий и грибов, а также специфических микроорганизмов в некоторых типах нестерильных лекарственных средств представлено в табл. 9.

На практике используются высеивание на чашки Петри с питательными средами методами глубинного и поверхностного посева, метод мембранной фильтрации и метод наиболее вероятного числа. Из них наименее точным является метод наиболее вероятного числа, который используется для продуктов с очень низкой бионагрузкой.

Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств методом мембранной фильтрации проводят с использованием фильтрующих систем открытого типа. В состав таких систем входит гребенка из нержавеющей стали (одно-, трех- или шестимест-

ная), фильтродержатели с воронками (пластмассовые, из нержавеющей стали, стеклянные), мембранные фильтры с номинальным размером пор 0,45 мкм, вакуумный насос и стеклянные колбы Бунзена, используемые в качестве приемников фильтрата. Аппарат для фильтрации и мембранные фильтры обязательно стерилизуют подходящим образом. Конструкция должна обеспечивать возможность извлечения мембраны для переноса ее в питательную среду.

Таблица 9

**Критерии приемлемости для микробиологической чистоты некоторых нестерильных лекарственных средств**

Способ применения нестерильного лекарственного средства	Общее количество аэробов (ОКА), КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	Общее количество грибов (ОКГ), КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	Специфические микроорганизмы (в 1 г или 1 см <sup>3</sup> )
Неводные лекарственные средства для внутреннего применения	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Отсутствие бактерий <i>Escherichia coli</i>
Ректальный	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	–
Для использования на слизистой оболочке ротовой полости, десенного, кожного, назального, ушного использования	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i>
Для ингаляционного применения	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> , бактерий семейства Enterobacteriaceae

Перед проведением испытания образец готовят по стандартной процедуре так, чтобы на фильтр нанести 1 г испытуемого средства. Испытуемый образец переносят на мембранный фильтр, фильтруют, промывают фильтр подходящим объемом того же растворителя (не более 5 раз по 100 см<sup>3</sup>), помещают фильтр с задержанными на нем микроорганизмами в питательную среду и инкубируют. Для определения ОКА и ОКГ мембранные фильтры переносят на чашки с соответствующими питательными средами и инкубируют в подходящих условиях, для определения специфических микроорганизмов – соответственно на селективные среды. В качестве контроля используют определение количества микроорганизмов при тех же условиях, но вместо испытуемого образца используют суспензию каждого из тест-микроорганизмов в том же растворителе, содержащую около 100 КОЕ. Если все условия проведения анализа соблюдены, то есть правильно выбраны материал, структура и размер пор

фильтра, условия проведения фильтрования, состав питательной среды, температура и время инкубирования в суховоздушном термостате, то микроорганизмы быстро размножаются и образуют визуально обнаруживаемый рост (помутнение жидкой среды, наличие колоний на фильтре, помещенном на поверхность плотной среды).

#### 5.1.4. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств, обладающих и не обладающих антимикробной активностью

Возможность обнаружения микроорганизмов-контаминантов в испытании в присутствии испытуемого продукта (лекарственного средства, субстанции или вспомогательного вещества) должна быть доказана. Некоторые из испытуемых продуктов обладают выраженным специфическим (антибиотики, антисептики, сульфаниламиды) или неспецифическим (цитостатики, спирты, серосодержащие препараты) антимикробным действием. Проверка наличия либо отсутствия антимикробного действия испытуемого продукта осуществляется в тех же условиях, что и определение микробиологической чистоты, с использованием тест-культур, применяемых для проверки ростовых свойств питательных сред.

Для нейтрализации (устранения) антимикробного действия используют добавление нейтрализующего агента, мембранную фильтрацию, разведение либо комбинацию этих методов.

Схема определения микробной чистоты нестерильных лекарственных средств представлена на рис. 3.



Рис. 3. Схема определения микробной чистоты нестерильных лекарственных средств



В качестве нейтрализующего агента используют химические вещества неспецифического действия (гидросульфит натрия, глицин, лецитин, полисорбат, тиогликолят, тиосульфат, ионы Mg, Ca) и специфические инактиваторы ( $\beta$ -лактамаза (пенициллиназа) – для  $\beta$ -лактамных антибиотиков (пенициллинов, цефалоспоринов), парааминобензойную кислоту – для сульфаниламидов и др.). В случае использования нейтрализующего агента необходимо подтвердить эффективность и отсутствие токсичного действия этого агента на микроорганизмы в испытаниях без испытываемого продукта.

## **5.2. Микробиологический контроль стерильности в производстве стерильных лекарственных средств**

**Стерильностью** называют полное отсутствие живых микроорганизмов в объекте. Целью испытания на стерильность является подтверждение полного отсутствия жизнеспособных бактерий и грибов в испытываемом объекте.

Стерильными выпускаются:

- лекарственные средства для парентерального применения (растворы, лиофильно высушенные и стерильно расфасованные порошки для инъекций и инфузий);
- офтальмологические лекарственные средства;
- растворы антисептиков, мази и гели для наружного применения (в том числе для нанесения на раневую поверхность);
- субстанции, предназначенные для производства лекарственных средств в форме стерильно расфасованных порошков и др.

Впервые тест на определение стерильности лекарственных средств был внесен в фармакопеи Великобритании и США в 1932 и 1936 г. соответственно.

Испытания по определению стерильности должны проводиться в тех же условиях, что и асептическое производство лекарственного средства, поэтому:

- используют ламинарные шкафы (боксы) с ламинарным потоком воздуха, представляющие собой чистые зоны класса А, расположенные в чистом помещении класса В, или с помощью изолятора (см. п. 5.2.1);
- воздух подготавливают с помощью НЕРА-фильтров (см. п. 4.2.2);
- доступ к помещению должен быть организован через воздушные шлюзы – конструкции с однонаправленными односторонними путями прохождения (см. п. 5.2.2);

– испытываемая продукция должна подаваться через передаточные окна (см. п. 5.2.2);

– исполнители должны быть переодеты в стерильную одежду и должны пройти соответствующую подготовку (см. п. 6.10.2.4).

Условия, в которых проводятся испытания, должны регулярно контролироваться путем отбора проб воздуха и поверхностей рабочей зоны. Меры предосторожности, принимаемые против контаминации, не должны влиять ни на один из микроорганизмов, которые могут быть обнаружены в ходе испытания.

### **5.2.1. Ламинарные боксы для проведения микробиологических исследований**

**Ламинарные боксы** (ламинарные шкафы) представляют собой специальное оборудование, применяемое для оснащения помещений с особыми требованиями к чистоте воздуха и физической изоляции микроорганизмов: лабораторий медицинских и фармацевтических учреждений, производственных и научно-исследовательских отделов для проведения медицинских экспериментов и испытаний на стерильность, работы с микробиологическим материалом и лекарственными препаратами, электроникой, оптикой, культивированием тканей растений. Ламинарный бокс представляет собой устройство в виде шкафа, оборудованного прозрачной передней панелью, ультрафиолетовыми лампами, осветителями и системой стерилизации воздуха при помощи механического фильтрования. Подача стерильного воздуха осуществляется в виде ламинарного потока – равномерного, без завихрений. Струи воздуха при этом обтекают препятствие токами с не очень большой одинаковой скоростью и движутся параллельно.

Из-за различий в работе ламинарных боксов отечественного и зарубежного производства выделяют их следующие виды: ламинарные боксы (укрытия) и боксы микробиологической безопасности I, II и III классов защиты.

Ламинарные боксы (укрытия) создают беспылевую абактериальную воздушную среду, обеспечивая защиту продуктов и оборудования, находящихся в рабочей зоне, а также рабочего процесса от внешнего и перекрестного загрязнений, и не обеспечивают защиту ни персонала, ни окружающей среды (рис. 4).

Принцип работы таких ламинарных боксов основан на создании в рабочей зоне однонаправленного ламинарного воздушного потока, который предварительно эффективно очищается НЕРА-фильтром.

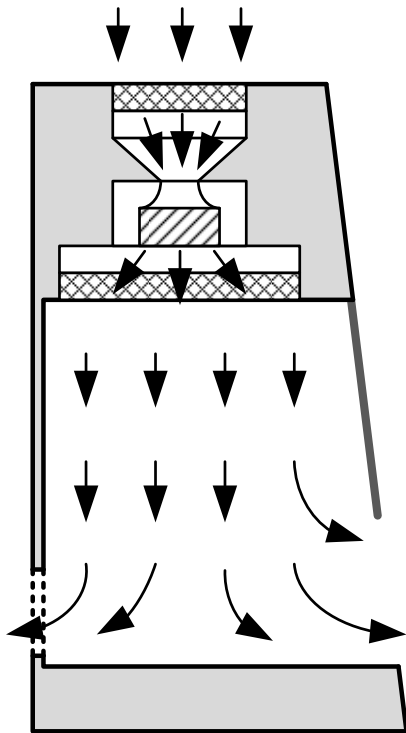


Рис. 4. Ламинарный бокс (укрытие)

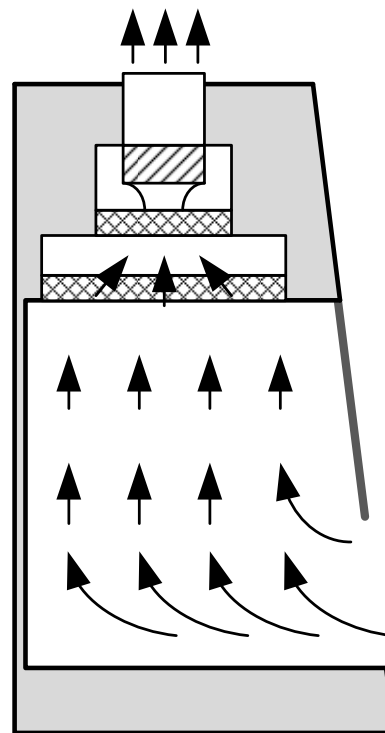


Рис. 5. Бокс микробиологической безопасности I класса защиты

Так как прошедший через рабочую зону воздух выбрасывается, не фильтруясь, в окружающую среду, в том числе и через рабочий проем, у которого находится оператор, в таком ламинарном боксе запрещается работать с биологическими патогенными агентами, токсичными и канцерогенными веществами, радионуклидами и другими продуктами, которые представляют опасность для окружающей среды и человека. Ламинарный бокс этого типа широко используется в странах постсоветского пространства и является единственным, в котором применяются воздушные нисходящие потоки, направленные извне бокса.

Бокс микробиологической безопасности I класса защиты защищает оператора и окружающую среду от патогенных агентов внутри бокса, но не обеспечивает защиту продукта от окружающей среды и перекрестной контаминации (рис. 5).

Защита оператора обеспечивается входящим через оконный проем воздушным потоком, который затем, вынося из камеры загрязняющие агенты, эффективно фильтруется HEPA-фильтром и выбрасывается в верхней части бокса.

Бокс микробиологической безопасности II класса защиты (рис. 6) защищает оператора и окружающую среду от патогенных агентов внутри бокса, а продукт – от воздействия окружающей среды и перекрестной контаминации.

Бокс биологической безопасности класса защиты II типа А2 защищает оператора входящим через оконный проем воздушным потоком, который создает ограждающую оператора воздушную завесу.

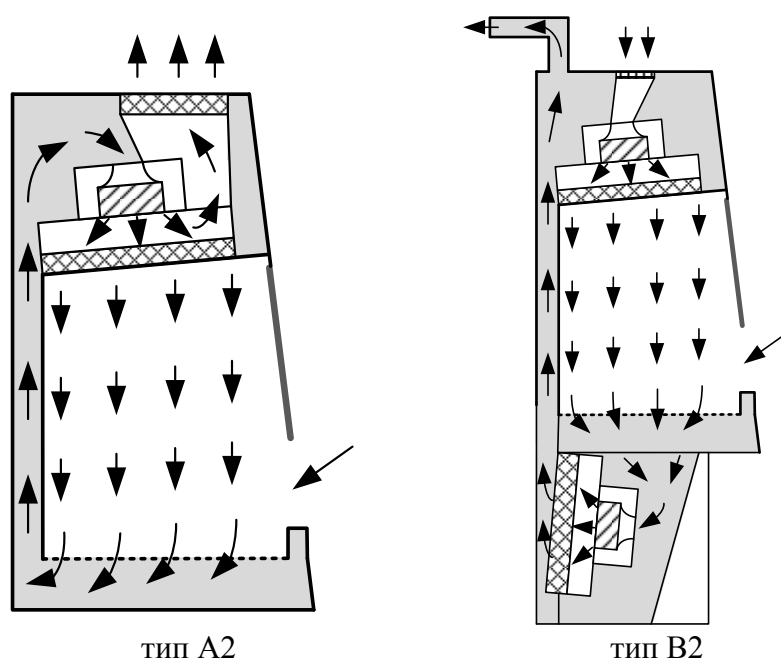


Рис. 6. Бокс микробиологической безопасности II класса защиты

Часть входящего через оконный проем воздуха, проходя сквозь перфорацию в передней части столешницы, подается на рециркуляцию, остальная часть воздуха фильтруется HEPA-фильтром и выбрасывается в окружающую среду.

Защита продукта осуществляется благодаря тому, что весь попадающий в рабочую камеру воздух, проходя через HEPA-фильтр и решетку ламинаризатора, очищается от аэрозольных частиц и становится однонаправленным и ламинарным. Однонаправленный поток воздуха не создает перекрестной контаминации продуктов в рабочей камере за счет отсутствия в нем завихрений.

В боксе биологической безопасности класса защиты II типа В2 нет рециркуляции воздуха, а значит, при подключении бокса к индивидуальной системе активной вытяжной вентиляции становится возможной работа с небольшими количествами сильно пахнущих, канце-

рогенных или токсичных химических веществ. Защита оператора обеспечивается входящим через оконный проем воздушным потоком, который создает ограждающую оператора воздушную завесу. Весь входящий через оконный проем воздух, проходя сквозь перфорацию в передней части столешницы, через НЕРА-фильтр выбрасывается в окружающую среду или систему вытяжной вентиляции. Защита продукта осуществляется так же, как и в боксе класса II типа А2.

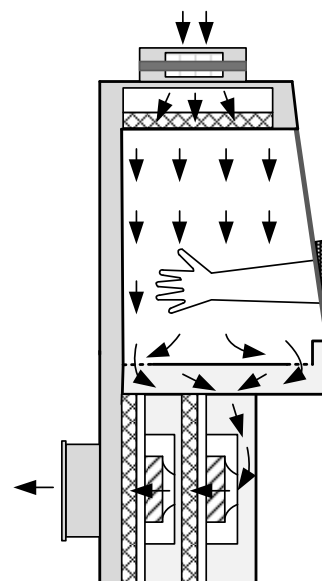


Рис. 7. Бокс микробиологической безопасности III класса защиты

Бокс микробиологической безопасности III класса защиты максимально защищает оператора и окружающую среду от патогенных агентов внутри бокса, обеспечивает защиту продукта от воздействия окружающей среды и предотвращает перекрестную контаминацию между продуктами (рис. 7). По сути, бокс этого класса является **изолятором** и представляет собой герметичную камеру, оборудованную передаточными устройствами и приспособлениями для манипуляций, которые не нарушают его герметичности. Это позволяет обеспечивать взаимоизоляцию оператора и продукта, предотвращая микробиологическое и химическое загрязнение продукта внутри изолятора и (реже в фармацевтическом производстве) обеспечивая защиту персонала от опасного агента.

### 5.2.2. Воздушный шлюз и передаточное окно

**Воздушный шлюз** представляет собой тамбур между двумя дверями и предотвращает перемещение воздуха между помещениями. Когда все двери воздушного шлюза закрыты, подаваемый в него воздух разбавляет загрязнения, поступившие из наружного коридора через дверь, а также выделяемые присутствующим персоналом.

**Передаточные окна** (пасс-боксы) представляют собой герметизированные специальными уплотнителями ящики из нержавеющей стали с дверьми с двух сторон с механическими или электронными замками, причем одновременно обе двери не могут быть открыты. Они монтируются в стене на высоте 1,0–1,2 м и используются для передачи материалов между чистыми помещениями с целью минимизации риска загрязнения.

### **5.2.3. Методы контроля стерильности**

Методы установления стерильности лекарственных средств изложены в ГФ РБ II, Т. 1, 2012 г., разделы 2.6.1, 5.1.9. Для контроля стерильности лекарственных средств используются методы прямого посева и мембранной фильтрации.

Метод прямого посева для определения стерильности быстрее, проще и дешевле, с его помощью можно испытывать нефильтруемые образцы, но из-за ограниченного объема образца этот метод имеет низкую чувствительность, его невозможно использовать для лекарственных средств и субстанций с антимикробным действием.

Метод мембранной фильтрации для определения стерильности дает возможность эффективного устранения антимикробного действия, применим для выявления нестерильности антимикробных препаратов при необходимости устранения антимикробного действия путем разбавления из-за возможности фильтрования большого объема пробы, а также проведения испытания без разбавления пробы, статистически более достоверен и более чувствителен. Высокая эффективность выявления микробной контаминации при низкой концентрации клеток в единице образца возможна благодаря концентрированию и удержанию на мембране даже единичных клеток (1 КОЕ на образец). Ограничениями при использовании мембранного метода являются невозможность его использования для нефильтруемых образцов и закупоривание мембраны компонентами лекарственных средств. Мембранная фильтрация будет предпочтительным методом, если испытуемый препарат фильтруется.

**5.2.3.1. Питательные среды, используемые для контроля стерильности, и проверка их пригодности.** Для определения стерильности используются два типа сред:

- для выявления анаэробных и аэробных бактерий: жидкая тиогликолевая среда (альтернативно – среда № 1);
- для выявления грибов и аэробных бактерий: жидкая среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов или жидкая среда Сабуро (альтернативно – среда № 2).

Проверка пригодности питательных сред сводится к установлению их стерильности, проверке ростовых свойств и наличия/отсутствия антимикробного действия испытуемого лекарственного средства. Проверке подлежит каждая партия приготовленных питательных сред, выборка должна составлять около 5% от количества флаконов в партии.

Для проверки стерильности питательных сред термостатируют образец каждой партии питательной среды после ее стерилизации в течении 14 сут при 30–35°C для тиогликолевой среды и 20–25°C для среды на основе гидролизата казеина и соевых бобов или среды Сабуро. По истечении заданного срока в питательных средах должны отсутствовать визуально определяемые признаки роста микроорганизмов.

Для проверки ростовых свойств делают высев эталонных тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes* в жидкую тиогликолевую среду и *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* в жидкую среду на основе гидролизата казеина и соевых бобов или среду Сабуро.

Проверка наличия/отсутствия антимикробного действия лекарственного средства выполняется аналогично тому, как это делалось при проверке микробиологической чистоты для нестерильных лекарственных средств, но определение проводится только в жидких средах.

Для определения стерильности методом прямой инокуляции водных растворов руководствуются следующими рекомендациями:

- если испытуемый продукт обладает антимикробной активностью, испытания выполняют после нейтрализации подходящим нейтрализующим агентом или путем разведения в достаточном количестве питательной среды;

- определенное количество испытуемого продукта помещают непосредственно в питательную среду, количество которой в 10 раз превышает объем образца для посева;

- при необходимости использования большого объема испытуемого продукта предпочтительно использовать концентрированную питательную среду, приготовленную с учетом последующего разбавления.

При определении стерильности методом прямой инокуляции масляных жидкостей используют питательные среды с добавкой подходящего эмульгатора в концентрации, приемлемость которой была подтверждена предварительно (например, полисорбат 80 в концентрации 10 г/дм<sup>3</sup>).

Похожим образом поступают при испытании на стерильность методом прямой инокуляции мазей, кремов и гелей: образец для анализа готовят разбавлением в соотношении примерно 1:10 путем эмульгирования с использованием подходящего эмульгатора в стерильном

растворителе (например, в растворе мясного или казеинового пептона с концентрацией 1 г/дм<sup>3</sup>), приготовленный образец переносят в питательную среду.

Инокулированные питательные среды инкубируют в течение не менее 14 сут при 30–35°C (тиогликолевая среда) для выявления бактерий и при 20–25°C (среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов или среда Сабуро) для выявления грибов.

**5.2.3.2. Рекомендации к выбору метода и проведению испытания на стерильность.** Для определения стерильности водных растворов методом мембранной фильтрации руководствуются следующими рекомендациями:

- содержимое контейнера (контейнеров) переносят на мембрану (мембраны) и немедленно фильтруют;

- если испытуемый раствор обладает антимикробным действием, мембрану промывают путем пропускания через нее определенного объема выбранного стерильного растворителя. Число циклов промывки должно быть не более 5 из расчета по 100 см<sup>3</sup>/цикл, даже если было показано, что такая промывка не полностью исключает антимикробное действие;

- мембрану целиком переносят в питательную среду или в асептических условиях делят ее на две равные части, каждую из которых помещают в тиогликолевую среду и среду на основе гидролизата казеина и соевых бобов (или среду Сабуро).

Обязательно ставят дополнительный отрицательный контроль для проверки на асептичность посева: через простерилизованную установку мембранной фильтрации пропускают заведомо стерильную жидкость (воду) и производят посев в питательные среды.

Для определения стерильности твердых растворимых веществ методом мембранной фильтрации требуемое количество продукта растворяют в подходящем растворителе (растворителе, прилагаемом к лекарственному средству, изотоническом растворе хлорида натрия, нейтральном растворе мясного или казеинового пептона с концентрацией 1 г/дм<sup>3</sup>); далее испытания продолжают как и для водных растворов.

В этом случае в качестве дополнительного отрицательного контроля используют не только проверку на асептичность посева, но и проверку отсутствия визуального роста при посеве использованного в испытании растворителя в питательные среды.

Схема определения стерильности приведена на рис. 8.





Рис. 8. Схема определения стерильности

Использование для анализа малого количества единиц продукции при большом объеме производственной серии несет риск получения неадекватного ответа. С другой стороны, метод определения стерильности – разрушающий, поэтому отбор для анализа большого количества единиц продукции экономически невыгоден. Объем выборки стерильных лекарственных средств зависит от количества единиц продукции в серии и назначения препарата и составляет от 2 до 10% продукции в производственной серии.

Строго говоря, удовлетворительный результат испытания на стерильность свидетельствует лишь о том, что в условиях испытания в испытуемом образце не обнаружено микроорганизмов, но при выполнении условия достаточности и правильности проведения выборки для проведения испытания, а также хороших результатах микробиологического мониторинга производственного помещения вывод о стерильности распространяется на всю партию лекарственного средства. Для стерильных продуктов обоснованные и документированные фактические доказательства правильного протекания процесса их приготовления дают большую гарантию по сравнению с испытанием на стерильность.

#### 5.2.4. Система мембранной фильтрации закрытого типа

Для испытания на стерильность методом мембранной фильтрации в настоящее время все чаще используют систему мембранной филь-

трации закрытого типа Стеритест. Она включает в себя прецизионный перистальтический насос специальной конструкции с регулируемой скоростью работы, позволяющий переносить жидкость (образец, промывочный раствор, среду) из исходной емкости в канистру (фильтроэлемент) Стеритест (рис. 9).



Рис. 9. Система фильтрации закрытого типа Стеритест Millipore

Расходные канистры Стеритест представляют собой две пластиковые емкости, в дно каждой из которых впаян мембранный фильтр с порами 0,45 мкм, а в верхней части находятся 0,22 мкм гидрофобный вентиляционный фильтр и соединение с эластичной ПВХ трубкой, которая на другом конце соединена с одной или несколькими иглами (общими для обеих трубок).

Проведение испытания на стерильность при этом отличается только заключительным этапом: мембрана, через которую отфильтрована проба, остается в фильтроэлементе, ее извлечение не требуется. Жидкие стерильные питательные среды (тиогликолевая среда и среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (или среда Сабуро)) перекачиваются в канистры фильтроэлементов, шланги обрезают стерильными ножницами в асептических условиях и закрепляют свободными концами на отводах гидрофобных вентиляционных фильтров. Каждый контейнер маркируют с указанием даты анализа, наименования испытуемой пробы и партии и инкубируют в суховоздушном термостате. На протяжении периода инкубации (14 сут), а также по его завершении оценивают наличие макроскопических признаков микробного роста в средах. Если признаков микробного роста не обнаруживается, то продукт признают выдерживающим испытание на стерильность. При наличии признаков микробного роста продукт не выдерживает испытание на стерильность.

### **5.2.5. Оценка результатов испытания на стерильность**

Результаты испытания (нестерильность) могут быть признаны недостоверными лишь при выполнении не менее одного из перечисленных ниже критериев:

- данные микробиологического мониторинга зоны проверки стерильности указывают на произошедшие сбои;
- проверка методики, используемой для проведения испытания, привела к обнаружению недочетов;
- наличие микробного роста в отрицательном контроле.

Если результаты испытания признаны недостоверными, испытание повторяют. При отсутствии признаков микробного роста в ходе повторного испытания продукт признают стерильным. При наличии – продукт нестерилен и бракуется.

Если внесение испытуемого материала приводит к помутнению питательной среды, образованию осадка или выпадению хлопьев, вследствие чего наличие или отсутствие микробного роста не может быть легко определено визуально, следует через 14 сут после начала инкубации перенести соответствующую порцию инокулированной среды в свежую аналогичную среду и инкубировать первоначальные и повторные посева еще 4 сут.

## **5.3. Мембранные методы в водоподготовке, контроле объектов производства и производстве готовой продукции**

Для тонкой очистки и стерилизующей фильтрации могут использоваться глубинные и мембранные фильтры.

Глубинные фильтры – это фильтры, в которых задержание частиц происходит по всей глубине механическим путем в местах пересечения волокон или в результате адсорбции. Их изготавливают из волокнистого материала или спеченного и спрессованного зернистого материала: шелк, марля, лавсан, капрон, стекловолокно, уголь активированный и др.

К достоинствам глубинных фильтров относят возможность использования для тонкой очистки и стерильной фильтрации. Среди недостатков известны возможность прохождения частиц через фильтры при изменении режима фильтрования, прорастание колоний микроорганизмов в глубине фильтра при длительной эксплуатации и возможность загрязнения фильтрата частицами фильтра. В производстве инъекционных растворов запрещено использование фильтров из асбеста и стекловолокна.

Мембранные фильтры представляют собой тонкие (100–150 мкм) пластины с постоянным размером пор, они работают по принципу сита. По способу получения их классифицируют на волоконные, порошковые, пленочные и ядерные (трековые). Пленочные мембраны получают из растворов и расплавов полимеров, а ядерные (трековые) – путем облучения полимеров продуктами радиоактивного распада и последующего выдерживания их в протравливающем растворе до образования сквозных отверстий в местах прохождения радиоактивных частиц, что обеспечивает им малую толщину и высокую однородность пор по размерам. Для удобства использования мембраны выпускают в виде патронов и дисков. Крупными производителями мембранных фильтров являются фирмы «Миллипор» (США), «Владипор» и «Трекпор» (Россия).

Промышленные мембранные фильтры начали выпускаться в 40-х гг. прошлого столетия. Сейчас мембраны изготавливают из целлюлозы и ее эфиров (нитроцеллюлозы, ацетилцеллюлозы), поливинила, поливинилхлорида, тефлона (политетрафторэтилена), полиамида, акрила, нейлона и других полимеров. Толщина мембран может составлять менее 0,1 мкм, они обладают высокой степенью пористости.

Бумажные или стеклянные фильтрующие поверхности, используемые для обычной фильтрации, позволяют отделить частицы размером 1–10<sup>3</sup> мкм. Размер пор мембраны определяет размер задерживаемых на ее поверхности частиц и тип баромембранного процесса: 2·10<sup>-3</sup>–10 мкм (микрофильтрация), 1·10<sup>-3</sup>–2·10<sup>-2</sup> мкм (ультрафильтрация), от 1·10<sup>-3</sup> мкм до 1 нм (обратный осмос и диализ).

Достоинства используемых сейчас мембранных фильтров заключаются в том, что они задерживают все частицы крупнее своих пор, не загрязняют фильтрат волокнами, не поглощают фильтруемую жидкость и не требуют промывания и выщелачивания.

Среди недостатков мембранных фильтров выделяют:

- большую склонность к забиванию по сравнению с глубинными фильтрами, поэтому обычно проводят предфильтрацию;
- большую чувствительность к тепловому воздействию (мембраны обычно используют при температуре не выше 130°C);
- относительно низкую пропускную способность, и отсюда – меньшую производительность.

Фильтрующие материалы подбирают в зависимости от цели, они должны удовлетворять следующим требованиям:

- обеспечивать необходимую степень очистки растворов;
- обладать механической прочностью, чтобы не загрязнять фильтрат;

- иметь минимальное гидравлическое сопротивление;
- быть биологически безвредными;
- быть химически стабильными по отношению к лекарственным веществам и растворителю;
- выдерживать термическую стерилизацию.

Для **подготовки очищенной и высокоочищенной воды**, а также ее депирогенизации используются ультрафильтрация и обратный осмос.

Ультрафильтрация – процесс разделения и фракционирования растворов, при котором макромолекулы отделяются от раствора низкомолекулярных веществ. При ультрафильтрации через мембранный фильтр с размером пор ( $10 \pm 2$ ) мкм задерживается более 99% пирогенов.

Обратный осмос (гиперфильтрация) – переход растворителя (воды) из раствора через полупроницаемую мембрану под действием внешнего давления. Избыточное давление солевого раствора в этом случае намного больше осмотического давления, разность этих давлений является движущей силой обратного осмоса.

К мембранным фильтрам, используемым **для контроля стерильности и испытания на микробиологическую чистоту**, предъявляют следующие требования:

- микроструктура мембраны и размеры пор должны максимально способствовать прорастанию удержанных на мембране микроорганизмов;
- высокая пористость, позволяющая быстро фильтровать образцы, в том числе – вязкие;
- материал мембраны не должен содержать токсичных для микроорганизмов веществ;
- мембраны должны быть стерильно упакованы и готовы к немедленному использованию.

Для лабораторных микробиологических испытаний предпочитают использование мембранных фильтров, номинальный размер пор которых не более 0,45 мкм, изготовленных из инертных материалов – чаще всего эфиров (нитрата или ацетата) целлюлозы, белого или темного цвета, с нанесенной сеткой для удобства подсчета колоний.

Объектами **стерилизующей мембранной фильтрации** являются термолабильные растворимые вещества (компоненты питательной среды, лекарственные вещества и т. д.) в растворенном виде. Обязательным является проведение предварительного фильтрования через фильтры с керамическими или другими фильтрующими материалами с порами размером 5,0 мкм и 0,5 мкм (для снижения бионагрузки), а затем раствор подают на стерилизующую фильтрацию через мембра-

ну из эфиров целлюлозы с порами размером 0,22 мкм. Для удаления вирусов требуется использовать ультрафильтрационные мембраны.

Исходная контаминация растворов, подаваемых на стерилизующую фильтрацию, должна быть минимальной – не более 100 кл./см<sup>3</sup>. С увеличением концентрации будет возрастать возможность попадания в фильтрат микроорганизмов мелких размеров, имеющих извитую форму или лишенных ригидной клеточной стенки.

Для достижения эффективной стерилизации методом мембранной фильтрации необходимо предварительно проверить размер пор мембраны, герметичность установки и правильно выбрать режим фильтрования.

Размер пор мембран оценивают микробиологическим методом с использованием клеток бактерий *Brevundimonas diminuta* (диаметр клеток 0,3 мкм) и *Serratia marcescens* (диаметр клеток 0,5 мкм), концентрация их в суспензии составляет 10<sup>5</sup> кл./см<sup>3</sup>.

Проверка на целостность мембран и герметичность установки производится методом «точки пузырька», который основан на определении минимального давления, необходимого для продавливания пузырька воздуха через поры мембраны.

Для предотвращения неконтролируемого размножения микроорганизмов на фильтре нужно максимально сократить время от начала фильтрации до получения стерильного раствора – не более 8 ч.

#### **5.4. Факторы, влияющие на жизнеспособность микроорганизмов-контаминантов в нестерильных лекарственных средствах**

Микроорганизмы в составе нестерильного лекарственного средства могут разлагать его компоненты, изменять органолептические свойства лекарственного средства, продукты метаболизма микроорганизмов вызывают аллергии, токсикоинфекции и болезни.

Основными факторами, влияющими на жизнеспособность микроорганизмов в лекарственном средстве, являются наличие и доступность в нем питательных веществ, физико-химические условия существования клеток (температурный режим хранения, доступность кислорода, рН, присутствие в среде клеточных метаболитов), механическое воздействие, отсутствие или наличие в среде ингибиторов, подавляющих рост клеток.

Сроки выживания микроорганизмов в водных формах зависят главным образом от их вида и концентрации в лекарственном средстве, температуры хранения и его состава. При таблетировании выжи-

вание микроорганизмов зависит от их размера и физиологического состояния, а также соотношения размера микробных клеток к размеру прессуемых частиц. В основе механизма снижения жизнеспособности микроорганизмов в составе твердых форм лекарственных средств лежит прямое механическое повреждение. Степень микробной загрязненности снижается при сушке и возрастает при опудривании гранулята.

## **5.5. Использование консервантов в составе готовых лекарственных форм**

Консерванты наряду с дезинфектантами и антисептиками представляют собой химические вещества, способные инактивировать микробные клетки или угнетать их рост, то есть оказывающие бактерицидное или бактериостатическое действие на микроорганизмы. Консерванты входят в состав как стерильных, так и нестерильных лекарственных средств для предотвращения роста микроорганизмов, попадающих в них с сырьем и во время технологического процесса, а также при неоднократном употреблении. Основными целями включения консервантов в состав фармацевтических препаратов являются предупреждение их микробной деградации и поддержание количества содержащихся в них микроорганизмов на низком безопасном уровне. Они не должны применяться в качестве альтернативы надлежащим условиям производства.

Требования к консервантам:

- широкий спектр антимикробной активности;
- быстрота биоцидного действия;
- отсутствие взаимодействия с компонентами лекарственного средства;
- стабильность;
- отсутствие раздражающего или токсического действия самого консерванта или продуктов его распада.

Например, в составе глазных капель в качестве консервантов используют хлорид бензалкония, бензоат натрия, борную кислоту, в состав растворов для инъекций и инфузий включают бензиловый спирт, сульфит натрия, метабисульфит натрия, лимонную кислоту, для длительного сохранения свойств пероральных и наружных форм используются сорбиновой и бензойной кислотами.

Применяемая концентрация консерванта в готовом лекарственном средстве должна быть значительно ниже токсичной для человека. Эффективность консервантов может усиливаться или ослабляться при взаимодействии с действующим веществом или другими компонента-

ми лекарственного средства, а также взаимодействии с материалами первичной упаковки.

Определение эффективности антимикробных консервантов (ГФ РБ II, Т. 1, 2012 г., раздел 5.1.3) включает подготовку посевного материала определенных тест-культур микроорганизмов, инокуляцию лекарственного средства суспензиями подготовленных тест-культур до концентрации  $10^5$ – $10^6$  КОЕ в  $1 \text{ см}^3$  или 1 г лекарственного средства, причем объем суспензии не должен составлять более 1% от объема образца. Инокулированные образцы тщательно перемешивают и делают высев на подходящую полноценную агаризованную среду в чашках Петри для точного определения начальной концентрации в размерности КОЕ/ $\text{см}^3$ . Далее эти образцы инкубируют при температуре 20–25°C в защищенном от света месте, через определенные интервалы времени отбирают пробы, делают высевы на плотную питательную среду аналогично определению начальной концентрации жизнеспособных клеток тест-микроорганизмов в инокулированном лекарственном средстве с целью установления текущей концентрации жизнеспособных клеток в 1 г ( $\text{см}^3$ ) лекарственного средства. Полученные результаты анализируют, отмечая увеличение или уменьшение количества жизнеспособных клеток. Критерием оценки антимикробной активности консервантов является уменьшение десятичного логарифма числа жизнеспособных микроорганизмов по сравнению с начальной концентрацией (на момент инокуляции). Рекомендуемая эффективность консервантов по отношению к клеткам бактерий и грибов представлена в табл. 10.

Таблица 10

**Рекомендуемая эффективность консервантов для лекарственных средств**

Микроорганизмы	Критерий	lg уменьшения через				
		6 ч	24 ч	7 сут	14 сут	28 сут
Лекарственные средства парентерального и офтальмологического применения						
Бактерии	A	2	3	–	–	НВ
	B	–	1	3	–	НУ
Грибы	A	–	–	2	–	НВ
	B	–	–	–	1	НУ
Лекарственные средства для перорального, ректального применения						
Бактерии	(без критерия)	–	–	–	3	НУ
Грибы	(без критерия)	–	–	–	1	НУ

*Примечание.* Критерий А – рекомендуемая эффективность; критерий В – используется в случае, если обосновано, что критерий А не может быть достигнут, например, по причине повышенного риска неблагоприятных воздействий; НВ – нет выявления живых микроорганизмов; НУ – нет увеличения живых микроорганизмов по сравнению с предыдущим снятием показаний.



## Глава 6

# МЕРОПРИЯТИЯ ПО БОРЬБЕ С МИКРООРГАНИЗМАМИ- КОНТАМИНАНТАМИ В ПРОИЗВОДСТВЕ СУБСТАНЦИЙ И ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Для достижения требуемого уровня микробной чистоты (отсутствие жизнеспособных микроорганизмов в стерильных лекарственных средствах и нормированное их содержание по количественному и качественному составу в нестерильных лекарственных средствах) применяют методы и средства, направленные на ограничение количества микроорганизмов в производственной среде (создание асептических условий), на частичное или полное их уничтожение (дезинфекция, антисептика, стерилизация), а также поддержание на безопасном уровне концентрации микроорганизмов, содержащихся в готовых лекарственных формах (использование консервантов (см. п. 5.5)).

### **6.1. Краткая характеристика неклеточных и клеточных форм микробиологических контаминантов лекарственных средств**

**Прионы** – инфекционные агенты, представленные гликопротеинами с молекулярной массой 20–30 кДа и аномальной третичной структурой, не содержащими нуклеиновых кислот и способными индуцировать в нормальном клеточном белке конформационный переход в молекулу, обладающую инфекционной активностью. Для увеличения своей численности эти инфекционные агенты используют функции живых клеток.

Прионы вызывают нейродегенеративные заболевания, поражая головной мозг и другие нервные ткани с образованием внеклеточных скоплений в центральной нервной системе и формируя амилоидные бляшки. В результате нормальная структура нервной ткани разрушается с образованием в ней полостей. Прионы вызывают у крупного рогатого скота губчатую энцефалопатию («коровье бешенство»), у людей – прогрессирующее дистрофическое заболевание коры большого мозга, базальных ганглиев и спинного мозга, фатальную семей-

ную бессонницу и др. Все известные прионные заболевания в настоящее время неизлечимы и в конечном итоге смертельны. Источником такой инфекции являются ткани больного организма, заражение человека возможно алиментарным путем, а также при использовании лекарственных препаратов, изготовленных из тканей больных животных, или контаминированных медицинских инструментов, поэтому в производстве нельзя применять клетки нервной ткани как потенциально опасный источник прионов.

**Вирусы** – неклеточные инфекционные агенты, которые могут воспроизводиться только внутри живых клеток, и потому являются облигатными паразитами. От живых организмов вирусы отличаются полным отсутствием основного и энергетического обмена и отсутствием трансляции (синтеза белка). Вирусные частицы (вирионы) состоят из двух или трех компонентов: генетического материала в виде ДНК или РНК (иногда присутствуют оба типа молекул); белковой оболочки (капсида), защищающей эти молекулы, и, в некоторых случаях, – дополнительных липидных оболочек. Форма вирусов варьирует от простой спиральной и икосаэдрической до более сложных структур. Размеры среднего вируса составляют около одной сотой размеров средней бактерии.

Вирусы поражают все типы живых клеток – от растительных и животных до клеток бактерий, они обнаружены почти в каждой экосистеме на Земле. Более 60% инфекционных заболеваний у людей вызывают вирусы. Известно около 1000 видов вирусов, патогенных для человека.

**Бактерии** – прокариотические (безъядерные) микроорганизмы, чаще всего одноклеточные. Описано около десяти тысяч видов бактерий и предполагается, что их существует больше миллиона. Размеры бактерий в среднем составляют 0,5–5,0 мкм, однако некоторые имеют размеры 0,10–0,25 мкм, что соответствует размеру крупных вирусов. Обмен веществ с окружающей средой, а потому – и метаболическая активность на единицу биомассы у мелких бактерий выше, чем у крупных, потому что у них больше удельная поверхность.

Форма клеток бактерий разнообразна, обязательные клеточные структуры – нуклеоид, рибосомы и цитоплазматическая мембрана. С внешней стороны от цитоплазматической мембраны находится клеточная стенка, у некоторых видов бактерий покрытая капсулой или слизистым чехлом.

Цитоплазматическая мембрана ограничивает содержимое клетки (цитоплазму) от внешней среды. Клеточная стенка – важный струк-

турный элемент бактериальной клетки, но необязательный. По типу строения клеточной стенки бактерии делят на грамположительные и грамотрицательные.

Клеточная стенка грамположительных бактерий представляет собой гомогенный слой толщиной 20–80 нм, построенный в основном из пептидогликана с меньшим количеством теихоевых кислот и небольшим количеством полисахаридов, белков и липидов (липополисахаридов). В клеточной стенке имеются поры диаметром 1–6 нм, которые делают ее проницаемой для ряда молекул.

У грамотрицательных бактерий пептидогликановый слой неплотно прилегает к цитоплазматической мембране и имеет толщину лишь 2–3 нм. Он окружен наружной мембраной, имеющей, как правило, неровную, искривленную форму. Между цитоплазматической мембраной, слоем пептидогликана и внешней мембраной имеется периплазматическое пространство, заполненное раствором, включающим в себя транспортные белки и ферменты.

Грамположительные бактерии при недостатке питательных веществ с целью пережить неблагоприятный период способны образовывать покоящиеся формы – эндоспоры.

**Грибы** – эукариотические организмы, сочетающие в себе некоторые признаки как растений, так и животных. Грибы не синтезируют органические соединения углерода, имеют дифференцированное ядро, покрыты оболочкой, содержащей хитин. Микроскопические формы грибов (микромикеты) представлены мицелиальными (плесневыми) и дрожжеподобными грибами.

Мицелиальные грибы – различные грибы (в основном, зиго- и аскомицеты), формирующие ветвящиеся гифы. Они образуют грибницу (мицелий) без крупных, легко заметных невооруженным глазом, плодовых тел. Мицелиальные грибы распространены повсеместно, обширные колонии вырастают в теплых влажных местах при наличии питательных веществ. Гифы расположены на поверхности или неглубоко внутри субстрата, на котором поселился гриб, поскольку нуждаются в кислороде воздуха. Внутри особых споровместилищ либо на краях специальных выростов грибницы – конидиеносцах – содержатся споры. Вегетативное (отделением от мицелия его частей) и бесполое (с помощью спор) размножение плесневых грибов осуществляется с большой скоростью.

Мицелиальные грибы обладают комплексом ферментов гидролитического действия, расщепляющих полимерные субстраты. По этой причине они могут стать причиной порчи растительного сырья и не-

которых материалов (древесины, тканей). Многие виды плесневых грибов патогенны, некоторые продуцируют антибиотические вещества.

Дрожжи представляют собой микроскопические грибы (аско- и базидиомицеты), у которых мицелий упрощен, а их вегетативные клетки размножаются почкованием или делением и могут жить как отдельные одиночные клетки в течение всего жизненного цикла. Типичные размеры дрожжевых клеток составляют 3–7 мкм, некоторые виды способны вырастать до 40 мкм. В клеточной оболочке дрожжей отсутствует хитин. При благоприятных условиях (в первую очередь важна повышенная влажность и наличие легко утилизируемого источника углерода) дрожжи растут и делятся очень быстро, меняя тип метаболизма в зависимости от концентрации кислорода в среде.

**Простейшие (протисты)** – разнородная группа одноклеточных или колониальных эукариот, которые имеют гетеротрофный тип питания. Настоящих многоклеточных форм среди простейших нет. Большинство простейших имеют размер около 10–40 мкм, но некоторые достигают размеров в несколько миллиметров, самые мелкие имеют размеры 1–2 мкм. Простейшие обитают в водной среде и почве, занимают различные трофические уровни. Многие простейшие могут существовать в неблагоприятных условиях или в определенные моменты их жизненного цикла в форме цисты, характеризующейся наличием прочной защитной оболочки. Некоторые простейшие являются паразитами, возбудителями заболеваний человека и животных.

## **6.2. Причины устойчивости микроорганизмов-контаминантов к стерилизующему воздействию**

Выделяют естественную (природную) и приобретенную устойчивость (резистентность) микроорганизмов к физико-химическому воздействию.

### **6.2.1. Естественная резистентность**

Естественная резистентность связана с природными особенностями строения клетки и ее метаболизма и определяется:

- наличием и строением защитных покровов;
- образованием биопленок;
- способностью к ферментативной деградации;
- системой выброса ксенобиотиков.

**6.2.1.1. Наличие и строение защитных покровов.** Строение защитных покровов микроорганизмов и вирусных частиц очень разно-

образно, определяется видом микроорганизма и особенностями его жизнедеятельности (жизненного цикла).

Капсиды вирусных частиц состоят из субъединиц – капсомеров, уложенных по спирали вокруг центральной оси, в виде правильного или вытянутого икосаэдра либо в виде комбинации спирали и икосаэдра. Генетический материал в спиральных капсидах удерживается ионными взаимодействиями между отрицательными зарядами на нуклеиновых кислотах и положительными зарядами на белках. Некоторые вирусы окружают себя дополнительной оболочкой – суперкапсидом – из модифицированной клеточной мембраны (цитоплазматической или внутренней).

Грамотрицательные бактерии обычно более устойчивы, чем грамположительные. Их устойчивость определяется наличием внешней мембраны, в состав которой входят белки, липопротеины, липополисахариды и фосфолипиды. Большое значение имеет липид А, содержащий много фосфатных групп и имеющий компактную конформацию, что придает мембране вязкую структуру и отрицательный заряд. На отрицательно заряженной поверхности мембраны формируется слой положительно заряженных ионов Са и Mg, что стабилизирует мембрану и затрудняет диффузию биоцидов. Структура липида А бактерий *Pseudomonas aeruginosa* включает повышенное количество фосфатных групп, что делает эти бактерии более устойчивыми по сравнению с другими грамотрицательными бактериями. Для удаления дополнительного минерального слоя и повышения проницаемости клеточной стенки используют хелатирующие агенты (например, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)). Некоторые бактерии (рода *Proteus*) более устойчивы к ЭДТА благодаря менее кислотному характеру липополисахаридов внешней мембраны.

Микобактерии – нокардиоморфные актиномицеты родов *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* – вызывают туберкулез и представляют опасность для людей с иммунодефицитными состояниями и хроническими заболеваниями легких. Эти бактерии высокорезистентны к действию кислот, щелочей, хлоргексидина, четвертичных аммонийных соединений, тяжелых металлов, бактерицидным действием по отношению к ним обладают амфотерные ПАВ, этиленоксид, йод. Некоторые виды микобактерий (*M. tuberculosis*) способны образовывать биопленку в системах водоснабжения и эндоскопах, удаляемую заполнением препаратами хлора и оксида этилена на 12 ч. Высокую устойчивость микобактерий к биоцидам объясняют строением клеточной стенки. В ее состав входят пептидогликаны,

арабиногалактана и трегалозы димиколат («корд-фактор», повреждает макрофаги и препятствует завершению фагоцитозу), пептиды, воска и липиды (обеспечивают гидрофобность клеточной стенки).

Грибы в целом более устойчивы к биоцидам, чем неспорообразующие бактерии. Важную роль барьера проницаемости у грибов играют маннаны и маннопротеины клеточной стенки, а также липиды цитоплазматической мембраны. Клеточная стенка, поврежденная биоцидом, способна к репарации (обновлению) и модификации структуры при росте в присутствии сублетальных доз биоцида.

Бактериальные эндоспores благодаря плотной оболочке выдерживают концентрацию биоцидов, в несколько тысяч раз превышающую концентрации, которые эффективны в отношении вегетативных клеток.

Эндоспора состоит из нуклеоида в среде уплотненной цитоплазмы, покровных слоев, представленных цитоплазматической мембраной, клеточной стенкой зародыша, кортекса, внутренней и наружной оболочек, экзоспориума. Кортекс имеет безводную и вязкую структуру. Зрелые эндоспores бактерий практически не содержат свободной воды. Доля оболочек составляет до 50% сухой массы эндоспор, в состав ее входят гликоконъюгаты, белки и липиды. Содержание последних в составе оболочек эндоспор повышено по сравнению с вегетативной клеткой. Белки споры содержат повышенное количество цистина, который обеспечивает образование дисульфидных мостиков, обуславливающих высокую механическую прочность оболочек спор, а при споруляции образуются особые белки, которые связываются с ДНК, изменяя геометрию пиримидиновых оснований, что повышает их устойчивость к ультрафиолетовому облучению.

Соединения ртути, четвертичные аммонийные соли, хлоргексидин, фенолы, спирты практически не обладают спороцидной активностью, но могут задерживать прорастание спор.

Оксид этилена,  $\beta$ -пропиолактон, формальдегид, глутаровый альдегид, пероксид водорода и галогены инактивируют эндоспores, но медленно: процесс стерилизации может занять несколько часов.

Эндоспores разных видов бактерий различаются по своей чувствительности к биоцидам из-за генетических различий и фенотипической зависимости резистентности эндоспор от условий существования и роста бактериальных клеток.

Спores грибов обычно более устойчивы, чем вегетативные клетки, за счет дегидратации.

Цисты простейших также отличаются устойчивостью из-за труднопроницаемой оболочки. Например, *Acanthamoeba* может вызывать

кератиты, связанные с использованием контактных линз, а применяемые антисептики действуют на трофозоиты (клетки простейших в стадии активного размножения), но не всегда на цисты. Эффективной в таком случае является тепловая или лучевая стерилизация.

**6.2.1.2. Образование биопленок.** Биопленка – сообщество микроорганизмов, часто – разных видов, имеющих общую внешнюю полимерную оболочку гетерогенного состава (гликокаликс), включающую продукты биосинтеза микроорганизмов, образующих биопленку (внеклеточные ферменты и полисахариды). Образование биопленки определяет устойчивость включенных в нее микроорганизмов к действию неблагоприятных факторов, в том числе биоцидов, в сотни раз выше, чем у индивидуальных клеток. Экзополисахариды и экзоферменты в составе гликокаликса участвуют в связывании и разрушении биоцидов.

Старые клетки более устойчивы к повреждающему воздействию, чем молодые. В нижних слоях биопленки клетки находятся в состоянии голодания и замедленного роста, что снижает их чувствительность к факторам внешней среды и способствует отбору устойчивых вариантов микроорганизмов.

Биопленки способны образовывать бактерии родов *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Legionella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus* и др., обнаружена способность формировать биопленку у грибов. В симбиозе с простейшими (в составе биопленки) могут существовать бактерии родов *Legionella*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Listeria*, в том числе как внутриклеточные паразиты. Внутри цист амебы бактерии защищены от действия дезинфектантов.

Биоциды в дозах, эффективных в отношении взвеси микробных клеток, не действуют на микроорганизмы в форме биопленки. Для определения дозы дезинфектанта, устраняющей биопленку, требуется стандартизация биопленки (вид микроорганизма, возраст биопленки и др.).

**6.2.1.3. Способность к ферментативной биодеградации.** Ферментативной деградации подвергаются все виды ПАВ и другие дезинфектанты в концентрации ниже действующей, а иногда – и в рабочей концентрации.

*P. aeruginosa* использует бензалкониума хлорид в качестве источника углерода. *St. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* способны продуцировать ферменты, гидролизующие органические соединения ртути с высвобождением  $Hg^{+2}$ , и редуктазу, переводящую  $Hg^{+2}$  в металлическую Hg, которая испаряется из среды.

Детоксикация тяжелых металлов (Zn, Cu) происходит за счет их компартментализации в вакуолях дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* путем образования H<sub>2</sub>S, который при реакции с тяжелыми металлами дает нерастворимые сульфиды.

**6.2.1.4. Система выброса химических соединений.** Естественная резистентность может быть связана и с действием специальной системы выброса некоторых антибиотиков и неспецифически действующих биоцидов. У бактерий эта система существует в виде специальных транспортных белков цитоплазматической мембраны, периплазмы и поринов, активизирующихся энергией трансмембранного градиента протонов и требующих участия АТФ. Такой тип естественной резистентности обнаружен для *P. aeruginosa*. Механизм процесса активного выброса в случае выведения гидрофобных соединений дополняется стадией повышения их растворимости путем введения группы ОН<sup>-</sup> путем микросомального окисления на цитохроме Р-450 с последующим образованием конъюгатов с водорастворимыми соединениями – глицином, глутатионом.

У грибов есть система активного выброса из клетки слабых кислот – сорбиновой, бензойной, уксусной. Они способны снижать активность биоцидов путем модификации их химической структуры.

### **6.2.2. Приобретенная резистентность**

Приобретенная резистентность появляется в результате изменений в генетическом аппарате микроорганизмов и отбора устойчивых мутантов в среде, содержащей биоциды. Наиболее часто такие изменения происходят в результате горизонтального транспорта между различными видами и родами бактерий с помощью плазмид и конъюгативных транспозонов, контролирующих образование специфических ферментов, синтез поверхностных структур, повышающих защитные функции клеточных оболочек, и т. д.

Показано, что у грамположительных бактерий резистентность к ЧАС и хлоргексидину обеспечивается системой выброса биоцидов из клетки, кодируемой плазмидой, а у грамотрицательных бактерий – с модификацией порина. У *Serratia marcesens* плаزمида кодирует ферментативную деградацию формальдегида, у некоторых клинических штаммов *Staphylococcus aureus* обнаружены генетические детерминанты, определяющие устойчивость к четвертичным аммонийным солям, акридину и его производным, бромистому этидию.

Приобретенная устойчивость грибов может быть связана с изменением хромосомного аппарата, поскольку плазмид резистентно-



сти у грибов не обнаружено. Адаптация чаще связана с изменением метаболизма.

Широкий круг хозяев у генов резистентности способствует их сохранению в природе, такие гены могут стабильно существовать даже в отсутствие селективного давления (в среде, не содержащей биоциды). Такие селективные условия на практике создаются в средах, содержащих биоциды в пониженной концентрации: растворах дезинфектантов, приготовленных без соблюдения инструкции, а также в рабочих растворах при нарушении сроков хранения (при частичной инаktivации действующего вещества).

Для развития резистентности кроме концентрации биоцида значение имеют состав среды (наличие защитных агентов, факторов роста), фаза развития и скорость деления клеток, температура и др.

При продолжительном использовании определенного биоцида микробиота, обитающая в данном объекте (лаборатория, производственный цех, трубопроводы системы циркуляции очищенной воды), может приобрести устойчивость к этому препарату.

### **6.3. Чувствительность и устойчивость микроорганизмов к повреждающим факторам и использование их в методах промышленной дезинфекции и стерилизации**

Дезинфекция и стерилизация предполагают использование физических и химических средств и воздействий, направленных на уничтожение микроорганизмов внутри объектов или на их поверхности. Микробная клетка считается погибшей, если она потеряла способность к воспроизводству. Различают бактерицидное, фунгицидное и вирулицидное действие, вызывающее гибель соответствующих объектов. Основные повреждающие факторы включают воздействие высоких температур, лучистой энергии, химических веществ с неспецифической антимикробной активностью.

#### **6.3.1. Воздействие высоких температур**

Воздействие высоких температур используется для дезинфекции (пастеризация, тиндализация) и стерилизации (обработка сухим жаром, текучим паром, паром под давлением).

В основе термических методов стерилизации лежит эффект действия высокой температуры, вызывающей денатурацию нуклеиновых кислот и белков живой клетки. При стерилизации паром под давлением преимущественно протекают реакции гидролиза биополимеров,

при стерилизации сухим жаром – окислительные реакции. Объектами термической стерилизации являются оборудование, коммуникации, запорная арматура (вентили и задвижки), питательные среды, готовые лекарственные формы (если они выдерживают условия термической стерилизации), материалы первичной упаковки, установки для стерильного фильтрования, технологическая одежда.

В качестве горячих теплоносителей при термической денатурации используют водяной пар под давлением, текучий пар (искусственно давление не создается), сухой горячий воздух. Например, при стерилизации растворов водяным паром под давлением в автоклаве используют режим 121°C, 30 мин, при стерилизации текучим паром в текучепаровом стерилизаторе или в автоклаве с открытым краном – 100°C, 30 мин, стерилизацию посуды в сухожаровом шкафу сухим горячим воздухом ведут при 180°C 2 ч.

Наиболее чувствительны к высоким температурам неспорообразующие бактерии, мицелиальные грибы, вирусы. Резистентны к воздействию высоких температур споры бактерий рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. stearothermophilus*), *Clostridium botulinum*, прионы. Термоустойчивость одних и тех же микроорганизмов может изменяться в зависимости от наличия влаги и свойств среды. Чувствительность микроорганизмов одного вида к высокой температуре зависит от:

- штаммовых различий;
- фазового состояния клеток, связанного с активностью их метаболических процессов;
- характера скоплений клеток;
- вида термической обработки (сухой нагрев менее эффективен, чем влажный);
- состава среды термообработки (многие органические и неорганические вещества обладают защитным действием на клетки);
- значения pH среды.

### **6.3.2. Воздействие лучистой энергии**

Лучистая энергия – это электромагнитные колебания различной частоты и соответственно различной длины волны. В эту группу входят инфракрасные лучи с длиной волны 0,3 мм – 750 нм, лучи видимого света от красных (750 нм) до фиолетовых (400 нм), ультрафиолетовые (УФ) лучи (10–400 нм), рентгеновские лучи (0,001–10 нм) и лучи радия (менее 0,2 нм).

Характер действия электромагнитного излучения на микроорганизмы зависит от энергии и дозы излучения. Видимый свет благопри-

ятен для цианобактерий. Инфракрасное излучение в средней и дальней области спектра не оказывает влияния, однако излучение в ближней области может влиять на их термодинамическое состояние. К гибели клеток может приводить облучение ультрафиолетовыми, рентгеновскими и  $\gamma$ -лучами. Последние два вида относятся к ионизирующим видам излучения.

**6.3.2.1. Ультрафиолетовое облучение.** Механизм действия ультрафиолетового излучения состоит в том, что нуклеиновые кислоты поглощают световые волны в диапазоне 240–290 нм. При воздействии излучения происходит разрыв двойных связей между пятым и шестым атомами в молекулах близкорасположенных пиримидиновых оснований, что в конечном итоге приводит к образованию димеров и сбоям в репликации ДНК. Опосредованный механизм действия ультрафиолетового излучения при использовании ламп из кварцевого стекла заключается в высвобождении активных окислителей ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ). Однако под действием лучей дневного солнечного света активизируются ферменты, которые катализируют расщепление образовавшихся димеров (явление фотореактивации), что приводит к восстановлению жизнедеятельности клетки.

Обработка ультрафиолетовыми лучами используется на фармацевтических производствах для подготовки стерильного воздуха, в производстве некоторых вакцинных препаратов и для стерилизации полимерных планшетов с нанесенными на их поверхность сухими биохимическими реактивами.

Для обработки ультрафиолетом применяют облучатели, снабженные кварцевыми бактерицидными лампами с длиной волны в эффективном спектральном диапазоне излучения 205–315 нм. В зависимости от типа колбы и материала, из которого она изготовлена, лампы маркируются аббревиатурами ДБ (колба из увиолевого стекла), ДБК (колба из кварцевого стекла), ДКБ (колба из увиолевого стекла, компактные). Цифра при аббревиатуре указывает на мощность лампы, выраженную в ваттах: например, ДКБ-11.

Бактерицидные облучатели могут быть прямого действия (открытые), применяемые только в отсутствие персонала, и экранированные (закрытые или рассеянные), которые можно применять в процессе работы. Экранированные лампы размещают не ниже 2 м от уровня пола. Гибель микроорганизмов происходит в верхних слоях воздуха, а нижние слои обеззараживаются за счет конвекции, улучшаемой в том числе с помощью специальных устройств для рециркуляции воздуха. В зависимости от способа монтажа бактерицидные облучатели могут быть потолочными, настенными и передвижными.

Средний срок службы лампы составляет 1500–2000 ч. К концу срока мощность и, следовательно, эффективность воздействия на микроорганизмы снижается на 50% от исходного уровня.

Специальные лампы повышенной мощности позволяют проводить дезинфекцию методом вспышки (например, для обработки 30 м<sup>3</sup> воздушной фазы требуется всего 2 мин, для 60 м<sup>3</sup> – 5 мин).

Использование ультрафиолетовых ламп ограничивается токсическим действием на персонал выделяющихся озона и оксида азота (II), повреждающим действием ультрафиолетовых лучей на сетчатку глаза.

Различные виды и формы микроорганизмов не одинаково чувствительны к одной и той же дозе УФ-облучения. Наиболее устойчивы к УФ воздействию споровые формы бактерий и грибов, а также пигментированные микроорганизмы, которые поглощают свет в другой области спектра.

Эффективность воздействия УФ-излучения зависит от дозы облучения (количества энергии, поглощенной клеткой), характера облучаемого объекта и условий воздействия (рН и температуры, наличия защищающих клетки веществ).

**6.3.2.2. Ионизирующее облучение.** Гибель клеток при воздействии ионизирующих видов излучения обусловлена протеканием химических реакций, в которых участвуют продукты радиолиза воды (свободный радикал кислорода, перекись водорода), образовавшиеся в клетке и субстрате.

Для лучевой стерилизации применяют ионизирующее излучение  $\gamma$ -лучами и поток ускоренных электронов. Источником  $\gamma$ -излучения являются радиоактивные элементы  $\text{Co}^{60}$  и  $\text{Cs}^{137}$ . Его применяют для стерилизации изделий из полимерных материалов (одноразовые шприцы, чашки Петри, системы для переливания крови).

Поглощенная доза излучения – количество энергии, поглощенное единицей массы среды, через которую проходит излучение. За единицу измерения поглощенной дозы в системе СИ принят грей (Гр). 1 Гр – это такая доза, при которой массе 1 кг передается энергия ионизирующего излучения в 1 джоуль. Для радиорезистентных микроорганизмов стерилизующая доза в 2–3 раза больше, чем для радиочувствительных.

Обработку проводят в специальных камерах проходного типа. При нагрузке не более 100 кл./образец достаточна стерилизующая доза 25–35 кГр, 2 раза по 5 мин.

Обычно клетки грамотрицательных бактерий более чувствительны по сравнению с грамположительными, наименее устойчивы вегетативные клетки. Более резистентны, чем клетки бактерий, мицелиальные и дрожжеподобные грибы, далее – эндоспоры бактерий и вирусы. Радиопоражаемость клеток одного вида зависит от возраста клеток (молодые клетки более чувствительны, чем сформировавшиеся), от состава среды и поглощенной дозы облучения.

### **6.3.3. Воздействие химических веществ неспецифического действия**

Мишени действия химических веществ неспецифического действия (иначе называемых дезинфектантами или биоцидами) разнообразны и присутствуют в клеточной стенке, мембранах и цитоплазме. Специфика применения таких веществ для дезинфекции и стерилизации состоит в том, что клетки млекопитающих имеют сходный химический состав.

Некоторые биоциды в низких концентрациях воздействуют на ферменты, принимающие участие в синтезе клеточной стенки, чем вызывают лизис микробных клеток. Глутаровый альдегид нарушает структуру клеточной стенки грамположительных бактерий, вызывая необратимое образование в ней перекрестных связей.

Воздействие на цитоплазматическую мембрану сопровождается нарушением мембранного потенциала (к этому приводит разобщение транспорта электронов и протонов, нарушение процесса фосфорилирования и потому прекращается синтез АТФ), угнетением активности ферментов цепи переноса электронов и синтеза АТФ, повышением проницаемости цитоплазматической мембраны (вплоть до утечки цитоплазмы).

Высокие концентрации некоторых биоцидов (хлоргексидина, фенола, солей ртути) вызывают общую коагуляцию цитоплазмы. В присутствии пероксида водорода происходит диссоциация рибосом на субъединицы. Акридиновые красители способны встраиваться в структуру ДНК, нарушая ее функции.

Высокореактивные агенты (оксид этилена,  $\beta$ -пропиолактон) алкилируют амино-, гидроксильные и карбоксильные группы, взаимодействуют с тио- и дисульфидными группами, нарушая структуру белков и ДНК.

Эффективность действия химического вещества на микроорганизм зависит от его вида и штамма. Некоторые химические вещества

обладают широким спектром антимикробного действия. Штаммовые отличия в чувствительности микроорганизмов к химическим воздействиям могут быть обусловлены плазмидами и транспозонами, а также связаны с составом среды, рН, температурой, концентрацией клеток в объекте. Основными факторами, определяющими эффективность действия химического вещества на клетки, являются концентрация вещества, состав среды, время контакта с микроорганизмами, температура.

#### **6.4. Основные группы химических соединений неспецифического антимикробного действия, применяемые для дезинфекции, антисептики и стерилизации**

Обработка химическими веществами, обладающими неспецифическим антимикробным действием, производится путем обмывания, протирания, погружения, заполнения или аэрозольной обработки (орошением, распылением, испарением). Аэрозольная обработка позволяет уменьшить расход дезинфектанта и снизить его разрушающее воздействие на обрабатываемую поверхность, обработать труднодоступные места. Эффективность воздействия повышается с уменьшением размера аэрозольных частиц. Оптимальным является размер частиц 1–10 мкм, сопоставимый с размером микробных клеток.

В медицине под дезинфекцией понимают процесс уничтожения преимущественно патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды с целью прервать передачу инфекционного агента от больного человека к здоровому. В условиях производства важно избавиться не только от патогенных и условно-патогенных, но также и от сапрофитных микроорганизмов, то есть спектр уничтожаемых микроорганизмов шире. Избавиться от сапрофитной микробиоты значительно сложнее, чем от патогенной, поскольку она лучше приспособлена к выживанию в условиях окружающей среды.

Для химической дезинфекции применяют окислители, поверхностно-активные вещества (ПАВ), спирты, альдегиды, надкислоты и фенолы. Объектами химической дезинфекции на фармацевтических производствах являются поверхности оборудования и стен, рабочие поверхности, инструменты.

Для химической стерилизации используют алкилирующие агенты (оксид этилена, формальдегид) либо окислители ( $H_2O_2$ ,  $O_3$ ,  $Cl_2O_2$ ). Объектами химической стерилизации являются изделия из резины и полимерных материалов, линзы, резиновые соски, тубики глазных капель, внутреннее пространство изолятора.

На рынке моющих, чистящих и дезинфицирующих средств Беларуси представлены три основных производителя: ЗАО «БелАсептика», ИП «Инкраслав» и ООО НПЦ «Химмедсинтез».

#### **6.4.1. Окислители**

В качестве дезинфектантов в фармацевтическом производстве используются вещества из группы окислителей, содержащие активный кислород и хлор.

Среди кислородсодержащих окислителей наиболее распространена перекись водорода.  $H_2O_2$  окисляет компоненты клеток, прежде всего ферменты и другие белки, что приводит к их денатурации (коагуляции). Растворы перекиси водорода используют для обработки помещений и коррозионностойкого оборудования из стекла и полимерных материалов в сочетании с моющими веществами.

Наиболее широко используют растворы  $H_2O_2$  в концентрациях 3–6%: 3%-е растворы обладают бактерицидным действием, 4%-е растворы – фунгицидным, 6%-е растворы – спороцидным. Для деконтаминации воздуха помещений можно применять 6%-й раствор  $H_2O_2$  в виде аэрозоля. При низких концентрациях растворы пероксида водорода нестабильны и легко разлагаются. Эффективность воздействия пероксида водорода повышается с увеличением температуры до 40–50°C.

Эффективность  $H_2O_2$  резко снижается в присутствии органических загрязнителей, поэтому перед дезинфекцией обязательна мойка. Все работы по приготовлению и дезинфекции проводятся в защитной одежде, перчатках и респираторе.

Перед стерилизацией перекисью водорода проводят тщательную очистку поверхностей стерилизуемого объекта от загрязнений, стерилизацию ведут при 18°C в течение 6 ч или при 50°C в течение 3 ч путем полного погружения стерилизуемого объекта в 6%-й раствор  $H_2O_2$ . После окончания выдержки стерильные объекты извлекают из раствора и отмывают от остатков средства с соблюдением условий асептики, отмывку ведут с использованием стерильной воды.

Дезинфицирующие средства, содержащие в качестве основного действующего вещества перекись водорода, представлены препаратами «Сандим-Д», «Сандим-НУК», «Оксидез».

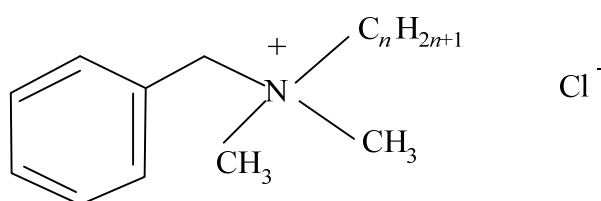
Среди окислителей, содержащих атом активного хлора, чаще всего используются препараты хлорной извести (техническая смесь гипохлорита, хлорида и гидроксида кальция) и хлорамина Б (натриевая соль хлорамида бензолсульфокислоты). Их применяют в виде 0,5–5,0%-х растворов для обработки коррозионностойкого оборудования, в концентрации 0,2% – для обработки емкостей и трубопроводов подачи инъекционной воды. Механизм действия этих окислителей заключается в том, что при их контакте с водой образуется хлорноватистая кислота, которая разлагается с образованием активного кислорода.  $\text{HClO}$  может реагировать с сульфгидрильными ( $-\text{SH}$ ) группами белков (цистеин, метионин), оказывая таким образом дополнительный антимикробный эффект.

Дезинфицирующие средства, содержащие в качестве основного действующего вещества окислитель на основе активного хлора (натриевую соль дихлоризоциануровой кислоты), представлены препаратами «Хлорdez», «Хлороцид», «Хлороцид-new».

#### 6.4.2. Поверхностно-активные вещества

Для очистки поверхностей применяют моющие средства, содержащие неионогенные и анионные ПАВ, которые обладают антимикробным действием. В химико-фармацевтической промышленности используют, например, препараты «Клинлаб» (содержит неионогенные ПАВ), «Сандим СЦ Эконом» (содержит ПАВ и гидроксид натрия).

Среди ПАВ для дезинфекции наиболее широко используются катионные – четвертичные аммонийные соединения (ЧАС): бензалкония хлорид (рис. 10), цетидилпиридиния хлорид, гуанидины.



$$n = 8, 10, 12, 14, 16, 18$$

Рис. 10. Бензалкония хлорид

Молекулы ПАВ липофильным концом входят в бислойную систему клеточной мембраны, увеличивая подвижность фосфолипидов и изменяя физико-химические и функциональные свойства мембраны. Нарушение проницаемости клеточных мембран сопровождается утеч-



кой цитоплазматического содержимого, клетка теряет калий, пурины, пиримидины, сахара и другие метаболиты. Соли гуанидинов вызывают денатурацию белка.

Дезинфектанты на основе катионных ПАВ используют для обработки оборудования, в том числе и коррозионнонестойкого. Бензалкония хлорид применяют в виде 1%-го раствора с экспозицией 30 мин, после чего удаляют вещество промыванием поверхности водой. Гуанидины используют в расчете 0,5% на 200 мл на 1 м<sup>2</sup> для дезинфекции помещения и оборудования.

ПАВ не действуют на эндоспоры бактерий, однако в смеси с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> обладают спороцидной активностью.

В Республике Беларусь производятся дезинфицирующие средства, содержащие триамин («Аминоцид», «Триацид», «Виродез»); гуанидины и другие ЧАС («Дуацид» (содержит полигексаметиленгуанидин), «Полидез» (содержит водорастворимый полимер на основе производных гуанидина, бензалкония хлорид, неионогенные ПАВ), «Беладез» (содержит полигексаметиленгуанидин)).

### **6.4.3. Спирты**

Из дезинфектантов на основе спиртов широко используются этиловый и изопропиловый спирты. 70–76%-е водные растворы этилового спирта применяют для малогабаритного и коррозионнонестойкого оборудования, широко используют в качестве антисептика. Действие спиртов основано на дезорганизации мембранных структур и коагуляции белков микробной клетки, поэтому на споровые формы спирты не действуют.

Коммерческие средства для дезинфекции и антисептики, содержащие в качестве основного действующего вещества спирты, представлены препаратами «Экстра-Дез» (содержит этанол), «Ультрацид» (содержит пропанол и изопропанол).

Феноксиэтанол (рис. 11) относится к классу ароматических эфирных соединений, имеет широкий спектр антимикробной активности (вегетативные клетки грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжеподобных грибов, вирусы инактивируются при экспозиции более 2 мин). Благодаря липофильности феноксиэтанол образует неспецифическую связь с цитоплазматической мембраной, что повышает ее проницаемость для ионов калия и приводит к другим изменениям, вплоть до разрушения мембран. В дальнейшем ингибирует синтез ДНК и РНК бактериальной клетки. В бактериостатических концентрациях нарушает окислительное фосфорилирование, отключает клеточное дыхание.

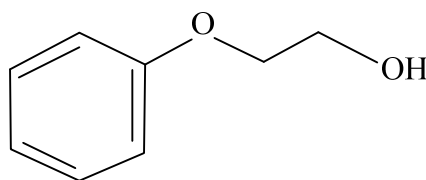


Рис. 11. Феноксиэтанол

Феноксиэтанол входит в состав средства для антисептической обработки рук «Мукосанин».

#### 6.4.4. Альдегиды

Среди альдегидов распространение получили глутаровый альдегид (рис. 12) и формальдегид. Альдегиды проникают внутрь живой клетки и вызывают коагуляцию белков цитоплазмы. Скоагулировавшие белки прочно прикрепляются к обрабатываемым поверхностям, поэтому перед обработкой растворами альдегидов требуется тщательно удалить загрязнения. Альдегиды обладают спороцидным действием и имеют низкую корродирующую активность, однако оказывают на персонал общетоксическое, раздражающее и нейротоксическое действие. Чем больше молекулярная масса альдегида, тем слабее раздражающее, но сильнее наркотическое действие.

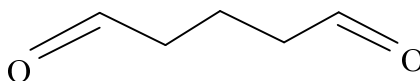


Рис. 12. Глутаровый альдегид

Формальдегид – высокореакционноспособное вещество, однако в связи с выраженным раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки для целей дезинфекции его применяют крайне редко. Использование формальдегида рекомендовано для стерилизации и дезинфекции аппаратов для диализа как альтернатива стерилизации оксидом этилена, поскольку он менее опасен, не горюч, его утечку можно контролировать по запаху, его транспортировка в виде водных растворов менее опасна, чем транспортировка оксида этилена в баллонах.

Средства для дезинфекции, содержащие альдегиды в качестве основного действующего вещества, представлены препаратами «Гексакон» (содержит смесь альдегидов), «Комбинированный дезинфектант» (содержит глутаровый альдегид).

#### 6.4.5. Надкислоты

Механизм действия надкислот (в частности, применяемой в составе средств для дезинфекции надуксусной кислоты (рис. 13)) аналогичен действию перекиси водорода, они обладают бактерицидным и фунгицидным действием. 0,3–0,5%-й раствор надуксусной кислоты используют для обработки коррозионностойкого оборудования.

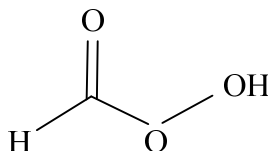


Рис. 13. Надуксусная кислота

Коммерчески производится средство для дезинфекции «Сандим-Д», содержащее надуксусную кислоту и перекись водорода.

#### 6.4.6. Фенолы

Фенолы взаимодействуют с азотистыми основаниями ДНК и РНК, с тиоловыми группами в составе белков. Из-за высокой токсичности в качестве дезинфектантов применяются редко. Из группы фенолов для дезинфекции используют смесь крезола (тривиальное название для смеси о-, м- и п-метилфенола) и ПАВ.

#### 6.4.7. Алкилирующие агенты

Действие алкилирующих агентов, в частности оксида этилена, основано на необратимом (химическом) связывании определенных участков ДНК и предотвращении полного отделения двух цепей молекул ДНК друг от друга в процессе деления клеток. Это обстоятельство делает невозможным размножение клеток.

Стерилизуемые оксидом этилена объекты обрабатывают в герметично закрывающемся аппарате типа автоклава, к которому присоединяют баллон с оксидом этилена. Концентрация этого газа в камере должна составлять 50–100 мг/л, влажность газовой смеси 30–60%, время воздействия 1–6 ч, температура 50–60°C. После такой стерилизации проводят активную (продувка стерильным воздухом) или пассивную (выдержка 20 сут) десорбцию оксида этилена с поверхности обработанных объектов.

### 6.5. Средства для антисептической обработки

Промышленная антисептика – отдельная область промышленной дезинфекции, которая предусматривает использование химических веществ неспецифического антимикробного действия (антисептиков) для

уничтожения или подавления размножения микроорганизмов на поверхности кожи (реже слизистых оболочках) персонала, занятого в производстве. Антисептики используют в комплексе санитарно-гигиенических мероприятий при подготовке персонала к работе (в производстве стерильных и нестерильных лекарственных средств) и в ходе выполнения технологического процесса (в асептических производствах).

В качестве антисептиков в лечебных учреждениях используют 3%-й раствор  $H_2O_2$ , 0,3–0,5%-й раствор хлорамина, растворы катионных ПАВ (до 1%), 0,02%-й раствор хлоргексидина биглюконата, 70%-й раствор этанола, растворы  $I_2$ ,  $KMnO_4$ , бриллиантовый зеленый. Последние три применяются только для обработки ран и порезов из-за окрашивания обрабатываемых поверхностей.

В Республике Беларусь зарегистрировано и разрешено к применению 17 антисептиков, преимущественно (15 из них) моно- и полиалкогольных. В качестве средств для антисептики используют 70%-й раствор этилового спирта («Этанол антисептический»), средства на основе изопропилового спирта («Септодез»), изопропанола, бутандиола, этанола («Септоцид Р Плюс»), этанола и полигексаметиленбигуанидина гидрохлорида («Септоцид-Синерджи»), полигексаметиленгуанидина гидрохлорида («Дермасепт-гель»), полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и феноксиэтанола («Мукосанин»).

## **6.6. Факторы, определяющие выбор и эффективность действия биоцидов на микроорганизмы**

Факторы, определяющие выбор и эффективность антимикробного агента:

– свойства активного действующего вещества: химическая природа (окислительно-восстановительная активность, растворимость в воде, поверхностная активность, стабильность при хранении), состав дезинфицирующего средства (наличие активаторов, стабилизаторов, взаимное влияние активности компонентов);

– характер микробиоты: чувствительность микроорганизмов к веществу и уровень микробной контаминации;

– условия применения: концентрация реагентов в рабочем растворе, экспозиция, температура раствора, наличие органических примесей на обрабатываемой поверхности, pH среды, характер обрабатываемой поверхности.

После проведения дезинфекции с объектов необходимо удалять остаточное количество антимикробного агента (промывка), а также вести химический контроль за полнотой удаления.

При повышении температуры активность дезинфектантов возрастает, поскольку при нагревании изменяется скорость реакций, рН и вязкость среды. Повышение температуры, при которой используется биоцид, позволяет снизить его концентрацию и уменьшить расход.

Загрязнения на обрабатываемой поверхности могут препятствовать проникновению биоцида в микробную клетку, инактивировать антимикробный агент путем его адсорбции или химической реакции. Катионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , присутствующие в жесткой воде, оказывают двойное воздействие: взаимодействуют с клеточной поверхностью и блокируют сайты связывания ее с биоцидом, однако и сами могут разрушать внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий, способствуя проникновению биоцида в клетку.

Показатель рН определяет степень диссоциации молекул биоцида, состояние поверхности клеточной стенки микроорганизма-мишени, характер и степень взаимодействия живых клеток и биоцида. Фенол и бензойная кислота более активны в кислой среде, а глутаровый альдегид и ЧАС – в щелочной. При повышении рН отрицательный заряд клеточной оболочки возрастает, что увеличивает активность связывания положительно заряженных ионизированных биоцидов (хлоргексидина, ЧАС).

Некоторые обрабатываемые материалы (ткани, резина) адсорбируют антимикробные агенты и клетки микроорганизмов.

Уровень антибактериальной активности дезинфектантов оценивают как низкий, если они действуют на большинство бактерий, грибов и вирусов (например, хлороксифенол, соединения ртути), средний, если действуют на все вегетативные формы бактерий, в том числе на микробактерии (этиловый спирт, изопропанол, бензалкония хлорид), высокий, если они уничтожают вегетативные формы всех групп микроорганизмов ( $\text{NaClO}$ , альдегиды,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Прионы стабильны при  $90^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, резистентны к воздействию формальдегида, глутарового альдегида, спиртов, к ультрафиолетовому излучению и ионизирующей радиации, проходят через мембранные фильтры с диаметром пор 25–50 нм, инактивируются при автоклавировании при  $135^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Для деконтаминации медицинского инструмента Всемирная организация здравоохранения рекомендует погружение его в раствор 1 н гидроксида натрия или гипохлорита натрия (с концентрацией активного хлора 20 000 ppm) на 1 ч с последующей механической очисткой и стерилизацией.

Чувствительность вирусов к биоцидам зависит от: структуры кора и капсида, числа и доступности мишени биоцидов (белков, липидов, нуклеиновых кислот), размера вирусной частицы, органа хозяина виру-

са и его иммунологического статуса, среды, в которой находится вирус, ассоциаций вирионов и от их количества, клона. Важное значение имеет среда (содержание органических веществ, рН, ионная сила), которая может нейтрализовать биоцид, а также влияние поверхности на активность биоцида. Вирусы способны к адгезии на поверхности частиц и материалов, микротрещины и другие повреждения могут служить укрытием для них, поэтому важна тщательная очистка поверхностей перед дезинфекцией.

Биоцид чаще всего действует на капсид, тогда как геном может оставаться неповрежденным и сохранять инфекционную активность. Вирусы, имеющие липидную оболочку, более резистентны к биоцидам, чем безоболочечные. Крупные безоболочечные вирусы инактивируются быстрее, чем мелкие. Резистентность вирусов определяется способностью к агрегации, модификацией мишени, изменением конформации молекул капсида, особым механизмом реактивации, рекомбинацией вирусной нуклеиновой кислоты и элементов капсида и др.

Вирусы способны адаптироваться к окружающей среде. Например, остаточные количества биоцидов могут быть причиной перестройки популяции вируса. Удаление агента, вызвавшего селективное давление, приводит к повышению инфекционной активности вируса. Поэтому при использовании биоцидов важно, чтобы не оставалось неповрежденных молекул нуклеиновых кислот, а также полнота обеззараживания объекта, поскольку заражающая доза для некоторых вирусов очень мала.

В табл. 11–13 приведены данные, позволяющие оценить эффективность действия некоторых веществ на вирусы с разным строением оболочки, клетки грамотрицательных и грамположительных бактерий, дрожжеподобных и мицелиальных грибов.

Таблица 11

**Остаточная контаминация вирионами при обработке загрязненных поверхностей через 10–30 мин контакта при 21–25°С биоцидами, %**

Биоцид	Оболочечные вирусы (герпес, грипп, оспа)	Безоболочечные вирусы (рино-, полиовирусы)	ВИЧ	Вирус гепатита В
Этанол	40	70–95	25–50	80
Изопропанол	30	Нет данных	20–35	Нет данных
Гипохлорит натрия	0,2	0,2	0,05–0,2	0,05
Глутаровый альдегид	2	2	1	0,1–1,0

Таблица 12

## Сравнительная устойчивость бактерий к биоцидам

Биоцид	Минимальная подавляющая концентрация (МПК) при микробной нагрузке 10 <sup>6</sup> КОЕ/мл			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Сорбиновая кислота (рН 6)	50–100	100–300	50–100	50–100
Бензойная кислота (рН 6)	50–100	200–500	100–200	100–200
Триклозан	0,1	Более 300	5	5
Хлоргексидин	0,5–1	560	1	5–10
Цетримид	4	250	32	Нет данных

Таблица 13

Подавляющая концентрация биоцидов для грибов, мг/дм<sup>3</sup>

Биоцид	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Penicillium ssp.</i>	<i>Aspergillus ssp.</i>
Кислоты				
Сорбиновая	25–50	200–500	Нет данных	200–500
Бензойная	500–1000	500–1000	Нет данных	500–1000
Пропионовая	2000	2000	Нет данных	2000
Парабены				
Метил	1000	600	160	500
Этил	800	400	80	250
Пропил	250	200	40	125
Бутил	125	150	20	100
ЧАС				
Бензалкониум хлорид	Нет данных	50	Нет данных	50
Цетримид	12,5	50	Нет данных	100
Спирты				
Этанол	100 000	100 000	Нет данных	100 000
Фенилэтанол	2500	5000	Нет данных	5000
Бронопол	200–1000	200–1000	50–200	200–1000
Соединения ртути				
Фенилртути нитрат	8	16	Нет данных	16

По своей устойчивости к физическим и химическим факторам микроорганизмы (неклеточные и клеточные формы) располагаются в порядке убывания:

- прионы;
- эндоспоры прокариот;
- микобактерии;

- цисты простейших;
- малые безоболочечные вирусы;
- трофозоиты простейших;
- большие безоболочечные вирусы;
- вегетативные клетки мицелиальных и дрожжеподобных грибов;
- грамотрицательные бактерии;
- оболочечные вирусы;
- грамположительные бактерии.

На практике не всегда возможно определить, какие микроорганизмы присутствуют в дезинфицируемом объекте, эффективность антимикробного агента оценивают по наиболее устойчивым контаминантам.

### **6.7. Требования к антисептикам и дезинфектантам для фармацевтической промышленности**

Основные требования, предъявляемые к химическим дезинфектантам и антисептикам:

- хорошая растворимость или способность смешиваться с водой с образованием стойких смесей;
- низкая токсичность и отсутствие раздражающего действия на кожу и слизистые оболочки;
- широкий спектр антимикробной активности с ее проявлением в максимально короткое время;
- способность хорошо смачивать объекты и не оказывать на них корродирующего или другого разрушающего действия;
- стабильность в процессе хранения;
- наличие разрешения на использование вещества в качестве дезинфектанта в химико-фармацевтической промышленности. Ограничение использования определяется безвредностью для персонала и наличием методов удаления следов этих веществ из объекта.

Не существует идеального антимикробного средства, сочетающего широкий спектр антимикробного действия, низкую токсичность и стабильность, поэтому часто используют комбинации антимикробных веществ в составе растворов для дезинфекции и антисептики, позволяющие улучшить их свойства путем сочетанного применения действующих компонентов.

Наиболее часто используемые комбинации включают в состав спирты, моющие (неионогенные и анионные) ПАВ, производные бигуанидина, а также окислители, содержащие активный хлор. Например,



средство для дезинфекции «Полидез» содержит бензалкония хлорид, водорастворимый полимер на основе производных гуанидина, моющие ПАВ и обладает бактерицидной (включая микобактерии туберкулеза), фунгицидной, вирулицидной активностью. «Комбинированный дезинфектант поверхностей» содержит катионные ПАВ (четвертичные аммонийные соединения), глутаровый альдегид и изопропиловый спирт, обладает бактерицидной (включая микобактерии туберкулеза), фунгицидной, вирулицидной, спороцидной активностью.

## **6.8. Роль антисептиков и дезинфектантов в контаминации объектов производства**

Почти все антимикробные вещества, применяемые для дезинфекции и антисептики, могут содержать микроборганизмы-контаминанты, основными из них (более 80%) являются бактерии рода *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. stutzeri*), встречаются *Burkholderia cepacia*, *Serratia sp.* Наиболее часто контаминированными оказываются растворы ЧАС и другие ПАВ, реже – растворы перекиси водорода и формальдегида.

Последствиями использования контаминированных растворов дезинфектантов и антисептиков являются опасность загрязнения готового продукта и распространение устойчивых (в том числе – полирезистентных) к активным действующим веществам штаммов микроорганизмов.

Факторы, определяющие развитие устойчивости микроорганизмов:

- использование растворов препаратов с концентрацией ниже рекомендованной;
- нарушение сроков хранения биоцидов, что приводит к уменьшению содержания действующих веществ;
- длительное использование какого-либо антимикробного агента;
- фаза развития и скорость размножения клеток;
- состав среды, время выдерживания клеток в ней, температура и влажность.

### **6.8.1. Основные пути попадания микроорганизмов в растворы антимикробных веществ**

Микроорганизмы попадают в основные и рабочие растворы антисептиков и дезинфектантов в процессе их приготовления, хранения и использования. При приготовлении рабочих растворов дезинфектантов источниками микроорганизмов могут быть исходные сухие веще-

ства, концентрированные безводные жидкости, вода и другие растворители, стабилизаторы, другие вспомогательные вещества, посуда и инструменты для приготовления растворов. Контаминация средств для дезинфекции возможна с поверхности емкостей для их хранения, а также в результате неправильного хранения и использования (например, при открытом хранении, заборе растворов из емкостей с использованием грязного оборудования).

### **6.8.2. Требования GMP к приготовлению растворов антисептиков и дезинфектантов**

Правила приготовления растворов дезинфектантов и антисептиков в соответствии с требованиями GMP:

- 1) использовать предварительно вымытую посуду, для приготовления растворов использовать воду марки «очищенная»;
- 2) в производстве стерильных готовых лекарственных средств антисептики и дезинфектанты должны быть стерильными (стерилизуют фильтрованием через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм);
- 3) растворы дезинфектантов должны храниться ограниченное (строго определенное) время;
- 4) не допускается внесение свежеприготовленного раствора в частично использованный;
- 5) необходима периодическая смена дезинфектанта (ротация) для исключения появления устойчивых форм микроорганизмов.

### **6.8.3. Контроль биоцидов в производстве фармацевтической продукции**

Для испытания антимикробной активности рабочих растворов антисептиков и дезинфектантов используют качественные и количественные тесты. В качестве тест-микроорганизмов используют общепринятые штаммы, пригодные для испытаний питательных сред, а также изоляты культур, выделенных на производстве в ходе предыдущих мониторингов производственной среды.

Качественные тесты основаны на определении жизнеспособности тест-культур микроорганизмов после обработки дезинфектантом в течение времени экспозиции. Тест-культуры могут быть использованы в виде суспензионной культуры или после нанесения на рабочую поверхность и подсушивания. Количественные тесты основаны на сравнении количества жизнеспособных клеток тест-культур микроорганизмов до и после воздействия дезинфектанта. Количество жизнеспособных клеток в случае использования суспензионной культуры определяют путем посева необработанной и

обработанной суспензии микроорганизмов на агаризованную среду с последующим подсчетом выросших колоний. При проведении количественного теста, предусматривающего нанесение культур микроорганизмов на поверхность, для количественной оценки результатов используют контактный метод.

Антимикробную активность  $A$ , ед., определяют по формуле

$$A = \lg N_k - \lg N_d,$$

где  $N_k$  – число колоний, выросших при посеве контрольной взвеси, КОЕ;  $N_d$  – число колоний, выросших при посеве из взвеси с антимикробным агентом, КОЕ.

Процесс гибели клеток микроорганизмов, помещенных в среду с антимикробным агентом, может быть изображен графически (рис. 14).

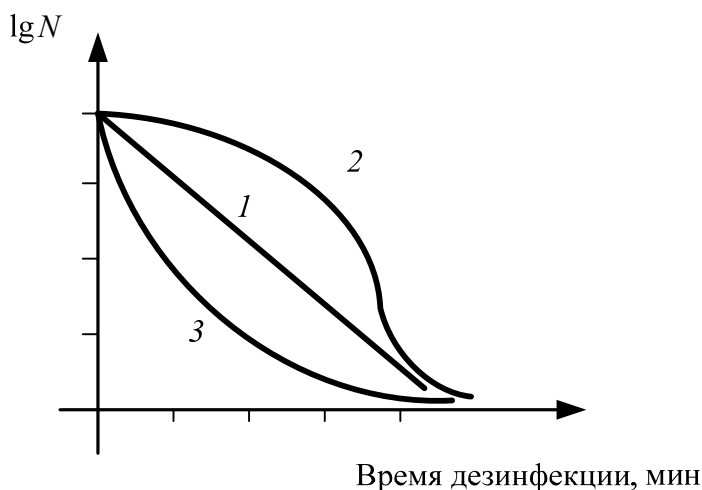


Рис. 14. Динамика гибели микробных клеток в среде с дезинфектантом

При этом возможна ситуация, когда процесс гибели будет подчиняться законам кинетики первого порядка (кривая 1) и эффективность дезинфекции можно оценить, используя константу скорости отмирания клеток  $K$ :

$$K = \frac{1}{\tau} \cdot \lg \frac{N_0}{N_\tau},$$

где  $N_0$  – начальное число живых клеток, КОЕ;  $N_\tau$  – число клеток, выживших к моменту времени экспозиции  $\tau$ , КОЕ.

Такое возможно при проведении лабораторного эксперимента с чистой культурой в лаг-фазе.

Чаще наблюдаются случаи, когда график представляет собой кривую 2, отражающую гибель наименее устойчивой части популяции в

начальный период, гибель основной части популяции, обладающей средним уровнем резистентности, в средний период и сохранение наиболее устойчивых клеток в конечной стадии процесса. При высокой концентрации дезинфектанта происходит быстрая гибель основной части популяции в начальный период времени (кривая 3). Этот рисунок иллюстрирует, что генетическая неоднородность бактериальной популяции не позволяет использовать законы кинетики первого порядка для оценки эффективности дезинфектантов на реальном объекте.

Взаимосвязь концентрации биоцида  $C$  и времени экспозиции  $\tau$  выражается формулой

$$\tau = \frac{1}{K \cdot C^\eta} \cdot \lg \frac{N_0}{N_\tau},$$

где  $\tau$  – время, необходимое для снижения микробной контаминации на 99%, мин;  $C$  – концентрация биоцида, мг/дм<sup>3</sup>;  $\eta$  – коэффициент разбавления биоцида;  $K$  – константа скорости отмирания для определенного микроорганизма и биоцида при определенном значении рН и температуры.

При лучевом воздействии величина  $C$  отражает дозу излучения на единицу обрабатываемой поверхности.

Для оценки активности дезинфектантов используют методы, основанные на определении количества живых (жизнеспособных) клеток или времени (скорости) гибели популяции. В таком испытании требуется учитывать влияние факторов внешней среды (температуры, рН, состава среды) и микробную нагрузку (количество клеток микроорганизмов в определенном объеме).

При оценке эффективности действия биоцидов чаще всего используют микробиологические методы. О жизнеспособности микроорганизмов также позволяют судить биохимические (например, активность ферментов) и физические методы. Микрокалориметр позволяет определить изменение температуры при размножении бактерий. Метод мембранной фильтрации с последующим окрашиванием акридиновым оранжевым позволяет отличить живые клетки (окрашиваемые) от неживых. Методами генетической инженерии могут быть созданы специальные тест-культуры светящихся бактерий, жизнеспособность которых можно оценивать методом биолюминесценции. Эти альтернативные методы пока не стандартизованы.

Для оценки способности антимикробного агента сохранять активность в присутствии увеличивающейся микробной нагрузки, а также оценки времени сохранения антимикробной активности определяют допустимую бионагрузку – предельное количество микроорганизмов в обрабатываемом объекте, при котором обеспечивается приемлемая

дезинфекция. Метод определения влияния бионагрузки основан на количественном испытании антимикробной активности дезинфектанта при ступенчатом внесении в раствор антимикробного вещества аликвот суспензии клеток тест-микроорганизма.

Определение антимикробной активности антисептиков проводят на людях-добровольцах путем нанесения на кожу кисти рук суспензии тест-микроорганизма, подсушивания в течение 3 мин на воздухе, обработки кожи испытуемым раствором антисептика, определения количества жизнеспособных клеток в смывах с рук жидкой питательной средой.

Контроль антисептических и дезинфицирующих средств проводится для антисептических и дезинфицирующих средств, применяемых в чистых зонах типа А, В, С, D. Лаборант-микробиолог отдела контроля качества осуществляет отбор проб объемом 100 мл в стерильные флаконы во время проведения микробиологического мониторинга, испытание проводят методом мембранной фильтрации. Микробиологические требования к дезинфицирующим средствам для помещений класса чистоты А, В, С – стерильно, КОЕ/100 мл, а для помещения класса D – 5 КОЕ/100 мл (предупредительный предел), 10 КОЕ/100 мл (предел, требующий принятия мер). Антисептические средства для помещений классов чистоты А, В, С, D должны быть стерильны.

## **6.9. Стерилизация в производстве фармацевтической продукции**

В промышленности используется две группы методов стерилизации, основанные на инактивации (уничтожении) микроорганизмов и на их удалении из стерилизуемого объекта. Инактивацию микроорганизмов в стерилизуемом объекте обеспечивают термические, химические и лучевые методы стерилизации. Изъятие микроорганизмов из объекта стерилизации происходит при мембранной фильтрации. Результатом стерилизации объекта должно быть полное отсутствие в нем всех жизнеспособных форм микроорганизмов.

### **6.9.1. Критерии для выбора метода промышленной стерилизации**

Выбор промышленного метода стерилизации определяется следующими критериями:

- не допускается снижение биологической активности препарата более чем на 1–2% по сравнению с исходным и ухудшение рабочих свойств инструментов;
- максимальная гарантия безопасности для работающих и жителей прилегающих районов;
- метод должен быть эффективным и экономически выгодным.

### 6.9.2. Влияние бионагрузки на эффективность стерилизации

Для оценки эффективности летального действия того или иного фактора используют показатель  $D_{10}$  – время выдержки при заданной температуре или время радиации, при которой происходит снижение концентрации клеток в 10 раз, то есть гибель 90% клеток в популяции.

Уровень гарантированной стерилизуемости объектов в производстве лекарственных средств должен составлять  $10^{-6}$ , т. е. из  $10^6$  единиц готовых лекарственных форм количество нестерильных меньше или равно единице.

Наибольшая эффективность обеспечивается при реализации термических методов стерилизации: эффективность автоклавирования составляет  $10^{-6}$ , стерилизации сухим горячим воздухом –  $10^{-12}$ . Эффективность стерилизации оксидом этилена и радиационной стерилизации составляет  $10^{-2}$ , мембранной фильтрации –  $10^{-3}$ .

Связь качества стерилизации и бионагрузки стерилизуемого материала представлена на рис. 15. При исходном количестве жизнеспособных форм в объекте  $10^6$  КОЕ и  $D_{10}$ , равном 1 мин, время стерилизации автоклавированием при  $121^\circ\text{C}$  с достижением гарантированного уровня стерильности  $10^{-6}$  составляет 12 мин. Снижение количества присутствующих в объекте живых клеток и спор до уровня  $10^2$  дает возможность сократить время стерилизации на 4 мин.

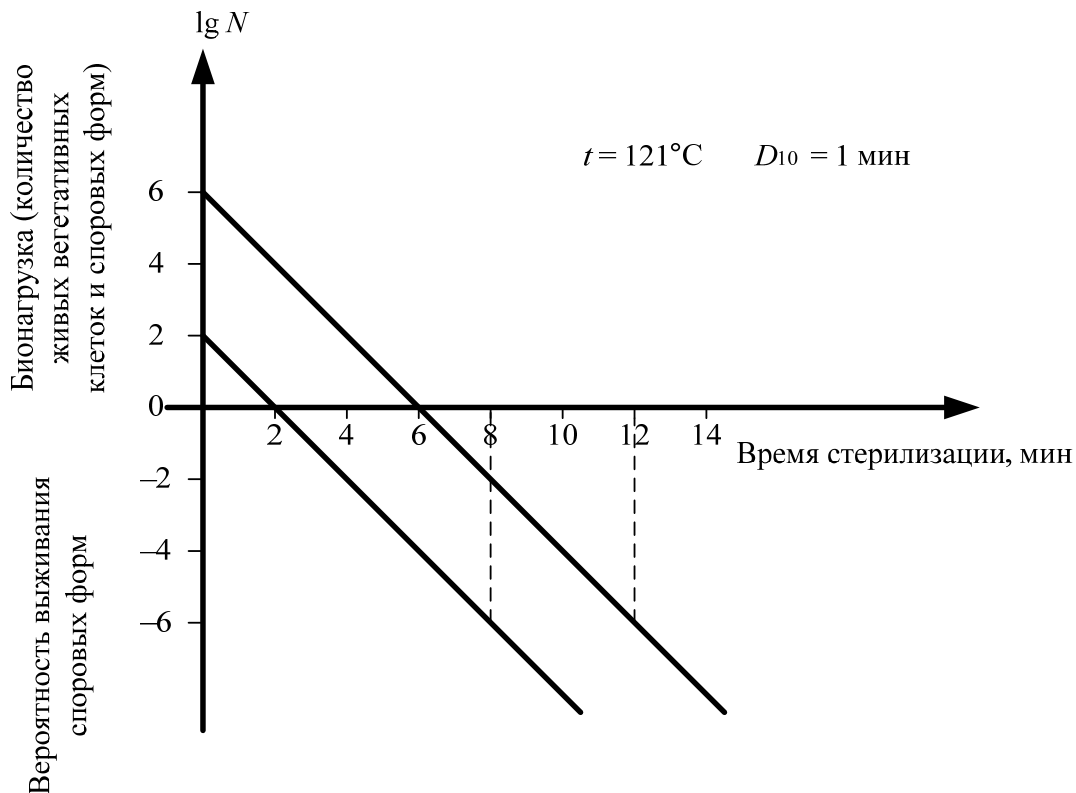


Рис. 15. Зависимость качества стерилизации от бионагрузки

Оценка бионагрузки включает определение числа микроорганизмов, контаминирующих объект. Снижение уровня бионагрузки путем предварительной очистки позволяет уменьшить затраты на стерилизацию. В процессе производства нужно принимать меры, ограничивающие возможность размножения микроорганизмов в период, предшествующий стерилизации. В идеальном случае бионагрузку нужно определять для каждого продукта, но на практике используют средние результаты оценки (ведется ее мониторинг).

### **6.9.3. Новые и перспективные методы стерилизации**

Существующие методы стерилизации обладают ограничениями, особенно в отношении термочувствительных веществ, поэтому исследуются возможности применения новых методов стерилизации – световых лучей высокой интенсивности и низкотемпературной плазмы. Их ограничение – непригодность для препаратов, содержащих белки и нуклеиновые кислоты.

Высокоинтенсивная световая стерилизация основана на использовании генератора коротких вспышек световых волн широкого спектра от ксеноновой лампы, интенсивность которых в  $10^5$  раз превышает интенсивность лучей солнечного спектра. Такой вид стерилизации может быть использован для прозрачных бесцветных растворов, помещенных в ампулы из материалов, пропускающих ультрафиолетовые лучи.

Плазма – газ или пар, который под действием электрического или магнитного поля переходит в ионизированное состояние и представляет собой смесь нейтральных частиц, ионов и электролитов, где положительно и отрицательно заряженные частицы находятся в равновесии. Плазма может быть сгенерирована из разных веществ, но наибольшей антимикробной активностью обладает плазма из хлора, глутарового альдегида и пероксида водорода. Этот вид стерилизации применим для тех же объектов, что и химическая стерилизация оксидом этилена, при этом исключается необходимость десорбции газа и отсутствует коррозия при стерилизации металлических инструментов.

Плазменный стерилизатор представляет собой камеру вместимостью около  $75 \text{ дм}^3$ , из которой удаляется воздух, затем в нее подается, например, пероксид водорода в парообразном виде, который под действием электрического поля переходит в состояние плазмы. Время стерилизации 60–90 мин при температуре менее  $50^\circ\text{C}$ .

Для повышения эффективности стерилизации при сохранении качества стерилизуемого продукта перспективным также считают использование ультравысокого давления, высокого напряжения, интен-

сивного лазерного и некогерентного пульсирующего излучения, пульсирующего магнитного поля высокой интенсивности, сочетания небольшого нагрева и повышенного давления с ультразвуком, однако на существующем этапе разработки они недостаточно эффективны.

#### **6.9.4. Контроль эффективности работы стерилизующих устройств**

К организации контроля стерилизующих устройств предъявляют следующие требования:

- контроль должен осуществляться постоянно;
- средства контроля должны устанавливаться в наименее благоприятных для стерилизующего действия местах;
- соблюдение мер предосторожности с целью предотвращения попадания индикаторных микроорганизмов в сферу производства.

Для контроля эффективности работы стерилизующих устройств используют технические, химические и биологические методы.

К техническим методам относятся проверка показаний манометров, термометров, термопар, дозиметров и других устройств. Такой контроль проводят поверочные службы на предприятии.

В основе химических методов лежит использование веществ, изменяющих свой цвет или физическое состояние при стерилизации. Например, используют запаянные ампулы с химическим веществом в виде порошка, предварительно смешанным с красителем, бумажные индикаторы с нанесенной полоской, кругом или секторами определенного цвета. При контроле работы автоклава или сухожарового шкафа такие индикаторы или ампулы помещают внутрь контролируемого оборудования, при достижении в нем определенной температуры порошок в ампуле или внутри тест-полоски индикатора плавится, образуя равномерно окрашенный расплав. Для контроля температуры 121°C используется бензойная кислота, 115°C – антипирин. Некоторые химические индикаторы изменяют цвет под действием оксида этилена, определенной дозы ионизирующего излучения, регистрируют полноту удаления воздуха из автоклава.

Биологические методы основаны на проверке гибели тест-микроорганизмов в условиях стерилизации. Эта группа методов контроля дает наиболее полную информацию, поскольку не только проверяются параметры стерилизационного цикла, но и подтверждается реальный факт гибели контаминирующей микробиоты. Недостатком является ретроспективность ответа.

При биологическом контроле стерилизации к тест-штаммам предъявляются требования:



– сопротивляемость штамма должна быть более высокой по сравнению с сопротивляемостью микроорганизмов, которые могут присутствовать в объекте;

- не должен быть патогенным;
- должен легко культивироваться.

В качестве тест-микроорганизмов чаще используются эндоспоры бактерий рода *Bacillus* (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis* var. *niger*).

Биоиндикатор для контроля работы автоклава представляет собой суспензию спор *B. stearothermophilus*  $10^6$  КОЕ/см<sup>3</sup> в подходящей жидкой питательной среде (мясо-пептонном бульоне) с добавлением индикатора бромкрезолового пурпурного. Ампулу с этим содержимым помещают в автоклав вместе со стерилизуемым объектом. После стерилизации биоиндикатор переносят в термостат при 55°C. При неэффективной стерилизации оставшиеся жизнеспособными споры прорастают, дают изменение цвета индикатора рН среды, в результате размножения клеток среда становится мутной.

Для проведения биологического контроля эффективности стерилизации используют пластиковый пенал, закрытый крышечкой с бактериальным фильтром, внутри которого находится тест-полоска со спорами в количестве  $1 \cdot 10^5$  КОЕ и герметичная стеклянная ампула с питательной средой и красителем. На этикетке может быть нанесен химический индикатор, который меняет цвет в ходе процесса. После окончания стерилизации надавливают на пенал и раздавливают ампулу со стерильной средой. Контроль проводится по другому пеналу с раздавленной ампулой. Оба пенала помещают в термостат на 48 ч.

Для преодоления основного недостатка этой группы методов контроля – ретроспективности ответа – разработана система, предусматривающая определение фермента  $\alpha$ -глюкозидазы, свидетельствующего о жизнеспособности спор и определяемого с помощью реакции превращения нефлуоресцирующего субстрата во флуоресцирующий продукт за 1 ч.

## **6.10. Промышленная асептика на объектах и участках в производстве биотехнологической и фармацевтической продукции**

### **6.10.1. Мероприятия по созданию помещений разных классов чистоты**

Требуемый уровень чистоты помещения (зоны) обеспечивается организацией производственных помещений, выбором и правильной эксплуатацией оборудования, подбором и гигиенической подготовкой

персонала, микробиологическим контролем производства и готовой продукции.

Нестерильные лекарственные препараты производятся в неасептических условиях, приближенных к асептическим (чистых помещениях класса С и D).

Стерильные лекарственные препараты производятся в асептических условиях, которые исключают возможность загрязнения микроорганизмами, пирогенами, механическими частицами. Для стерильных ЛС, подлежащих финишной стерилизации, наполнение и герметизация осуществляются в зоне класса А в окружении С, для неподлежащих финишной стерилизации – в зоне А в окружении В.

Помещения класса чистоты А представляют собой локальные зоны для технологических операций, представляющих высокий риск для качества продукции и потому требующих самого минимального риска контаминации, например, зоны наполнения, укупорки, вскрытия ампул и флаконов, смешивания в асептических условиях. Условия класса А предполагают рабочее место с ламинарным потоком воздуха ( $0,45 \pm 20\%$ ) м/с.

Помещения класса чистоты В являются окружающей средой для зоны А в случае приготовления растворов и наполнения в асептических условиях. В помещениях класса чистоты В осуществляют операции загрузки стерилизуемых в первичной упаковке растворов на стерилизацию, стерилизующей фильтрации растворов, лиофильной сушки, сушки и упаковки технологической одежды.

Помещения классов чистоты С и D представляют собой чистые зоны для ведения технологических операций, допускающих более высокий риск контаминации. В помещениях класса чистоты С осуществляют приготовление и предварительную фильтрацию растворов, выгрузку лекарственных средств после стерилизации, хранение лекарственных средств и вспомогательных материалов, а также приготовление растворов, подлежащих стерилизующей фильтрации. В помещениях класса чистоты D просматривают, маркируют, упаковывают и хранят готовую продукцию.

Класс чистоты помещения (зоны) устанавливает пределы содержания частиц в  $1 \text{ м}^3$  воздуха: микробных в производстве НЛС, микробных и механических в производстве СЛС (табл. 14). Частица – твердый, жидкий или многофазный объект или микроорганизм с размерами от 0,005 до 100 мкм. При классификации «чистых» помещений рассматриваются частицы размером 0,5 и 5,0 мкм.

**Система классификации чистых зон по максимально допустимому числу частиц в воздухе (GMP ЕС)**

Классы чистоты	Максимально допустимое число частиц в 1 м <sup>3</sup> воздуха			
	Оснащенное состояние		Эксплуатируемое состояние	
	0,5 мкм	5 мкм	0,5 мкм	5 мкм
A	3500	0	3500	0
B	3500	0	3500	2000
C	350 000	2000	3 500 000	20 000
D	3 500 000	20 000	Не определено	Не определено

Одним из способов создания асептических условий является использование изолирующих технологий, предполагающих физическую изоляцию рабочей зоны от окружающего пространства. Изолятор представляет собой локальное контролируемое пространство, отделенное от внешней среды с целью исключения попадания из нее потенциальных загрязнений. Пространство, окружающее изолятор, должно соответствовать, по крайней мере, зоне D.

Преимущество использования изолирующих технологий:

- разделение процесса и персонала, тем самым защита персонала от вредного воздействия фармацевтических продуктов;
- возможность эффективной биологической деконтаминации внутреннего пространства изолятора;
- стерильная передача материалов в изолятор и из него;
- снижение затрат на строительство и эксплуатацию чистых помещений.

При выполнении операций в асептических условиях обязателен микробиологический мониторинг производственной среды для получения информации о качестве окружающей среды асептического технологического процесса, предотвращения выпуска потенциально загрязненного продукта, а также предупреждения возможности такого загрязнения в будущем за счет выявления неблагоприятных тенденций.

Частота отбора проб в ходе микробиологического мониторинга зависит от класса чистоты помещения: зоны класса А – каждую рабочую смену, зоны класса В – каждую смену или ежедневно, зоны класса С – 2 раза в неделю, зоны класса D – еженедельно.

Контроль в процессе производства, осуществляемый в производственных помещениях, не должен оказывать отрицательного влияния на технологический процесс и качество продукции.

- Ключевые точки при текущем микробиологическом мониторинге:
- зоны наиболее высокой вероятности контаминации продукта;
  - зоны наибольшего скопления микроорганизмов;
  - труднодоступные зоны для уборки и дезинфекции;
  - точки смежных зон (класса А и В);
  - зоны возмущения воздушных потоков рельефом поверхности.

Все выявленные в процессе проведения мониторинга микроорганизмы подлежат обязательной макроскопической и микроскопической идентификации, это дает возможность предположить источник контаминации, основываясь на преимущественном распространении микроорганизмов во внешней среде. При обнаружении спорообразующих бактерий или грибов необходимо проводить дополнительную дезинфекцию помещений.

#### **6.10.2. Мероприятия по обеспечению требуемого уровня микробиологической чистоты в производстве стерильных лекарственных средств, подлежащих и не подлежащих финишной стерилизации**

Мероприятия по созданию помещений нормированных классов чистоты включают:

- строительно-планировочные мероприятия;
- подготовку вентиляционного воздуха;
- санитарную подготовку оборудования;
- подготовку персонала и правил его поведения.

**6.10.2.1. Строительно-планировочные мероприятия по созданию помещений нормированных классов чистоты.** Производственные помещения необходимо проектировать, располагать, приспособлять, оснащать, содержать и обслуживать таким образом, чтобы они соответствовали своему назначению, обеспечивали возможность проведения эффективной уборки и эксплуатации с целью исключения микробной и перекрестной контаминации, а также других факторов, которые могут отрицательно повлиять на качество продукции.

Помещения следует располагать в соответствии с последовательностью технологического процесса и классов чистоты. Не допускается примыкание помещений классов чистоты А, В, С, D к наружным ограждающим конструкциям. Помещения более высокого класса чистоты необходимо располагать внутри помещений более низкого класса. Чистые зоны следует проектировать так, чтобы отсутствовала необходимость входа в них наблюдающего или контролирующего персонала.

Различные операции по подготовке компонентов, приготовлению продукта и наполнению сосудов должны выполняться в отдельных зонах внутри чистого помещения.

Помещение классов чистоты А, В, С нельзя размещать в цокольном этаже, в подвале. Рекомендуемое расположение чистого помещения – в середине здания, без контакта с наружными стенами. Вход в помещения целесообразно оборудовать воздушным шлюзом, в который сдувается пыль с одежды и обуви персонала.

В зонах А и В запрещено устанавливать раковины, сточные трубы, открытые коммуникации.

Исключают возможность скапливания пыли как источника механических и микробных частиц. Все производственные помещения должны иметь гладкие внутренние поверхности (стены, пол, потолки) с минимальным количеством выступающих частей и ниш, должны быть непроницаемы для жидкостей и легко доступны для мытья и обработки дезинфицирующими средствами.

В чистых зонах все открытые поверхности должны быть гладкими, непроницаемыми и неповрежденными. Покрытия выбирают с учетом устойчивости к действию моющих средств и механическим воздействиям. Помещения для изготовления стерильных лекарственных средств должны быть без деревянных поверхностей. Стены чистых помещений покрыты полированным металлом (алюминий, нержавеющая сталь), полимерными материалами или эпоксидными эмалями.

В качестве покрытия для пола используют поливинилхлорид, эпоксидные и полиуретановые смолы, однако они обладают невысокой стойкостью к царапанью. Лучшее на сегодняшний день – покрытие пола керамической плиткой. Используют закругленные сопряжения между полом, потолком и стенами с радиусом 300 мм.

Части или поверхности оборудования, соприкасающиеся с продукцией, должны быть изготовлены из нетоксичных коррозионностойких материалов, которые не вступают с ней в реакцию, не обладают абсорбционными свойствами и не выделяют какие-либо вещества в такой степени, чтобы это могло повлиять на качество продукции. Его поверхности должны быть гладкими, доступными для мойки и обработки дезинфицирующими средствами или стерилизации.

Конструкции передаточных устройств могут варьировать от устройств с одинарной или двойной дверью до полностью герметизированных систем с зоной их стерилизации (стерилизуемый туннель).

Изоляторы могут быть введены в работу только после соответствующей валидации, учитывающей все критические факторы изоли-

рующей технологии (качество воздуха внутри и снаружи изолятора, технологии передачи и целостность изолятора).

Оборудование должно иметь регистрирующие устройства для контроля параметров процесса, должно быть снабжено устройствами сигнализации, извещающими о неисправности.

Стулья, столы в чистом помещении изготавливают из полимерных материалов, металлические ножки должны иметь круглое сечение. Подвесные потолки и фильтры тонкой очистки должны быть герметизированы.

Между помещениями различных классов чистоты должны быть переговорные устройства.

Доступ персонала и/или поступление исходного сырья, материалов, полупродуктов и оборудования в чистые помещения разрешается только через воздушные шлюзы.

**6.10.2.2. Подготовка вентиляционного воздуха для создания помещений нормированных классов чистоты.** Для получения воздуха с требуемыми характеристиками должны быть использованы способы, которые прошли валидацию, внесены в технологический регламент и разрешены в установленном порядке уполномоченным государственным органом.

Для обеспечения производства стерильных растворов обеспыленным стерильным воздухом используют как обычные системы турбулентной вентиляции, обеспечивающие стерильность воздуха в помещении, так и системы с ламинарным потоком воздуха по всей площади помещения или в определенных рабочих зонах.

При турбулентном потоке очищенный воздух содержит до 1000 частиц в 1 дм<sup>3</sup>, при подаче воздуха ламинарным потоком по всему объему помещения содержание частиц в воздухе в 100 раз меньше.

Системы ламинарного воздушного потока должны обеспечивать равномерную скорость движения воздуха: около 0,30 м/с для вертикального и около 0,45 м/с для горизонтального потоков.

Для создания сверхчистых помещений или отдельных зон внутри них размещается специальный блок, в который подается автономно ламинарный поток стерильного воздуха.

Воздухозаборные устройства устанавливаются над крышей на высоте 2 м с подветренной стороны.

Производительность вытяжной вентиляции должна составлять 80–90% от производительности приточной вентиляции.

В чистых помещениях подпор воздуха должен быть 4 мм рт. ст., температура  $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ , относительная влажность 30–40%. При отно-

сительной влажности более 50% начинается коррозия металлических деталей. При низкой относительной влажности на диэлектрических металлах может накапливаться статическое электричество, что способствует удерживанию на них частиц пыли.

**6.10.2.3. Санитарная подготовка оборудования для создания помещений нормированных классов чистоты.** Санитарная подготовка оборудования и помещения к работе подразумевает комплекс мероприятий в соответствии с письменной инструкцией, состоящий из влажной уборки и дезинфекции стен, полов.

До и после технологического процесса производится мойка и стерилизация съемных частей, обработка внутренней и наружной поверхностей моющими и дезинфицирующими средствами.

Съемные части оборудования, непосредственно соприкасающиеся с лекарственным средством, моют в растворе моющего средства, ополаскивают водой очищенной и водой для инъекций, заворачивают в два слоя пергаментной бумаги и стерилизуют при 120°C в течение 45 мин.

Дезинфицирующие средства необходимо чередовать (каждые 14 сут), чтобы предотвратить появление устойчивых к ним форм микроорганизмов. При тщательной и регулярной уборке реально достижение класса чистоты В, общее содержание микроорганизмов снижается на 40–60%, остаются обычно непатогенные микроорганизмы.

**6.10.2.4. Подготовка персонала и правила его поведения для создания помещений нормированных классов чистоты.** Персонал перед работой в асептических условиях проходит специальную подготовку и обучение – лекции, показ слайдов, практические занятия.

Весь персонал должен иметь знания и опыт для выполнения своих обязанностей, должен быть ознакомлен с правилами GMP.

Защита лекарственных препаратов от человека как источника загрязнения решается благодаря личной гигиене сотрудников и применению технологической одежды.

Руки моют мылом и щеткой с последовательным ополаскиванием водой. Сушка рук – не теплым воздухом, а путем вытирания бумажными салфетками. Затем руки антисептируют спиртом или спиртовыми растворами дезинфицирующих средств. Руки персонала после обработки должны быть стерильными.

Для обработки рук антисептическим средством 3–5 мл спиртового антисептического раствора следует нанести на руки и втирать, соблюдая технику, до высыхания (вытирать руки не следует), руки должны

быть влажными от антисептика не менее 15 с. Техника антисептической обработки рук после нанесения антисептического раствора включает его растирание между ладонями, затем между ладонью одной руки и тыльной стороной другой руки попеременно, далее между ладонями со скрещенными растопыренными пальцами, тыльной стороной согнутых пальцев по ладони другой руки, поочередно круговыми движениями сомкнутой в неплотный кулак одной руки с захватом большого пальца другой руки, и наконец поочередно равнонаправленными круговыми движениями трут ладони кончиками пальцев противоположной руки.

Люди с заболеваниями кожи или дыхательных путей, страдающие аллергией, с повышенной потливостью и отделением перхоти, а также с сухостью кожи и курящие к работе в асептических условиях не допускаются. Временно не допускаются больные инфекционными заболеваниями и сотрудники, имеющие загар или повреждения кожи.

Для входа в чистые помещения разных классов чистоты используется **технологическая одежда** – комплект производственной одежды, специально предназначенной для защиты сырья, упаковочных материалов, продукции, производственной среды от контаминации микроорганизмами и механическими частицами, выделяемыми человеком, и для защиты человека от опасных и вредных производственных факторов.

Основное назначение технологической одежды работников – максимально защищать продукт производства от частиц, выделяемых человеком. Особое значение имеет ткань, из которой изготавливается технологическая одежда – она должна обладать минимальным ворсоотделением, пылеемкостью, пылепроницаемостью, а также воздухопроницаемостью не ниже  $300 \text{ м}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$ , гигроскопичностью не менее 7%, не накапливать электростатического заряда. Для изготовления технологической одежды применяют ткани из полиэфирных, полипропиленовых или полиалкидных волокон, для изготовления нижней одежды используется ткань из лавсана с хлопком.

При работе во всех производственных помещениях волосы должны быть покрыты. Технологическая одежда для персонала включает комбинезон прилегающего силуэта без карманов и ремней, головной убор, бахилы и резиновые перчатки. В одежде должен быть минимум швов, края заправлены внутрь. Для изолирования кожи рук используются хирургические перчатки, предварительно обработанные мылом, затем раствором силиконовой эмульсии (вместо талька) и стерилизо-



ванные в автоклаве. Одежду меняют при каждом входе, защитную маску каждые 2 ч.

Процедуру переодевания для входа в чистые помещения выполняют в соответствии со схемами, расположенными в каждой комнате переодевания. Ответственность за соблюдение правил переодевания несет весь персонал, контроль за соблюдением – сменные мастера.

Комната переодевания условно разделена переходной скамьей на «грязную» и «чистую». **Переходная скамья** – скамья, которая служит вспомогательным средством при переодевании и является барьером против переноса загрязнений, находящихся на полу. Покидая производственное помещение, персонал должен выполнить процедуры переодевания в обратном порядке.

В зоне чистоты класса D для ношения рекомендуется защитный костюм общего назначения: блузон и брюки из смесовых тканей (например, из хлопка с лавсаном), тканевые или кожаные тапочки на нескользящей подошве либо бахилы, одноразовая шапочка. В зоне чистоты класса C следует носить костюм с брюками (цельный или состоящий из двух частей), плотно облегающий запястья, с высоким воротником, соответствующую обувь или бахилы, волосы спрятаны под шапочкой. Одежда и обувь не должна выделять ворс или частицы. В помещениях класса чистоты A/B следует носить стерильные брючный костюм или комбинезон, головной убор (шлем), маску, бахилы, резиновые или пластиковые перчатки. По возможности следует использовать одноразовую или специализированную технологическую одежду и обувь с минимальным ворсоотделением и пылеемкостью. Нижняя часть брюк должна быть спрятана внутрь бахил, а рукава – в перчатки.

Под технологическую одежду, предназначенную для ношения в помещениях классов чистоты A, B и C, надевают **нижнюю одежду** – комплект швейных или трикотажных нательных бельевых изделий (обычно из хлопка), включающих фуфайку и брюки, и при необходимости носки. Для промежуточного переодевания и перемещения вне производственных зон (например, при переходе из помещения класса чистоты D в помещение класса чистоты B без выхода в помещение класса чистоты C) используется **переходная одежда**. В некоторых случаях функцию переходной одежды играет нижняя одежда.

К работающим в чистых зонах предъявляются высокие требования в отношении личной гигиены и чистоты. Следует регулярно чи-

стичь зубы и принимать душ, мыть руки после посещения туалета, не трогать лицо руками. Нельзя носить наручные часы, ювелирные изделия, так как они имеют много скрытых мест, где могут скапливаться загрязнения; косметику, так как она является источником механических частиц и создает благоприятную среду для сохранения и размножения микроорганизмов на поверхности тела. Перед входом в чистое помещение надо вымыть руки, перед входом в стерильные зоны руки моют до локтя. Большое значение имеет частота смены одежды, зависящая от климатических условий и времени года. При наличии кондиционного воздуха одежду рекомендуется менять не реже 1 раза в день, а защитную маску каждые 2 ч. Резиновые перчатки следует менять после каждого контакта с кожей лица, а также в любом случае, когда возникла опасность их загрязнения.

В ходе технологического процесса во время работы в производственном помещении должно находиться минимальное количество рабочих, предусмотренное соответствующими инструкциями, перемещения персонала в помещениях классов чистоты В и С ограничиваются, запрещено поднимать и использовать предметы, упавшие на пол, разговаривать на посторонние темы. Двигаться в чистом помещении нужно не торопясь, избегая лишних движений (почесывания, жестикуляция, касания лица руками), нельзя громко говорить и кричать, при кашле и чихании нужно отвернуться от рабочей зоны. Нельзя наклоняться над рабочим местом и открытым продуктом, прислоняться к стенкам и оборудованию, переносить предметы, прижимая их к себе.

### **6.10.3. Мероприятия по исключению контаминации целевого продукта на стадии культивирования и химической очистки БАВ в производстве с участием клеток-продуцентов**

Лекарственные средства, получаемые с использованием биологических объектов (вакцины, иммунные сыворотки, антигены, пробиотики, аминокислоты, полипептиды, ферменты, гормоны, моноклональные антитела), называются **биологическими лекарственными средствами**. Правила их производства определяются требованиями ТКП 030-2017. Требования к производству и контролю качества каждого класса биологического продукта содержатся в отдельных руководствах.

Для получения биологических лекарственных средств используют культивирование клеток, включая получение по технологии рекомбинантной ДНК или гибридомы, экстракцию из биологических тканей, репродукцию живых агентов в эмбрионах или животных.

**Биотехнологическое лекарственное средство** – биологическое лекарственное средство, произведенное путем биотехнологических процессов с применением технологии рекомбинантной ДНК, технологии контролируемой экспрессии генов, кодирующих выработку биологически активных белков, методами гибридизации и моноклональных антител и других биотехнологических процессов.

**Биологически аналогичное лекарственное средство (биоаналог)** – биологическое лекарственное средство, аналогичное по безопасности, эффективности и качеству оригинальному лекарственному средству в такой же лекарственной форме.

Производство биологических лекарственных средств связано с биологическими процессами, которым, в отличие от физико-химических технологий, присуща изменчивость, в результате чего диапазон и характер побочных и сопутствующих продуктов варьируют. Контроль биологических лекарственных средств, как правило, связан с биологическими методиками испытаний, которые более вариабельны, чем физико-химические методы. Материалы, используемые в производстве биологических ЛС, сами являются хорошей питательной средой для роста контаминирующих микроорганизмов, поэтому характер производства, контроля и применения биологических ЛС требуют особых мер предосторожности.

**6.10.3.1. Требования к персоналу, помещениям и оборудованию.** Требования к персоналу, занятому в производстве биологических лекарственных средств:

– весь основной и вспомогательный персонал должен пройти соответствующее дополнительное обучение с учетом специфики производимой продукции, обязательна подготовка по гигиене и микробиологии;

– лица, ответственные за технологический процесс и контроль качества, должны иметь адекватную подготовку по соответствующим научным дисциплинам: биология, микробиология, бактериология, химия, медицина, фармакология, иммунология, вирусология, а также иметь достаточный практический опыт, позволяющий управлять процессом;

– персонал должен регулярно проходить контроль иммунного статуса в ходе медосмотров, вовремя вакцинироваться;

– сотрудники, работающие в зонах воздействия живых биологических объектов, не должны заходить в зоны и помещения, где работают с другой продукцией или другими организмами. В случае необ-

ходимости предусматриваются установленные процедуры деконтаминации (смена одежды и обуви, принятие душа и др.).

Общие требования к помещениям и оборудованию:

- оборудование должно быть сконструировано так, чтобы поддерживать производственные культуры в чистом виде, исключив контаминацию от внешних источников во время работы;

- предпочтительно использование закрытых систем и изолирующих технологий;

- одновременное производство разных ЛС в одной зоне с использованием закрытых систем биореакторов допускается только для моноклональных антител и ЛС, производимых с использованием рекомбинантных ДНК;

- расположение и планировка производственных зон и оборудования должны позволять проводить эффективную очистку и деконтаминацию;

- сточные воды, которые могут содержать патогенные микроорганизмы, необходимо эффективно обеззараживать.

**6.10.3.2. Требования к обращению с культурами клеток продуцентов. Система посевной культуры (seed lot system)** – это система, в соответствии с которой последовательные серии продукции производят из одной и той же главной посевной культуры при определенном количестве пассажей.

Для предотвращения нежелательных изменений свойств биологического лекарственного средства производство должно основываться на системах главной и рабочей посевных культур, или банках клеток. **Главная посевная культура (master seed lot)** – культура микроорганизмов, распределенная из одного объема посевной культуры в емкости за одну операцию таким образом, чтобы обеспечить единообразие, предотвратить контаминацию и гарантировать стабильность получаемого биологического лекарственного средства. Культура микроорганизмов, происходящая из главной посевной культуры и предназначенная для использования в производстве, называется **рабочей посевной культурой (working seed lot)**. Для проведения технологических процессов обычно используют рабочую посевную культуру, которую готовят из главной.

**Система банка клеток (cell bank system)** – система, посредством которой производят последовательные серии продукции с использованием клеточных культур, происходящих из одного и того же главного банка клеток, которая характеризуется идентичностью клеточной линии и полным отсутствием контаминации.

**Главный банк клеток (master cell bank)** – полностью охарактеризованная культура клеток, распределенная в контейнеры за одну операцию, обрабатываемая таким образом, чтобы обеспечить единообразие, сохраняемая таким образом, чтобы обеспечить стабильность.

**Рабочий банк клеток (working cell bank)** – культура клеток, происходящая из главного банка клеток и предназначенная для подготовки клеточных культур, используемых в технологическом процессе.

Правила работы с посевными культурами и банками клеток:

- доступ к ним открыт только персоналу, имеющему на это полномочия;
- количество генераций между посевной культурой или банком клеток и готовой продукцией должно быть постоянным и соответствовать регистрационному досье;
- должны создаваться, храниться и использоваться таким образом, чтобы свести к минимуму риск контаминации или изменения;
- контроль пригодности банков должен осуществляться регулярно;
- создание посевной культуры или банка клеток требуется осуществлять в контролируемой соответствующим образом окружающей среде для защиты их и, при необходимости, защиты персонала;
- во время создания посевной культуры или банка клеток не допускается одновременно работать в той же зоне или тем же сотрудникам с другими живыми объектами.

Доказательство стабильности и воспроизводимости посевных культур и банков клеток необходимо документировать путем маркировки контейнеров, проверки их герметичности, регистрации температурных параметров хранения, ведения протоколов использования контейнеров, содержащих посевные культуры и банки клеток, а также протоколирования отклонений от установленных пределов и предпринятых корректирующих действий.

Желательно разделять посевные культуры и банки клеток, хранить в разных местах с целью сведения к минимуму риска их полной потери.

**6.10.3.3. Правила производства активного фармацевтического ингредиента или промежуточной продукции путем культивирования или ферментации клеток.** Термин «классическая ферментация» относится к процессам, использующим для производства активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) микроорганизмы, существующие в природе и/или модифицированные традиционными методами (радиацией, химическим мутагенезом). Методом классической ферментации получают низкомолекулярные соединения: антибиотики, аминокислоты, витамины, углеводы.

Термин «**биотехнологический процесс**» относится к процессам, использующим для производства АФИ клетки и организмы, полученные или модифицированные с использованием рекомбинантной ДНК, гибридной или какой-либо другой технологии. Биотехнологическим способом получают как низкомолекулярные (антибиотики, аминокислоты, витамины, углеводы), так и высокомолекулярные (белки, полипептиды, гликопротеины) соединения.

Основные стадии получения АФИ или промежуточной продукции из культуры клеток или путем ферментации включают культивирование клеток, выделение и очистку БАВ, дополнительные стадии охватывают физико-химическую модификацию.

Мероприятия по обеспечению качества получения АФИ или промежуточных продуктов из культуры клеток или путем ферментации:

- поддержание в рабочем состоянии основного и рабочего банка клеток;
- использование качественных компонентов питательных сред, стерилизация сред;
- процесс предпочтительнее осуществлять в закрытых или изолированных системах. Все манипуляции с использованием открытых сосудов следует проводить в стерильных боксах или других устройствах, обеспечивающих контроль условий окружающей среды;
- непрерывный контроль критических рабочих параметров (температуры, рН, скорости перемешивания, скорости введения газов, давления);
- биологический контроль роста (скорость размножения, продуктивность, жизнеспособность);
- идентификация посторонней микробиоты и оценка ее влияния на качество продукции;
- обеспечение надлежащей процедуры сбора и очистки, при которых происходит удаление клеток или клеточных компонентов и других загрязнений, компонентов питательной среды с одновременной защитой АФИ от контаминации и потери качества;
- ведение протоколов процесса;
- очистка, санитарная обработка, стерилизация оборудования по окончании процесса.

Асептика в технологии микробного синтеза, если это возможно, обеспечивается подбором режима культивирования, подходящего для продуцента, но неблагоприятного для возможных примесных штаммов. В остальных случаях необходимо использование такой аппаратуры, которая обеспечивала бы гарантированную защиту культуральной среды от попадания посторонней микробиоты на всем протяжении процесса культивирования.

Приемы, позволяющие реально осуществить асептические процессы, основаны на многолетнем опыте создания и эксплуатации процессов асептического микробиологического синтеза и необходимости на всем протяжении производственного цикла строго соблюдать правила работы, обеспечивающие ничтожно малую вероятность контаминации. В этом отношении решения по промышленной асептике в микробиологическом синтезе уместно сравнить с правилами техники безопасности, имеющимися в любом промышленном производстве: построенные на отрицательном опыте и дают положительный результат только при их безусловном соблюдении.

### 6.11. Значение правил GMP в обеспечении качества фармацевтической продукции

Производитель лекарственных средств должен организовать их производство так, чтобы обеспечить их соответствие назначению, регистрационному досье, а также исключить риск для пациентов, связанный с недостаточной безопасностью, эффективностью, качеством. Фармацевтическое предприятие должно разработать руководство по качеству, содержащее описание системы управления качеством, включая обязательства ключевого персонала. **Обеспечение качества** – это совокупность организационных мероприятий, предпринимаемых в целях гарантии соответствия качества лекарственных средств их назначению.

Качество, безопасность и эффективность лекарственных средств должны быть подтверждены на всех этапах их разработки, испытания, производства и реализации (табл. 16).

Таблица 16

#### Система обеспечения качества лекарственных средств

Этапы обращения нового лекарственного средства	Система требований
Доклинические испытания	Good Laboratory Practice (GLP) – надлежащая лабораторная практика
Клинические испытания	Good Clinical Practice (GCP) – надлежащая клиническая практика
Промышленное производство	Good Manufacturing Practice (GMP) – надлежащая производственная практика
Хранение	Good Storage Practice (GSP) – надлежащая практика хранения лекарственных средств
Оптовая продажа	Good Distribution Practice (GDP) – надлежащая практика оптовой реализации
Поступление к потребителю через аптечную сеть	Good Pharmacy Practice (GPP) – надлежащая аптечная практика

Система обеспечения качества в производстве лекарственных средств предполагает:

- четкое определение обязанностей руководства;
- создание лекарственных средств путем планирования, разработки, исследования и внедрения с учетом требований правил надлежащей производственной и надлежащей лабораторной практики;
- составление четкой документации на все производственные и контрольные операции;
- производство, поставку и использование надлежащего сырья и упаковочных материалов, выбор и мониторинг поставщиков;
- изготовление, проверку и хранение готовой продукции в надлежащих условиях, исключающих риск получения некачественной продукции;
- качество продукции на протяжении всего срока годности при хранении, реализации и последующем обращении;
- выпуск лекарственных средств в обращение только после того, как уполномоченное лицо удостоверит, что каждая серия продукции была произведена и проконтролирована в соответствии с требованиями регистрационного досье и другими требованиями в отношении производства;
- проведение самоинспекции и/или аудита (контроля сторонней организации) качества, которые повышают эффективность системы обеспечения качества.

**Надлежащая производственная практика (GMP)** – часть системы обеспечения качества, которая направлена на обеспечение высокого уровня качества, безопасности и эффективности лекарственных средств и гарантирование того, что лекарственное средство изготовлено в соответствии со своей формулой (составом), не содержит посторонних включений, маркировано надлежащим образом, упаковано и сохраняет свои свойства в течение всего срока годности.

Надлежащая производственная практика устанавливает требования к системе управления качеством, контролю качества, персоналу, помещениям и оборудованию, документации, производству продукции и проведению испытаний, порядку отзыва продукции и организации самоинспекций.

Первые правила GMP появились в 1963 г. Сегодня в мире существует четыре варианта GMP: Европейского Союза (GMP EC), Соединенных Штатов Америки (cGMP), Всемирной Организации Здравоохранения (GMP ВОЗ), Схемы Конвенции фармацевтических инспекций (GMP PIC/S).



Все варианты правил схожи по идеологии и набору требований, основные различия заключаются в структуре требований и степени их детализации. Выбор той или иной модели GMP задает «систему координат» для национальных систем обращения лекарственных средств.

Государства с сильной регуляторной системой стремятся создавать свои стандарты и диктовать свои правила допуска препаратов на рынок, остальные страны адаптируют свое законодательство к уже известным стандартам. Выбор часто зависит от экспортного потенциала местных производителей и географии импорта. Например, в Китае правила GMP были первоначально созданы по подобию cGMP (США), в новой версии 2010 г. они приближены к GMP ЕС. Страны СНГ гармонизируют свое законодательство с правилами GMP, принятыми в ЕС и PIC/S, страны Африки, Азии – с GMP ВОЗ, Канада и Австралия – с cGMP (США). В общем случае правила GMP содействуют расширению экспорта медикаментов.

Основной документ в Республике Беларусь, который устанавливает принципы и правила GMP в сфере производства лекарственных средств, включая фармацевтические субстанции, – Технический кодекс установившейся практики (ТКП) 030-2017 (33050) «Надлежащая производственная практика». Настоящий ТКП соответствует Руководству по GMP Евросоюза с изменениями, обусловленными действующим законодательством Республики Беларусь. Принципы и правила производства и контроля качества лекарственных средств в надлежащих условиях предусмотрены также Законом Республики Беларусь от 20 июля 2006 г. № 161-З «О лекарственных средствах» (в ред. Закона Республики Беларусь от 17.11.2014 № 203-З), Государственной фармакопеей Республики Беларусь.

Основные положения GMP:

– все производственные процессы должны быть четко определены и описаны, систематически проверяться и пересматриваться с учетом накопленного опыта;

– все инструкции и процедуры должны быть даны в письменной форме ясно и однозначно, относиться к конкретным предметам и обеспечивать возможность выполнения операций;

– во время процесса производства необходимо вести записи (вручную и/или с использованием записывающих устройств), которые подтверждают выполнение всех стадий процесса в соответствии с установленными процедурами и инструкциями, а также что количе-

ство и качество продукции на каждом этапе соответствуют запланированным;

- любые отклонения должны быть запротоколированы и исследованы, должны быть приняты соответствующие корректирующие и предупреждающие действия;

- предприятие должно иметь в наличии: обученный персонал, имеющий необходимую квалификацию, подходящие площади и помещения, необходимое оборудование, соответствующие исходные материалы, упаковочные материалы, этикетки, соответствующие условия хранения и транспортирования продукции;

- на каждую производственную серию продукции должны вестись протоколы, позволяющие проследить историю серии;

- при оптовой реализации продукции должен быть сведен к минимуму риск снижения ее качества;

- должна быть организована система отзыва любой серии реализованной продукции, а также система расследования рекламаций на качество продукции, выявления несоответствий и принятия мер к предотвращению случаев несоответствия.

Неотъемлемой частью обеспечения качества лекарственных средств является **валидация** – документально оформленные действия, которые в соответствии с принципами надлежащей производственной практики доказывают, что определенная процедура, процесс, деятельность или система приводят к ожидаемым результатам с заранее установленными критериями приемлемости (ТКП 030-2017 «Надлежащая производственная практика»). Валидируются как процессы, так и методики испытаний.

Некачественные лекарства могут содержать токсичные вещества, добавленные неумышленно, поэтому для каждого процесса, способного влиять на качество продукции, должна быть детальная инструкция. Некачественные лекарства не только представляют опасность для здоровья людей, но и наносят материальный ущерб государству и индивидуальным потребителям. В долгосрочной перспективе поиск и исправление ошибок при изготовлении некачественных препаратов требует больше затрат, чем их предотвращение.

Так как многие микроорганизмы могут представлять опасность как патогены и деструкторы, нужна оценка риска контаминации для каждого продукта от исходного сырья до введения лекарственного средства пациенту. Должны быть разработаны стратегии, уменьшающие общую опасность риска до приемлемого уровня.

Система Hazard Analysis and Critical Control Points (НАССР) (анализ рисков и контроль критических точек) – один из современных методов управления качеством продукции, включающий в себя систематическую оценку всех этапов производственного процесса с выявлением критического в отношении качества продукции.

Производитель должен выбирать стратегию оценки, соответствующую худшему из возможных вариантов. Следует допустить вероятность ошибок при испытании препаратов на микробную чистоту и стерильность. Дизайн лекарственной формы и ее состав должны обеспечить максимальную защиту от микроорганизмов-контаминантов и биodeградации. Гарантия качества может быть обеспечена только путем детальной спецификации, контроля и мониторинга всех стадий производства и всех параметров технологических процессов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Матвеев, В. Е. Основы асептики в технологии чистых микробиологических препаратов / В. Е. Матвеев. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 312 с.

2. Основы фармацевтической микробиологии: учебное пособие / В. А. Галынкин [и др.]. – СПб.: Проспект Науки, 2008. – 304 с.

3. Промышленная дезинфекция и антисептика / В. А. Галынкин [и др.]. – СПб.: Проспект Науки, 2008. – 232 с.

4. Градова, Н. Б. Биологическая безопасность биотехнологических производств / Н. Б. Градова, Е. С. Бабусенко, В. И. Панфилов. – М.: ДеЛи принт, 2010. – 135 с.

5. Санитарно-микробиологический контроль в пищевой и фармацевтической промышленности / В. А. Галынкин [и др.]. – СПб.: СПХФА, 2004. – 248 с.

6. Надлежащая производственная практика: ТКП 030-2017 (33050). – Введ. 01.09.2017 г. – Минск: М-во здравоохран. Республики Беларусь, 2013. – 210 с.

7. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ. РБ II): разработана на основе Европейской фармакопеи. В 2 т. Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств / Министерство здравоохранения Республики Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под. общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно: Победа, 2012. – 1220 с.

Раздел 2.6 – «Биологические испытания» (С. 252–324).

Раздел 5.1 – «Общие тексты по микробиологии» (С. 761–795).

8. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ. РБ I): разработана на основе Европейской фармакопеи. В 3 т. Т. 2. Общие и частные фармакопейные статьи / Министерство здравоохранения Республики Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под. общ. ред. А. А. Шерякова. – Минск: (Б. и.), 2007. – 471 с.

Раздел «Частные фармакопейные статьи на субстанции для фармацевтического использования» (подразделы «Вода высокоочищенная», «Вода для инъекций», «Вода очищенная») (С. 93–100).

9. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества: СанПиН 10-124 РБ 99. – Введ. 19.10.1999. – Минск: РЦГЭиОЗ, 1999. – 12 с.

10. Учебно-методический комплекс по учебной дисциплине «Фармацевтическая микробиология» [Электронный ресурс] / Биологиче-

ский факультет БГУ. – Режим доступа: [http://www.bio.bsu.by/microbio/kursy\\_farmacivticheskaia\\_mikrobiologiya.html](http://www.bio.bsu.by/microbio/kursy_farmacivticheskaia_mikrobiologiya.html). – Дата доступа: 17.11.2015.

11. Основы промышленной асептики: учебные материалы [Электронный ресурс] / СФХТА. Факультет промышленной технологии лекарств. – Режим доступа: [http://www.fptl.ru/Y4eba\\_aseptika.html](http://www.fptl.ru/Y4eba_aseptika.html). – Дата доступа: 17.11.2015.

12. Каталог продукции [Электронный ресурс] / Официальный сайт компании «Беласептика». – Режим доступа: <https://belaseptika.by/catalog/>. – Дата доступа: 20.03.2018.

13. Принцип работы НЕРА-фильтра [Электронный ресурс] / Блог компании Tion. – Режим доступа: <https://geektimes.ru/company/tion/blog/264274/>. – Дата доступа: 20.12.2017.

14. Ламинарные боксы (укрытия) и боксы микробиологической безопасности [Электронный ресурс] / Официальный сайт компании ООО «Ламсистемс». – Режим доступа: <http://lamsystems.by/equipment/about>. – Дата доступа: 14.10.2017.

15. Статьи «Бактерии», «Вирусы», «Грибы» [Электронный ресурс] / Википедия (свободная энциклопедия). – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/>. – Дата доступа: 12.10.2017.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	3
Глава 1. Основные понятия учебного курса.....	4
Глава 2. Характеристика объектов окружающей среды как мест обитания микроорганизмов .....	8
2.1. Микробиота воды .....	8
2.2. Микробиота почвы.....	10
2.3. Микробиота воздуха .....	11
Глава 3. Санитарная микробиология объектов окружающей среды.....	12
3.1. Задачи, принципы и методы санитарной микробиологии. Санитарно-показательные микроорганизмы.....	13
3.2. Критерии санитарно-микробиологической характеристики воды .....	17
3.3. Критерии санитарно-микробиологической характеристики почвы .....	19
3.4. Критерии санитарно-микробиологической характеристики воздуха.....	21
Глава 4. Типовые источники, пути и способы контаминации объектов фармацевтического производства лекарственных средств .....	22
4.1. Основные источники контаминации в производстве фармацевтических препаратов.....	22
4.2. Воздух как источник контаминации объектов фармацевтического производства.....	22
4.3. Оборудование и производственные помещения как источник контаминации объектов фармацевтического производства .....	28
4.4. Сырье как источник контаминации объектов фармацевтического производства.....	32
4.5. Упаковочные материалы как источник контаминации объектов фармацевтического производства.....	41
4.6. Посевной материал как источник контаминации объектов фармацевтического производства .....	43
4.7. Персонал как источник контаминации объектов фармацевтического производства.....	43
Глава 5. Микробиологический контроль стерильных и нестерильных лекарственных средств .....	49

5.1. Микробиологический контроль нестерильных лекарственных средств.....	52
5.2. Микробиологический контроль стерильности в производстве стерильных лекарственных средств.....	57
5.3. Мембранные методы в водоподготовке, контроле объектов производства и производстве готовой продукции.....	67
5.4. Факторы, влияющие на жизнеспособность микроорганизмов-контаминантов в нестерильных лекарственных средствах	70
5.5. Использование консервантов в составе готовых лекарственных форм.....	71
Глава 6. Мероприятия по борьбе с микроорганизмами-контаминантами в производстве субстанций и готовых лекарственных форм .....	73
6.1. Краткая характеристика неклеточных и клеточных форм микробиологических контаминантов лекарственных средств	73
6.2. Причины устойчивости микроорганизмов-контаминантов к стерилизующему воздействию .....	76
6.3. Чувствительность и устойчивость микроорганизмов к повреждающим факторам и использование их в методах промышленной дезинфекции и стерилизации .....	81
6.4. Основные группы химических соединений неспецифического антимикробного действия, применяемые для дезинфекции, антисептики и стерилизации .....	86
6.5. Средства для антисептической обработки .....	91
6.6. Факторы, определяющие выбор и эффективность действия биоцидов на микроорганизмы .....	92
6.7. Требования к антисептикам и дезинфектантам для фармацевтической промышленности .....	96
6.8. Роль антисептиков и дезинфектантов в контаминации объектов производства .....	97
6.9. Стерилизация в производстве фармацевтической продукции...	101
6.10. Промышленная асептика на объектах и участках в производстве биотехнологической и фармацевтической продукции	105
6.11. Значение правил GMP в обеспечении качества фармацевтической продукции .....	119
Литература.....	124

Учебное издание

**Рымовская** Мария Васильевна

## **ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ АСЕПТИКИ**

Электронный курс лекций

Редактор *Ю. Д. Нежикова*  
Компьютерная верстка *Ю. Д. Нежикова*  
Корректор *Ю. Д. Нежикова*

Издатель:

УО «Белорусский государственный технологический университет».

Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/227 от 20.03.2014.

Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск.