

Учреждение образования  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**М. В. Рымовская**

# **ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ АСЕПТИКИ**

**Лабораторный практикум**

*Рекомендовано  
учебно-методическим объединением  
по химико-технологическому образованию  
в качестве учебно-методического пособия  
для студентов учреждений высшего образования  
по специальности 7-07-0711-01 «Технология лекарственных  
препаратов» профилизации «Промышленная технология  
лекарственных препаратов»*

Минск 2025

УДК [661.12+579.6](076.5)(075.8)  
ББК 35.66я73  
Р95

**Р е ц е н з е н т ы :**

кафедра фармацевтической технологии учреждения образования  
«Белорусский государственный медицинский университет»  
(заведующая кафедрой кандидат фармацевтических наук,  
доцент *Н. С. Голяк*);  
директор государственного учреждения «Республиканский  
научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»  
кандидат медицинских наук, доцент *В. А. Горбунов*

*Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или ее части не может быть осуществлено без разрешения учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет».*

**Рымовская, М. В.**

Р95      Основы промышленной асептики. Лабораторный практикум : учеб.-метод. пособие для студентов специальности 7-07-0711-01 «Технология лекарственных препаратов» профилизации «Промышленная технология лекарственных препаратов» / М. В. Рымовская. – Минск : БГТУ, 2025. – 153 с.  
ISBN 978-985-897-265-3.

Каждая из глав учебно-методического пособия содержит теоретическую часть и одну или несколько лабораторных работ. В основу последних заложены актуальные системы микробиологического анализа природных сред, контроля производственной среды, сырья и продуктов фармацевтических производств, создания и поддержания условий асептики при микробиологическом контроле и в процессе производства продукции.

Предназначается для студентов специальности 7-07-0711-01 «Технология лекарственных препаратов» профилизации «Промышленная технология лекарственных препаратов», также будет полезно магистрантам и аспирантам.

УДК [661.12+579.6](076.5)(075.8)  
ББК 35.66я73

ISBN 978-985-897-265-3      © УО «Белорусский государственный технологический университет», 2025  
© Рымовская М. В., 2025

## ВВЕДЕНИЕ

---

Одним из основных показателей качества готовых лекарственных средств и фармацевтических субстанций (активных фармацевтических ингредиентов) является уровень микробной чистоты. Присутствие микроорганизмов как в стерильных, так и в нестерильных лекарственных средствах создает опасность для здоровья и жизни человека, поэтому сведение к минимуму риска микробной контаминации фармацевтической продукции в процессе производства становится основной задачей инженеров-технологов.

Лабораторный практикум предполагает овладение основными подходами при санитарно-микробиологическом исследовании природных сред, традиционными при производстве лекарственных средств методами контроля качества продукции (контролем микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств), производственной среды (микробиологическим мониторингом объектов производственной среды), оценки антимикробной активности новых антисептиков и дезинфектантов, контроля режима термической стерилизации. В приложении представлен порядок подготовки к работе ламинарного бокса и бокса микробиологической безопасности III класса (изолятора), а также использования их для контроля стерильности лекарственных средств.

Лаборатория для выполнения работ по учебной дисциплине должна быть оборудована вытяжным шкафом, ламинарным шкафом, двумя суховоздушными и одним жидкостным термостатами, техническими и аналитическими весами, микроскопами, термометром с диапазоном измерения 0–100°C, pH-метром, установкой для фильтрования под вакуумом, микроволновой печью, должны быть подведены водопроводная вода и достаточное число электрических розеток. Альтернативно pH-метру можно использовать индикаторы бумажные для определения pH в диапазоне 6–8 с интервалом определения 0,2–0,3. В лаборатории должны быть необходимая лабораторная посуда, инструменты, расходные материалы, а также ингредиенты для приготовления химических реактивов и питательных сред.

Минимальный перечень лабораторной посуды включает термостойкие стеклянные стаканы, флаконы объемом 450 и 200 см<sup>3</sup>, мерные цилиндры, чашки Петри, пробирки биологические объемом 20 и 40 см<sup>3</sup>, стеклянные пипетки. При выполнении лабораторных работ студенты используют спиртовки, бактериологические петли и стеклянные шпатели, стеклянные палочки, лупу, штативы для пробирок, поплавки бактериологические, пинцеты. В число расходных материалов входят дистиллированная вода, технический этанол, фильтровальная бумага, мембранные фильтры, лакмусовая бумага, алюминиевая фольга, спички, марля медицинская, вата, карандаши или маркеры по стеклу, перчатки резиновые. Перечень и рекомендации по приготовлению и стерилизации химических реактивов и питательных сред приведены в каждом разделе пособия.

Также обязательно наличие наборов для микроскопирования (предметные и покровные стекла, мыло для обезжиривания предметных стекол, фильтровальная бумага), растворов красителей, оксидаторов и реек для окрашивания микробных препаратов, иммерсионного масла (альтернативно – глицерина).

Для стерилизации питательных сред и посуды используют автоклав и сухожаровой шкаф.

К каждому занятию на одну бригаду должны быть подготовлены стерильные стеклянные пипетки объемом 1 и 10 см<sup>3</sup> (по одной упаковке) либо автоматические пипетки, обеспечивающие отбор таких объемов воды, и стерильные наконечники к ним, по одной упаковке стерильных мембранных фильтров, стерильные биологические пробирки, чашки Петри и флаконы.

Перед выполнением лабораторных работ студенты проходят инструктаж по технике безопасности в химической и микробиологической лаборатории.

Отчет о выполнении лабораторной работы должен включать:

- 1) название работы;
- 2) наименование и характеристику объекта испытания;
- 3) цель работы;
- 4) план-схему выполнения лабораторной работы;
- 5) расчет количества питательных сред, стерильной посуды и расходных материалов;
- 6) результаты работы по выявлению и идентификации микроорганизмов в объекте испытания;

- 7) сопоставление численных значений с нормативными;
- 8) вывод о соответствии объекта испытаний требованиям, предъявляемым к нему по микробиологическим показателям.

Объект испытания для каждой бригады определяет преподаватель. Для получения допуска к лабораторной работе студент должен иметь частично оформленный протокол работы (первые пять пунктов) и знать порядок ее выполнения.

В ходе допуска к выполнению лабораторной работы студенты определяют необходимые для выполнения каждого анализа перечень и количество стерильной посуды и питательных сред, готовят питательные среды и реактивы в нужном количестве, закрывают алюминиевыми колпачками, подписывают с указанием наименования среды, ФИО исполнителей, даты приготовления и рекомендуемых параметров автоклавирования и передают лаборанту, готовят перечень и количество необходимой стерильной посуды и материалов и также передают лаборанту.

На защите лабораторной работы студенты сопоставляют полученные результаты микробиологического анализа для разных объектов (между бригадами), сравнивают их с нормативными, анализируют факторы, влияющие на содержание микроорганизмов в этих объектах, затем формулируют вывод.

Лабораторный практикум по дисциплине «Основы промышленной асептики» рекомендуется использовать в комплекте с электронным конспектом лекций.

# 1. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРИРОДНЫХ СРЕД

---

## 1.1. Принципы санитарно-микробиологического контроля природных сред

Через природные среды (воду, почву, воздух) и объекты (продукты питания, предметы обихода и др.) передаются и распространяются возбудители инфекционных заболеваний, существует потенциальная опасность возникновения массовых вспышек инфекционных заболеваний.

На страже обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения стоит санитарная микробиология. В настоящее время она представляет собой смежную с эпидемиологией и гигиеной область медицинской микробиологии, осуществляющую по сути постоянный мониторинг микроорганизмов и вызываемых их жизнедеятельностью процессов, которые косвенно или непосредственно оказывают влияние на здоровье людей и окружающую среду.

Проведение санитарно-микробиологического исследования природных сред и объектов возможно отделами санитарных служб, специализированными лабораториями, аккредитованными в установленном порядке, и санитарно-промышленными лабораториями. Объектом аналитического контроля является проба вещества или материала, отобранная с соблюдением правил асептики и всех необходимых условий, регламентированных соответствующими нормативными документами. Ошибки, допущенные при взятии проб, приводят к получению неправильных результатов. При упаковке и транспортировке проб нужно создавать условия, исключающие гибель или размножение исходной микробиоты в исследуемых объектах. Исследования необходимо проводить быстро; при невозможности немедленного проведения анализа материал сохраняют в холодильнике не более 6–8 ч. Каждая проба сопровождается документом, в котором указываются название исследуемого материала, номер пробы, время и место взятия, краткая характеристика объекта. На документе должна быть подпись лица, взявшего пробу.

Распределение микроорганизмов в загрязненных объектах неравномерно. Для получения объективных результатов следует отбирать несколько проб из разных участков. Доставленные в лабораторию пробы смешивают и анализируют среднюю пробу.

Природные среды динамичны, сменяемость микробиоты во времени и пространстве велика. Более адекватные результаты можно получить путем повторных отборов и анализов проб.

При проведении анализов следует использовать только стандартные и унифицированные методы исследований, так как стандартизация методов делает результаты исследований легко сравнимыми, достаточно полными и гарантирует отсутствие грубых ошибок. Методы исследований для каждого исследуемого объекта унифицированы и регламентированы соответствующими нормативными документами.

Чтобы получить разностороннюю санитарно-микробиологическую характеристику объекта и выявить отклонения от нормы, в работе необходимо использовать комплекс тестов – прямых (выявляющих патогены) и косвенных (указывающих на загрязнение объектов окружающей среды выделениями человека и животных).

Прямой метод используется по эпидемическим показаниям при возникновении угрозы распространения конкретной инфекции. Метод надежный, хотя и трудоемкий, позволяет выявить возбудителя одного вида и не свидетельствует об отсутствии других. Применяют посев на дифференциально-диагностические питательные среды, гибридизацию нуклеиновых кислот, полимеразную цепную реакцию, серологические, биологические и другие методы. Трудности выделения патогенных микроорганизмов из внешней среды обусловлены их незначительной концентрацией, неравномерностью распределения, конкуренцией между ними и сапрофитной микробиотой. Огромное значение имеет изменчивость возбудителя во внешней среде.

Косвенный метод позволяет более полно оценить санитарно-эпидемиологическое состояние объекта и заключается в установлении общей микробной обсемененности и обнаружении санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ). К косвенным методам относится также выявление метаболитов (чаще – токсинов) патогенных микроорганизмов.

Интерпретацию результатов санитарно-микробиологических исследований следует проводить с учетом других гигиенических

показателей (органолептических, химических, физических и др.) на основе установленных нормативов. Это связано с тем, что развитие микроорганизмов происходит в тесной взаимосвязи с другими факторами окружающей среды, которые могут оказывать как благоприятное, так и неблагоприятное влияние на их размножение. При оценке объектов по совокупности показателей необходимо иметь в виду следующее:

а) резкое отклонение микробиологических показателей от нормы даже при благоприятном уровне всех остальных характеристик должно считаться достаточным основанием для неблагоприятной оценки объекта;

б) в ряде случаев благоприятные санитарно-микробиологические показатели не гарантируют безопасности объекта, так как микроорганизмы воздействуют на организм в комплексе с другими факторами.

В силу этих особенностей большинство стандартов включает микробиологические нормы как один из элементов, характеризующих рассматриваемые объекты. В нашей стране действуют гигиенические нормативы, утвержденные постановлением Совета Министров Республики Беларусь № 37 от 25 января 2021 г.

Для оценки общего содержания микроорганизмов в санитарной микробиологии используют критерии: общее микробное число (ОМЧ) и количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ).

ОМЧ – это число всех микроорганизмов, присутствующих в 1 г ( $\text{см}^3$ ) субстрата или в 1  $\text{м}^3$  воздуха. Для определения ОМЧ можно использовать оптический метод прямого подсчета клеток бактерий под микроскопом, высева на полноценные питательные среды и установление содержания массы клеток.

Оптический метод незаменим в аварийных ситуациях, поскольку его можно выполнить в течение 1 ч, является простым и удобным, но имеет следующие недостатки: микроорганизмы образуют скопления или адсорбируются на частицах исследуемого субстрата; мелкие клетки микроорганизмов трудно поддаются учету; подсчитывается суммарное количество живых и мертвых клеток микроорганизмов, хотя они имеют разное санитарное значение. Прямой подсчет под микроскопом проводят с использованием специальных счетных камер (для относительно крупных клеток – дрожжеподобных и мицелиальных грибов), препаратов фиксированных и окрашенных

клеток, окрашенных мембранных фильтров (рекомендуется использовать при низкой плотности клеток). Метод позволяет судить о самоочищении воды. В начальной стадии процесса самоочищения грамотрицательных бактерий больше, чем грамположительных, а палочковидных форм больше, чем кокковых. На завершающей стадии соотношение меняется на обратное.

Высев на полноценные среды позволяет выявить определенную физиологическую группу бактерий, растущих при данных условиях. В этом случае под общим микробным числом (ОМЧ) понимают количество колоний, вырастающих на полноценной питательной среде для бактерий (мясопептонном (МПА) или рыбопептонном (ПА) агаре) в чашках Петри после определенного срока инкубации при той или иной температуре (22, 30 или 37°C) из 1 см<sup>3</sup> (для твердых субстратов – 1 г) исследуемого материала. Единицы измерения ОМЧ в этом случае – КОЕ/см<sup>3</sup> (КОЕ/г). Недостаток этого метода – неточность, так как получаемые данные численности ниже истинного количества микроорганизмов в исследуемом объекте, потому что невозможно подобрать универсальную среду и режим инкубации, подходящие для всех групп микроорганизмов; микроорганизмы, находящиеся в крупных агрегатах исследуемого объекта, не дают роста; возможен рост колоний на чашках Петри не из одной клетки; некоторые микроорганизмы теряют способность к размножению в силу антагонизма, конкуренции и других факторов.

Установление содержания массы клеток проводят путем взвешивания остатков бактериальной массы, определения показателей клеточного обмена. На практике этот метод практически не применяется.

КМАФАнМ – это число бактерий, способных образовывать колонии на поверхности и/или в объеме полноценной плотной питательной среды (например, МПА или ПА) при температуре 20–37°C в течение 24–48 ч, видимые с увеличением в 2 раза. Таким образом, для определения КМАФАнМ используется только высеv на полноценные питательные среды.

Критерии ОМЧ и КМАФАнМ используются для суждения об органическом загрязнении объекта, при этом исходят из предположения, что чем больше в объекте органических соединений, тем больше микроорганизмов, в том числе патогенных. Указанные критерии имеют большое значение при проведении сравнительных

исследований: внезапное повышение указывает на микробную обсемененность объекта из внешнего источника.

При определении ОМЧ значительное количество почвенных и водных микроорганизмов не учитывается (выпадают из учета анаэробы, грибы, серные, азотфиксирующие, нитрифицирующие и другие бактерии). При необходимости для учета этих микроорганизмов используют другие подходящие питательные среды.

Содержание санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ) выражают в титрах, индексах и наиболее вероятном числе (НВЧ). Титр – минимальное количество субстрата (см<sup>3</sup>, г), в котором еще обнаруживаются СПМ. Например: коли-титр воды – 300 см<sup>3</sup>. Индекс – количество СПМ, содержащееся в единице объема какого-либо субстрата. Например: коли-индекс воды – 3 ОКБ в 1 дм<sup>3</sup>. НВЧ – количество СПМ в единице объема субстрата (1 дм<sup>3</sup>, 1 см<sup>3</sup>, 1 г); имеет доверительные границы, в пределах которых может колебаться с вероятностью 95%.

## **1.2. Характеристика санитарно-показательных микроорганизмов**

Санитарно-показательные микроорганизмы – это представители облигатной микробиоты естественных полостей тела организма человека и теплокровных животных, которые постоянно выделяются во внешнюю среду, потому используются как индикаторы биологического загрязнения и косвенные показатели санитарного неблагополучия и потенциальной эпидемической опасности объекта.

СПМ очень часто относятся к условно-патогенной (оппортунистической, от англ. opportunity – удобный, подходящий случай, возможность) микробиоте, реализация патогенности которой зависит от определенных условий. Согласно Закону Республики Беларусь «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», эти микроорганизмы относятся к первой (низкий уровень риска для жизни и здоровья населения, редко становятся причиной инфекционных заболеваний) и второй (средний уровень риска для жизни и здоровья населения, способны вызвать инфекционные заболевания, в отношении которых существуют эффективные методы профилактики и лечения) группам риска.

К первой группе риска относятся возбудители токсикоинфекций и острых бактериальных отравлений (бактерии родов *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Escherichia*). Ко второй группе риска относятся возбудители кишечных инфекций (бактерии родов *Salmonella*, *Shigella*), туберкулеза (бактерии *Mycobacterium tuberculosis*), дифтерии (бактерии *Corynebacterium diphtheriae*), грибковых заболеваний (грибы родов *Actinomyces*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Acharion*).

Между группами СПМ нет четко очерченных границ, условно их делят на три группы:

- группа А: обитатели кишечника, показатели фекального загрязнения, свидетельствующие о возможном присутствии в этих объектах возбудителей кишечных инфекций и токсикоинфекций;
- группа В: обитатели верхних дыхательных путей и респираторного тракта, индикаторы орального загрязнения объекта;
- группа С: сапрофиты, автохтонные представители внешней среды, индикаторы процессов самоочищения почвы, воды водоемов, указывающие на загрязнение внешней среды легкоутилизируемыми органическими веществами.

### **1.2.1. Санитарно-показательные микроорганизмы группы А**

Наиболее подходящими индикаторами фекального загрязнения объекта являются бактерии семейства Enterobacteriaceae, родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*. Для удобства индикации используют укрупненное определение с установлением бактерий группы кишечной палочки (БГКП), общих колиформных бактерий (ОКБ), термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ), кишечной палочки *Escherichia coli*, бактерий рода *Enterococcus*, спор сульфитредуцирующих клостридий (бактерий рода *Clostridium*), бактериофагов кишечной палочки (коли-фагов), бактерий родов *Salmonella*, *Bacteroides*, *Acinetobacter*, дрожжеподобных грибов рода *Candida*, бактерий *Proteus mirabilis* и *Pseudomonas aeruginosa*.

К БГКП относят грамотрицательные палочки, не образующие спор, размножающиеся в присутствии желчных кислот, не имеющие оксидазы и ферментирующие глюкозу до кислоты и газа при температуре 37°C в течение 24–48 ч.

Различия между БГКП и колиформными бактериями незначительны, дополнительно устанавливают способность бактерий

ферментировать лактозу до кислоты и газа в течение 24 ч: для ОКБ – при температуре 37°C, для ТКБ – при температуре 44°C.

Наиболее полно отражает фекальное загрязнение, опасное в отношении распространения кишечных инфекций, сама кишечная палочка (*E. coli*), содержащаяся в фекалиях в концентрации  $10^6$ – $10^8$  в 1 г. Это грамотрицательная, не образующая спор палочка, ферментирующая лактозу при  $(44,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , не имеющая оксидазы, образующая индол, не утилизирует цитрат. ТКБ и *E. coli* являются показателем свежего фекального загрязнения объекта. В практической санитарной микробиологии полная идентификация *E. coli* отнимает много времени и средств, поэтому часто ограничиваются определением ОКБ и ТКБ.

Бактерии рода *Enterococcus* – аэробные и факультативно-анаэробные грамположительные каталазонегативные кокки, образующие короткие цепочки, способные расти при  $(44,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  на селективных средах, содержащих 0,04% азид натрия и 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ). Они постоянно находятся в кишечнике человека, выделяются в большом количестве ( $10^5$ – $10^7$  в 1 г фекалий) и отличаются высокой устойчивостью к хлору, желчи, повышенному осмотическому давлению в растворе, температуре до 60°C, широкому диапазону pH, поэтому являются показателем качества обеззараживания (дезинфекции, пастеризации) объекта. *E. faecalis* в основном обитает в кишечнике человека, не способен размножаться во внешней среде, не изменяет своих свойств и не имеет аналогов во внешней среде, в 4 раза устойчивее к хлору по сравнению с *E. coli*.

Бактериофаги кишечной палочки (колифаги) – бактериальные вирусы, способные лизировать *E. coli* при температуре 37°C и формировать зоны лизиса бактериального газона (бляшки) через 18 ч на ПА. Из-за сходства с кишечными вирусами человека рассматриваются как индикаторы фекального вирусного загрязнения воды, почвы, пищевых продуктов. Они более устойчивы к обеззараживанию (хлору), чем ОКБ, и поэтому отсутствие ОКБ еще не свидетельствует об отсутствии в воде кишечных вирусов. В фекалиях содержатся в небольших количествах, но быстро размножаются в сточных водах и являются показателем загрязнения фекально-хозяйственными стоками. Колифаги ценны как показатель фекального загрязнения, особенно энтеровирусами, поскольку выделяются из сточных

вод с той же частотой. По устойчивости к хлору фаги сравнимы с энтеровирусами.

Сульфитредуцирующие клостридии – спорообразующие грам-положительные палочки, редуцирующие сульфит натрия при температуре 44°C в течение 18 ч на железосульфитном агаре. Клостридии (*Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*) обычно присутствуют в фекалиях в меньших концентрациях, чем *E. coli*, – около  $10^3$  в 1 г, но образуют споры, поэтому способны значительно дольше сохраняться во внешней среде и более устойчивы к обеззараживанию. Являются показателем давнего фекального загрязнения объекта и недостаточной эффективности обеззараживания таких объектов, как вода, почва, пищевые продукты, лечебные грязи.

Этиологическая значимость бактерий рода *Citrobacter* доказана при эпидемических вспышках кишечных инфекций. Бактерии рода *Proteus* встречаются в 98% случаев в выделениях кишечника человека и животных, из них в 82% случаев – *P. mirabilis*.

Бактерии рода *Salmonella* – наиболее распространенные микроорганизмы, вызывающие острые кишечные заболевания и поступающие во внешнюю среду только с фекалиями человека и животных. Размножаются в почве при наличии в ней большого количества органических веществ, могут размножаться даже в относительно чистой воде, поэтому используются для оценки эпидемиологической ситуации.

Бактерии *P. aeruginosa* (синегнойная палочка) – грамотрицательные, подвижные облигатно-аэробные, оксидазаположительные, не образующие спор палочки, распространенные в водной среде, участвующие в образовании биопленок на поверхностях конструкций систем водоснабжения; обнаруживаются в фекалиях непостоянно (у здоровых людей в 11%, а у животных в 7%), способны размножаться во внешней среде. Методы индикации просты, но только в отношении пигментированных форм, тогда как во внешней среде преобладают беспигментные формы, которые распознать трудно. Характерные пигменты ярко окрашены: пиоцианин сине-зеленого цвета, пиовердин – желто-зеленый, флуоресцирующий в ультрафиолетовых лучах, пиорубин красного цвета. *P. aeruginosa* способны длительно выживать в водной среде и устойчивы ко многим обеззараживающим агентам (по сравнению с колиформными бактериями), не требовательны в отношении питательных веществ и температуры

размножения, размножаются и длительно выживают на внутренних поверхностях трубопроводов от 60 до 210 сут при температуре от 4 до 44°C, образуют эндотоксины и другие активно действующие вещества (эластазу, коллагеназу), ввиду чего вызывают ряд заболеваний кожных покровов, верхних дыхательных путей, глаз и других слизистых, а также кишечные инфекции. Используются для оценки состояния лечебного учреждения.

### 1.2.2. Санитарно-показательные микроорганизмы группы В

Индикаторами орально-капельного загрязнения объектов внешней среды являются комменсалы верхних дыхательных путей – бактерии родов *Staphylococcus* и *Streptococcus*, дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

*Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) – грамположительные кокки, образующие золотисто-желтые колонии на желточно-солевом агаре, обладающие лецитиназой и плазмокоагулазой. Носителями этих бактерий, по некоторым данным, являются около 30% здоровых людей, у медицинского персонала частота обнаружения выше. Стафилококк устойчив во внешней среде. Определение *S. aureus* рекомендуется при оценке воздуха лечебно-профилактических учреждений, аптек, жилых помещений, воды плавательных бассейнов, детских молочных смесей.

Бактерии рода *Streptococcus* делят на  $\alpha$ -гемолитические стрептококки («зеленящие») и  $\beta$ -гемолитические стрептококки («гемолитические»).  $\alpha$ -Гемолитические стрептококки – грамположительные, оксидазо- и каталазонегативные бактерии, успешно колонизирующие слизистые оболочки ротовой полости и носоглотки человека. Некоторые представители  $\alpha$ -стрептококков способны вызывать гнойные инфекции и являются причиной бактериального эндокардита при наличии у пациента кариеса зубов.

$\beta$ -Гемолитический стрептококк выделяется у 50–70% людей, в основном – у страдающих воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей. Он малоустойчив во внешней среде, поэтому может служить показателем эпидемического неблагополучия воздушной среды.  $\beta$ -стрептококки способны разрушать эритроциты крови.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* постоянно присутствуют в организме человека: в фекалиях в 10–90% случаев, в слизи верхних

дыхательных путей – в 15–50%, на коже – в 1–100%. Они обнаруживаются везде, где есть сахаросодержащие вещества, устойчивы к неблагоприятным воздействиям внешней среды более, чем патогенные бактерии.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* и споры мицелиальных грибов рекомендуется рассматривать как санитарно-показательные микроорганизмы, выделяющиеся из организма человека и животных с фекалиями, из дыхательных путей, с кожи. Они устойчивы во внешней среде и используются как показатели санитарного состояния воздуха аптек и лечебно-профилактических организаций.

### 1.2.3. Санитарно-показательные микроорганизмы группы С

В качестве индикаторов процессов самоочищения природных сред (почвы и воды водоемов) используются микроорганизмы – представители автохтонной микробиоты – аммонификаторы, нитрифицирующие бактерии, актиномицеты, целлюлозоразрушающие микроорганизмы, бактерии родов *Bdellovibrio* и *Aeromonas*. В качестве показателей загрязнения объектов внешней среды разлагающимися органическими субстратами используются термофильные микроорганизмы и бактерии рода *Proteus*.

Аммонификаторы – группа микроорганизмов, разлагающих белки и мочевины до аммиака и его солей. К ним относятся гнилостные аэробные и анаэробные микроорганизмы: бактерии родов *Bacillus*, *Serratia*, *Clostridium*, *Proteus*, *Sporosarcina*, грибы родов *Mucor* и *Aspergillus*. Являются показателями массивного органического загрязнения и процессов гниения.

Нитрифицирующие бактерии родов *Nitrosomonas* и *Nitrobacter* грамотрицательные, обладают способностью окислять аммиак до нитритов и нитратов. Являются показателями органических загрязнений и активных процессов самоочищения объектов.

Актиномицеты (бактерии порядка *Actinomycetales*) – группа грамположительных, ветвящихся микроорганизмов, активных участников превращений органических соединений, содержащих углерод.

Целлюлозоразрушающие микроорганизмы – почвенные бактерии и грибы, утилизирующие целлюлозу как источник углерода.

Бактерии рода *Aeromonas* в больших количествах содержатся в сточных водах и очень быстро размножаются. При большой концентрации их в воде может наступить пищевое отравление.

Бактерии рода *Bdellovibrio* – аэробные грамотрицательные мелкие палочки, подвижные, имеют жгутики, являются хищниками по отношению к грамотрицательным палочковидным бактериям (родов *Pseudomonas* и *Aeromonas*): на одном из полюсов у них есть полость, где скапливается экзотоксин и липолитический фермент, который и растворяет клеточную стенку бактерий. В местах сброса сточных вод количество бактерий рода *Bdellovibrio* достигает  $3 \cdot 10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup>, а дальше от сброса – 10 КОЕ/см<sup>3</sup>.

Термофильные микроорганизмы – разнообразная группа, включающая бактерии и актиномицеты, в основном – спорообразующие, способные размножаться при температуре 55–60°C. Используются как показатель загрязнения почвы, воды водоемов компостами и навозом.

Бактерии рода *Proteus* – грамотрицательные, палочковидные, аэробные и подвижные бактерии, способные мигрировать по поверхности при температуре от 20 до 37°C. В зависимости от среды, возраста колонии, присутствия различных химических соединений эти бактерии способны сильно менять свой внешний вид. Бактерии рода *Proteus* широко распространены во внешней среде. Они встречаются в почве, воде, воздухе, кишечнике человека и животных, поэтому их рассматривают как показатель загрязнения объекта органическими веществами, в том числе – фекального происхождения.

### **1.3. Питательные среды, используемые в санитарной микробиологии**

Допускаются к использованию коммерческие стандартизованные питательные среды, диагностические препараты и системы идентификации, предназначенные для целей описываемых методов. При использовании следует руководствоваться указаниями изготовителя на этикетке.

Сухие питательные среды хранят в сухих помещениях, в темноте, при комнатной температуре. Открытые упаковки тщательно закупоривают. Среда с измененным внешним видом (уплотненные, с комками), а также с истекшим сроком годности не используют.

Учитывая возможное изменение pH питательных сред после кипячения и стерилизации, окончательный контроль pH проводят

в готовой среде при температуре 25°C с использованием индикаторной бумаги.

### **1.3.1. Питательные среды для оценки общей обсемененности микроорганизмами**

Для определения ОМЧ (КМАФАнМ) используют базовые полноценные питательные среды – обогащенные и сложные по составу среды, поддерживающие рост микроорганизмов различных систематических групп. Наиболее часто применяют мясо-пептонный бульон (МПБ) и МПА.

В состав МПБ входят пептон ферментативный – 10,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, мясная вода – до 1 дм<sup>3</sup>; рН 7,3 ± 0,2.

В состав МПА входят все компоненты МПБ, дополнительно вносят агар-агар – 15,0–20,0 г.

В отечественной практике в качестве аналогов сред МПБ и МПА нашли применение сухой питательный бульон (ПБ) и питательный агар (ПА), получаемые с использованием гидролизата кильки, а также ГРМ-бульон и ГРМ-агар, получаемые с использованием гидролизата рыбной муки.

В состав питательного бульона входят панкреатический гидролизат кильки – 10 г, натрия хлорид – 4,5 г, вода – до 1 дм<sup>3</sup>. В некоторых вариантах среды вместо панкреатического гидролизата кильки в состав среды входят пептон ферментативный – 10 г, дрожжевой экстракт – 0,5 г, вода – до 1 дм<sup>3</sup>. Питательный агар готовится из питательного бульона с внесением агара микробиологического до конечной концентрации 1,0–2,0%. Для приготовления полужидкого питательного агара конечная концентрация агара микробиологического должна составлять 0,3–0,7%

В состав ГРМ-бульона входят панкреатический гидролизат рыбной муки – 8,0 г, пептон ферментативный – 8,0 г, натрия хлорид – 4,0 г, вода – до 1 дм<sup>3</sup>. ГРМ-агар является питательной средой № 1 для контроля микробной загрязненности, готовится из ГРМ-бульона с внесением агара микробиологического до конечной концентрации 1,0–2,0%.

Альтернативно допускается использование и других питательных сред: пептонно-дрожжевой, казеин-пептоновой с дрожжевым экстрактом и глюкозой, триптиказо-соевой, триптон-дрожжевой с глюкозой.

Для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных бактерий и некоторых грибов (установления КМАФАнМ) в мировой практике широко используется триптиказо-соевый бульон, имеющий следующий состав, г/дм<sup>3</sup>: панкреатический перевар казеина – 17, папаиновый гидролизат соевой муки – 3,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, дикалия гидрофосфат – 2,5 г, глюкоза – 2,5 г, вода – до 1 дм<sup>3</sup>, рН  $7,3 \pm 0,2$ .

Для контроля микробной загрязненности по грибной микрофлоре в санитарной микробиологии рекомендовано использование бульона и агара Сабуро (она же – питательная среда № 2).

В состав бульона Сабуро входят ферментативный гидролизат казеина – 5,0 г, мясной пептон – 5,0 г, декстроза (альтернативно – глюкоза) – 40,0 г, вода – до 1 дм<sup>3</sup>, рН  $5,6 \pm 0,2$ . Агар Сабуро готовится из бульона Сабуро с внесением агара микробиологического до конечной концентрации 1,0–2,0%. Если ожидается, что образец значительно обсеменен бактериальной микрофлорой, то в состав среды может быть внесен левомицетин.

Альтернативно в санитарной микробиологии допускается использование среды Чапека, солодовой среды и сусло-бульона, картофельной среды с глюкозой.

Вышеперечисленные среды стерилизуют автоклавированием при 121°C в течение 15 мин.

### **1.3.2. Питательные среды для обнаружения и идентификации энтеробактерий**

Бактерии семейства Enterobacteriaceae относительно нетребовательны и способны давать рост на различных базовых питательных средах, используемых в микробиологических исследованиях, а области человеческого тела, где многие представители этого семейства являются объектом естественного обитания или паразитирования, обильно населены резидентной сапрофитной микрофлорой. Поэтому питательные среды, используемые при работе с энтеробактериями, в первую очередь решают задачу их селективного выделения и бактериологической диагностики. Как обязательные при диагностике энтеробактерий предложено использовать среды обогащения (селенитовый бульон, жидкие среды Мюллера, Раппопорт, МакКонки), среды для селективного выделения (агаризованные среды Плоскирева, МакКонки, SS-агар, висмут-сульфитный агар) и дифференциации

(агаризованные среды Эндо, Левина, Вильсона – Блера, Симмонса, Кристенсена). Агаризованная среда МакКонки и висмут-сульфитный агар обладают селективными и дифференцирующими свойствами.

**Питательная среда Кесслера** предназначена для обнаружения бактерий группы кишечной палочки при санитарном обследовании объектов внешней среды, состоит из пептона сухого ферментативного – 3 г/дм<sup>3</sup>, панкреатического гидролизата рыбной муки – 7 г/дм<sup>3</sup>, D-лактозы – 10 г/дм<sup>3</sup>, желчи очищенной сухой – 3 г/дм<sup>3</sup>, кристаллического фиолетового (готовая среда имеет фиолетовый цвет) – 0,04 г/дм<sup>3</sup>, натрия углекислого – 0,01 г/дм<sup>3</sup>, рН 7,3–7,7.

Среда Гисса позволяет идентифицировать микроорганизмы, ферментирующие углеводы, по кислотообразованию (изменение цвета среды с розового на синий) и газообразованию (появление пузырьков газа в глубине среды или на ее поверхности). В состав **среды Гисса с маннитом** входят: маннит – 3,8 г/дм<sup>3</sup>; пептон ферментативный – 3,7 г/дм<sup>3</sup>; натрия хлорид – 3 г/дм<sup>3</sup>; натрия гидрофосфат – 0,5 г/дм<sup>3</sup>; бромкрезоловый пурпурный – 0,02 г/дм<sup>3</sup>, агар микробиологический – 2,5 г/дм<sup>3</sup>, рН 7,4. Вместо пептона может вноситься панкреатический гидролизат рыбной муки, альтернативой бромкрезоловому пурпурному является бромтимоловый синий.

**Основа агара с цетримидом без глицерина** состоит из панкреатического перевара желатина – 20 г/дм<sup>3</sup>, магния хлорида – 1,4 г/дм<sup>3</sup>, калия сульфата – 10 г/дм<sup>3</sup>, цетримиды – 0,3 г/дм<sup>3</sup>, агара микробиологического – 15 г/дм<sup>3</sup>, рН 7,2 ± 0,2. Эту питательную среду используют для выделения *P. aeruginosa* и установления у них способности к выработке пигментов флюоресцеина и пиоцианина. Цетримид (этилтриметиламмоний-бромид) подавляет рост на среде сопутствующих бактерий, действуя как четвертичное аммонийное соединение: высвобождает азот и фосфор из бактериальных клеток (кроме клеток синегнойной палочки).

Для приготовления **агаризованной среды Эндо** 100 см<sup>3</sup> стерильного МПА (рН 7,4) расплавляют на водяной бане и охлаждают до 70°C, прибавляют 1 г лактозы, предварительно растворенной в стерильной пробирке в небольшом количестве дистиллированной прокипяченной воды. В отдельных пробирках готовят 2–3 см<sup>3</sup> спиртового насыщенного раствора фуксина и 10 см<sup>3</sup> 10%-ного водного раствора Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. В стерильную пробирку вносят 1 см<sup>3</sup> фуксина и прибавляют раствор сульфита натрия до обесцвечивания фуксина

(бледно-розовый цвет). Приготовленную смесь вливают в расплавленный МПА с лактозой, хорошо перемешивают и разливают по стерильным чашкам. Правильно приготовленная среда в горячем виде имеет бледно-розовый цвет, а при застывании становится бесцветной. Среду используют немедленно, без стерилизации.

Агар Эндо-ГРМ выпускается в сухом виде. Эту среду готовят по прописи на этикетке.

Для повышения дифференцирующих свойств среды в готовую и охлажденную до 60–70°C среду перед разливкой в чашки допускается прибавлять на 100 см<sup>3</sup> среды 0,2 см<sup>3</sup> 5%-ного спиртового раствора основного фуксина. В случае роста микробиоты, не относящейся к бактериям группы кишечной палочки, помимо фуксина допускается добавление на 100 см<sup>3</sup> среды Эндо 0,2 см<sup>3</sup> 5%-го спиртового раствора розоловой кислоты. Модификацию среды Эндо с добавлением розоловой кислоты используют только при работе методом мембранной фильтрации. Срок хранения растворов фуксина и розоловой кислоты – не более 1 месяца.

**Состав лактозо-пептонной среды:** 10 г пептона, 5 г натрия хлорида, 5 г лактозы растворяют при нагревании в 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды. После растворения ингредиентов устанавливают рН 7,4–7,6, разливают по 10 см<sup>3</sup> в пробирки, стерилизуют при 112°C 12 мин.

Для приготовления **концентрированной (×10) лактозо-пептонной среды** массу всех ингредиентов, кроме воды, увеличивают в 10 раз, разливают по 1 см<sup>3</sup> в пробирки и по 10 см<sup>3</sup> во флаконы.

Лактозо-пептонная среда может быть разлита в пробирки с поплавком для индикации образования газа.

Для приготовления **полужидкой лактозо-пептонной среды** в 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 5 г натрия хлорида, 5 г агар-агара, доводят до кипения, устанавливают рН 7,2–7,4, добавляют 1 см<sup>3</sup> 1,6%-ного спиртового раствора бромтимолового синего. Стерилизуют при 120°C 20 мин. В расплавленную среду вносят 5 г лактозы, нагревают до кипения, разливают в стерильные пробирки на высоту 3–5 см и стерилизуют при 112°C 12 мин. Срок хранения – не более 2 недель при комнатной температуре.

Правильно приготовленная лактозо-пептонная среда имеет зеленый цвет с синеватым оттенком (цвет бутылочного стекла), при подкислении цвет среды становится желтым.

### 1.3.3. Питательные среды для обнаружения и идентификации облигатно-анаэробных бактерий

Одной из первых сред, предложенных для культивирования облигатно-анаэробных бактерий (в том числе – патогенных клостридий), является среда Китта – Тароцци. Она готовится из печеночного бульона, сваренного на основе мясо-пептонного бульона или бульона Хотингера. На 1 дм<sup>3</sup> мясо-пептонного бульона на основе говяжьего мяса берут 350 г говяжьей печени (альтернативно – мяса), нарезанной мелкими кусочками, 30 мин кипятят, контролируют рН  $7,2 \pm 0,2$ . Затем среду фильтруют, печень (мясо) промывают водопроводной водой, подсушивают фильтровальной бумагой. По 3–4 кусочка (2,0–2,5 г) мяса (печени) помещают в пробирку, наливают 7–10 см<sup>3</sup> бульона, покрывают слоем вазелинового масла и стерилизуют при 120°C 20 мин. Перед использованием среду регенерируют (кипятят с последующим охлаждением).

Для обнаружения и идентификации анаэробных бактерий также используют кровяной агар с глюкозой, агар Шедлера, агар Виньяля – Вейона, бензидино-кровяной агар Гордона и Мак Леод, желточно-кровяной агар Шапина – Вегина, перфрингенс-агар, триптозо-сульфитный циклосериновый агар, железосульфитное молоко, тиогликолевый бульон. В состав сред вводят резазурин (показатель редокс-потенциала; прокипяченная (восстановленная) среда не должна иметь розовую окраску), желатин (для определения протеолитической активности), желчь или соли желчных кислот (проверка роста в присутствии желчи), яичный желток (для определения лецитиназной (лецитовителлазной) и липазной активности), эскулин (при гидролизе меняет окраску среды вокруг колоний от красно-коричневой до темно-коричневой), сульфит-анионы (при восстановлении до сульфида колонии окрашиваются в черный цвет), фенолэтиловый спирт (вносят в качестве селекционирующего агента: подавляет рост факультативно анаэробных микроорганизмов, включая энтеробактерии).

Для культивирования сульфитредуцирующих клостридий используют **железосульфитный агар Вильсона – Блера**. В 1 дм<sup>3</sup> стерильного расплавленного питательного агара добавляют 10 г глюкозы, нагревают до растворения, разливают во флаконы, контролируют рН 7,4, автоклавируют при 112°C 12 мин. 20%-ный раствор сульфита натрия или серноватистокислого натрия и 8%-ный раствор

железа сернокислого (II) или железа хлористого (II) готовят непосредственно перед употреблением в стерильной посуде на стерильной дистиллированной воде. Раствор сульфита натрия нагревают до полного растворения соли. Перед выполнением анализа в 100 см<sup>3</sup> расплавленной основной среды вносят 5 см<sup>3</sup> 20%-ного раствора сульфита натрия, перемешивают, затем вносят 1 см<sup>3</sup> 8%-ного раствора сернокислого железа, перемешивают и, не стерилизуя, с соблюдением правил асептики разливают в пробирки высоким столбиком (12–15) см для работы методом мембранной фильтрации или во флаконы для работы методом прямого посева.

При восстановлении сульфид-ионов в присутствии катионов железа образуется черный осадок железа сульфида. *S. perfringens*, обладающий большой скоростью роста, изменяет цвет среды через 1–2 ч культивирования. Другие анаэробы формируют зеленовато-черные колонии через 6–7 ч.

#### **1.3.4. Питательные среды для обнаружения и идентификации стафилококков**

Для культивирования бактерий рода *Staphylococcus* эффективно могут быть использованы среды общего назначения – МПА, МПБ, триптиказо-соевый агар и бульон. Тем не менее есть несколько десятков целевых питательных сред для стафилококков, решающих задачу селективного выделения этих микроорганизмов и установления их дифференциально-диагностических признаков: желточно-солевой агар Чистовича, маннит-солевой агар, агар Шефера – Крамера, теллурит-полимиксии-желточный агар Крисли, агар Бэрда – Паркера, лактозо-солевой бульон с фенолротом, среды Джолиотта и Кантони, Чаплина – Бернса, Чемпена.

**Желточно-солевой агар (ЖСА)** выполняет и элективные, и диагностические функции, в его состав входят желточная эмульсия, МПА и натрия хлорид. Для приготовления желточной эмульсии свежее куриное яйцо дезинфицируют, затем, соблюдая требования асептики, отделяют желток и эмульгируют его в 200 см<sup>3</sup> физиологического раствора (0,85%-ный раствор NaCl, pH 6,9–7,0).

Непосредственно перед использованием к 100 см<sup>3</sup> расплавленного и охлажденного до 60–70°C стерильного МПА (pH 7,2 ± 0,2), содержащего 10,0 г NaCl, добавляют 10–20 см<sup>3</sup> желточной взвеси, перемешивают и разливают по стерильным чашкам Петри.

На этой среде стафилококки дают рост через 48 ч инкубации, в то время как подавляющее большинство других микроорганизмов, которые присутствуют в биосубстратах, на среде с таким содержанием натрия хлорида колоний не образуют. Радужный венчик или зона мутности вокруг колоний (положительная лецитиназная реакция) свидетельствуют о принадлежности культуры к *S. aureus* и о вероятной патогенности данной культуры.

**Маннит-солевой агар** (солевой агар с маннитом) включает: D-маннит – 10,0 г, панкреатический перевар казеина – 5,0 г, пептон – 5,0 г, мясной экстракт – 1,0 г, натрия хлорид – 75,0 г, феноловый красный – 0,025 г, агар-агар – 16,0 г, вода – до 1 дм<sup>3</sup>, pH 7,2 ± 0,2.

Утилизация маннита приводит к окраске среды в желтый цвет. Селекцию обеспечивает высокое содержание (7,5%) хлорида натрия.

### **1.3.5. Реактивы для идентификации санитарно-показательных микроорганизмов**

**Реактивы для теста на оксидазу.** Для выполнения теста по варианту 1 готовят 1%-ный водный раствор тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорида, используют в день приготовления.

Для выполнения теста по варианту 2 готовят 1%-ный спиртовой раствор α-нафтола и 1%-ный водный раствор фенилендиаминнового соединения. Растворы сохраняют в темных флаконах с притертыми пробками: первый – до одного месяца, второй – до одной недели. Перед употреблением к трем частям первого раствора добавляют семь частей второго раствора. В присутствии оксидаз бактерий происходит перенос электронов к фенилендиаминовому соединению (например, N, N – диметил-п-фенилендиамину) и из него образуется индофенол – вещество синего цвета.

Для постановки теста на оксидазу могут быть применены коммерческие тест-системы (СИБ-оксидаза, тест-полоски или аналоги), для стабилизации реактивов используется спирт поливиниловый.

Перед работой с каждой серией проб реактивы или тест-системы на оксидазу следует испытывать с тест-культурами микроорганизмов, дающих положительную (бактерии рода *Pseudomonas*) и отрицательную оксидазную реакцию (бактерии рода *Escherihia*). Стареющая культура может дать ложноотрицательный результат.

**Реактивы для окраски препаратов по Граму.** Карболовый раствор генциана фиолетового: 1 г генциана фиолетового, 10 см<sup>3</sup>

ректификованного этилового спирта, 5 г фенола растирают в ступке, добавляя 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

Раствор Люголя: 1 г йода, 2 г йодистого калия растворяют в 300 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Хранить во флаконе из темного стекла.

Фуксин Циля: 1 г основного фуксина, 10 см<sup>3</sup> спирта этилового ректификованного, 54 г фенола растирают в ступке, добавляя 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

Окраска по Граму может быть заменена **тестом Грегерсена**, не требующим использования оптики: в капле 3%-ного водного раствора КОН на предметном стекле эмульгируют фрагмент колонии, взятой с плотной среды. После нескольких секунд перемешивания петлей взвесь ослизняется и за петлей тянутся слизистые нити, что указывает на принадлежность испытуемой культуры или колонии к грамотрицательному виду. У грамположительных бактерий слизистые нити не образуются – реакция отрицательная.

**Реактивы для теста на коагулазу.** Раствор плазмы крови кролика готовят из лиофильно высушенной плазмы крови кролика, асептически упакованной в одном флаконе (в составе коммерческого теста), в которую с соблюдением правил асептики вносят 4 см<sup>3</sup> физиологического раствора.

Сердечно-мозговой бульон может быть приготовлен на основе перевара мозга и сердца крупного рогатого скота, допускается использование коммерческой среды следующего состава: экстракт головного мозга – 7,8 г/дм<sup>3</sup>, экстракт сердца – 9,7 г/дм<sup>3</sup>, протеозопептон – 10,0 г/дм<sup>3</sup>, декстроза – 2,0 г/дм<sup>3</sup>, динатрийфосфат – 2,5 г/дм<sup>3</sup>, хлорид натрия – 5,0 г/дм<sup>3</sup>, агар – 15 г/дм<sup>3</sup>.

Для приготовления перевара сердце и мозги крупного рогатого скота очистить от пленок, сосудов, оболочек, жира, измельчить при помощи мясорубки, залить водопроводной водой в соотношении 1 : 1 (1 кг ткани на 1 дм<sup>3</sup> воды), оставить на ночь в холодильнике при 4°C. Сердце и мозги обрабатывают и готовят экстракты отдельно.

Настои сердца и мозгов при помешивании довести до кипения и кипятить 5–10 мин. Горячие экстракты профильтровать вначале через 3 слоя марли и затем через ватно-марлевый фильтр. Разлить по флаконам и автоклавировать 15 мин при 115°C.

Допускается использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного изготовления, зарегистрированных в Республике Беларусь в установленном порядке.

## **1.4. Лабораторная работа**

### **Санитарно-микробиологический контроль питьевой воды**

Нормирование качества воды проводят по органолептическим (температура, запах, привкус, цветность, мутность), химическим (показатели химического состава) и санитарно-микробиологическим показателям. Питьевая вода должна быть безопасна в эпидемическом и радиационном отношении, безвредна по химическому составу и иметь благоприятные органолептические свойства. Регулярному санитарно-микробиологическому контролю подвергают воду питьевую централизованного водоснабжения, местного водоснабжения с забором ее из открытых водоемов (реки, водохранилища) или из подземных источников (скважины, родники, колодцы).

Микробиологические показатели безопасности воды централизованных систем питьевого водоснабжения в Республике Беларусь регламентируются гигиеническим нормативом «Показатели безопасности питьевой воды» (табл. 1).

Превышение норматива по ОМЧ и ОКБ не допускается в 95% проб, отбираемых в точках водозабора наружной и внутренней водопроводной сети в течение 12 месяцев, при количестве исследуемых проб не менее 100 за год. Превышение допускается в единичных, но не в двух последовательно отобранных в одной и той же точке пробах. Уровень загрязнения при этом по показателю ОКБ – не более 2 КОЕ (колоний образующих единиц) бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в 100 см<sup>3</sup>.

При определении ОКБ и ТКБ проводится трехкратное исследование в 100 см<sup>3</sup> отобранной пробы воды.

Определение ооцист криптоспоридий и цист лямблий проводится в системах питьевого водоснабжения с водозабором из поверхностных водных объектов или из подземных водных объектов с влиянием поверхностных вод.

Определение спор сульфитредуцирующих клостридий проводится при оценке эффективности технологии обработки воды в централизованных системах питьевого водоснабжения с водозабором из поверхностных водных объектов или из подземных водных объектов с влиянием поверхностных вод.

Таблица 1

**Нормативы по микробиологическим и паразитологическим показателям для воды питьевой водопроводной**

| Наименование показателя                                                                                                                                                                                                    | Единица измерения                                           | Норматив     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------|
| Общее микробное число (ОМЧ)                                                                                                                                                                                                | Число образующих колонии бактерий (КОЕ) в 1 см <sup>3</sup> | Не более 50  |
| Общие колиформные бактерии (ОКБ)                                                                                                                                                                                           | Число бактерий в 100 см <sup>3</sup>                        | Отсутствие   |
| Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ)                                                                                                                                                                                | Число бактерий в 100 см <sup>3</sup>                        | Отсутствие   |
| Колифаги                                                                                                                                                                                                                   | Число бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 100 см <sup>3</sup>   | Отсутствие   |
| Ооцисты криптоспоридий                                                                                                                                                                                                     | Число цист в 50 дм <sup>3</sup>                             | Отсутствие   |
| Цисты лямблий                                                                                                                                                                                                              | Число цист в 50 дм <sup>3</sup>                             | Отсутствие   |
| Споры сульфитредуцирующих клостридий                                                                                                                                                                                       | Число спор в 20 см <sup>3</sup>                             | Отсутствие   |
| Энтеровирусы                                                                                                                                                                                                               | Число геномных эквивалентов в 1000 дм <sup>3</sup>          | Отсутствие   |
| <i>Legionella pneumophila</i> : в образцах воды из систем горячего и холодного водоснабжения в бассейнах, аквапарках, джакузи общественного пользования, SPA-салонах, организациях, оказывающих банные услуги, гостиницах; | Число образующих колонии бактерий в 1 дм <sup>3</sup>       | Не более 100 |
| в образцах воды из систем горячего и холодного водоснабжения в отделениях реанимации и интенсивной терапии больничных организаций здравоохранения                                                                          |                                                             | Не более 50  |

По эпидемическим показаниям определяют патогенные микроорганизмы. Контролируемым показателем при исследовании в пробах воды энтеровирусов является их РНК. Исследования на наличие *Legionella pneumophila* в образцах воды из систем горячего и холодного водоснабжения осуществляются не реже одного раза в год.

Качество питьевой воды должно соответствовать гигиеническим нормативам перед ее поступлением в распределительную сеть, а также в точках водоразбора наружной и внутренней водопроводной сети.

Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды проводится согласно ГОСТ 34786–2021 Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и энтерококков. Кроме изложенных в работе классических микробиологических методов стандартом допускается использование ускоренных методов с использованием тест-систем для сокращения времени анализа без снижения точности выполнения испытаний и достоверности полученных результатов.

**Цель работы:** установление соответствия образца воды требованиям, предъявляемым к питьевой воде, по санитарно-микробиологическим показателям.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред и реактивов (подразд. 1.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды, питательных сред и растворов, мембранных и бумажных фильтров. 3. Отбор проб водопроводной воды в соответствии с инструкцией. 4. Определение ОМЧ пробы воды методом глубинного посева. 5. Определение ОКБ и ТКБ в пробе воды титрационным методом и методом мембранной фильтрации. 6. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий в пробе воды. 7. Анализ результатов определения критериев санитарной микробиологии.

#### **1.4.1. Правила отбора пробы воды**

Для микробиологического анализа пробы воды отбирают по ГОСТ 31862–2012 Вода питьевая. Отбор проб. Методы отбора, подготовки к определению состава и свойств, транспортирования и хранения проб воды должны обеспечивать неизменность состава проб в интервале времени между отбором проб и их анализом. При отборе проб в одной и той же точке для различных целей первыми отбирают пробы для бактериологического анализа.

Для микробиологического анализа пробу воды отбирают непосредственно из пробоотборного крана. Вода должна свободно вытекать из пробоотборного крана и заполнять емкость для отбора проб струей. Для предотвращения вторичного загрязнения пробы воды металлические пробоотборные краны предварительно стерилизуют путем обжига горящим тампоном, смоченным 96%-ным раствором этилового спирта, а пластмассовые краны дезинфицируют путем обработки 70%-ным раствором этилового спирта. Перед отбором

проб воду из простерилизованного крана сливают не менее 10 мин при полностью открытом кране. При отборе пробы напор воды может быть уменьшен. Для отбора проб используют стерильные стеклянные емкости вместимостью не менее 500 см<sup>3</sup> с плотно закрывающимися пробками на шлифе или с завинчивающимися крышками (стеклянными, силиконовыми или из других материалов, не оказывающих влияние на жизнедеятельность микроорганизмов) и выдерживающих стерилизацию. Емкость открывают непосредственно перед отбором пробы, во время отбора пробы следует избегать загрязнения горловины емкости и пробки. Если отбирают воду после обеззараживания ее химическими веществами, то для нейтрализации остаточного количества дезинфектанта в емкость, предназначенную для отбора проб, вносят до стерилизации тиосульфат натрия в виде кристаллов из расчета 10 мг на 500 см<sup>3</sup> воды или раствора массовой концентрации 18 мг/дм<sup>3</sup>. После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой и колпачком. Маркируют, сопровождают актом отбора проб воды с указанием места, даты, времени забора и фамилии, имени, отчества специалиста. Анализ проб в лаборатории необходимо провести как можно быстрее от момента отбора. Транспортируют пробы в контейнерах-холодильниках при температуре 4–10°C. При соблюдении указанных условий продолжительность от момента отбора проб до начала испытаний не должна превышать 6 ч. Если пробы нельзя охладить, их анализ следует провести в течение 2 ч после отбора.

При определении качества воды из крана потребителя при вспышках инфекционных заболеваний для выявления источника микробного загрязнения воды отбор проб проводят с учетом загрязнения внешней поверхности крана, а также всех приспособлений и устройств, используемых потребителем. Все приспособления и устройства следует оставить на месте. Не допускается подвергать дезинфекции кран, а также приспособления и устройства перед отбором проб и проводить предварительный слив воды из крана перед отбором проб.

#### **1.4.2. Определение общего микробного числа пробы воды**

Метод определяет в питьевой воде общее число мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (ОМЧ), способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37°C в течение 24 ч (при определении показателя «ОМЧ

при 37°C») или температуре 22°C (при определении показателя «ОМЧ при 22°C») в течение 72 ч для учета сапрофитных водных микроорганизмов, видимых с увеличением в 2 раза.

Альтернативно возможно проведение испытаний с использованием мембранных фильтров, петрифильмов (тест-систем с готовыми питательными средами на подложке), автоматизированного метода посева проб воды с аппарата для автоматизированного спирального посева, автоматизированного метода подсчета колоний на плотной питательной среде.

Удобство использования метода мембранной фильтрации в этом случае заключается в том, что после инкубации посевов мембранные фильтры переносят на фильтровальную бумагу, смоченную оксидазным реактивом. Колонии бактерий, обладающих оксидазной активностью, окрашиваются в яркий сине-фиолетовый цвет, и даже самые мелкие колонии хорошо видны на фоне светлого фильтра. Эта группа представлена бактериями рода *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio* – активными участниками самоочищения воды водоемов. Оксидазоотрицательные бактерии также хорошо различимы на фоне слегка посиневшего фильтра. Метод позволяет всего за 1–5 мин дать качественную и количественную характеристику различных групп сапрофитных бактерий.

Для реализации метода с использованием петрифильмов используются тест-системы с готовыми сухими питательными средами на подложке Petrifilm или с аналогичными характеристиками (далее тест-системы), содержащие готовую питательную среду и гель, растворимый в холодной воде, который застывает при комнатной температуре. На поверхность наносят сетку, которая облегчает подсчет колоний. До момента посева пробы тест-система неактивна и может храниться длительное время. Для сохранения стерильности компоненты питательной среды покрывают сверху непроницаемой пленкой.

**Оборудование:** водяной термостат для температурного режима 45°C, суховоздушный термостат для температурного режима 37°C.

**Питательная среда:** ПА или ГРМ-агар (п. 1.3.1).

**Выполнение анализа.** Плавят питательный агар в микроволновой печи на малой мощности, затем перемещают его в ультратермостат с установленной температурой 45°C на 20–30 мин.

Перед посевом пробу тщательно перемешивают и фламбируют горящим тампоном край емкости. Перед каждым отбором

новой порции воды для анализа пробу перемешивают стерильной пипеткой.

Из каждой пробы делают посев не менее двух объемов по 1 см<sup>3</sup>. После тщательного перемешивания пробы воды вносят по 1 см<sup>3</sup> в стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки. После внесения воды в каждую чашку вливают 8–12 см<sup>3</sup> расплавленного и остуженного до 45°C питательного агара после фламбирования края посуды, в которой он содержится. Затем быстро смешивают содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки. Эту процедуру производят на горизонтальной поверхности, где чашки оставляют до застывания агара.

После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре 37°C в течение 24 ч.

**Учет результатов.** Подсчитывают все выросшие на чашке колонии, наблюдаемые при увеличении в 2 раза. Учитывают только те чашки, на которых выросло не более 300 изолированных колоний.

Количество колоний на обеих чашках суммируют и делят на два. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 см<sup>3</sup> исследуемой пробы воды.

Если на одной из двух чашек подсчет невозможен, результат выдают на основании учета колоний на одной чашке. Если на двух чашках имеет место рост расплывчатых колоний, не распространяющийся на всю поверхность чашки, или выросло более 300 колоний и анализ нельзя повторить, подсчитывают сектор чашки с последующим пересчетом на всю поверхность. В этих случаях в протоколе отмечают «число КОЕ/см<sup>3</sup> – ориентировочно». Если подсчет колоний на чашках невозможен, то в протоколе отмечают «сплошной рост».

#### **1.4.3. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий в пробе воды**

ОКБ – грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу (глюкозу) до кислоты и газа при температуре 37°C в течение 24–48 ч.

ТКБ входят в число ОКБ, обладают всеми их признаками и, кроме того, способны ферментировать лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре 44°C в течение 24 ч.

Анализ можно выполнять с использованием метода мембранной фильтрации (основной) и титрационного метода. Альтернативно изложенному ниже ходу испытания возможно использование хромогенных питательных сред, тест-систем с готовыми питательными средами на подложке.

**Оборудование:** водяной термостат для температурного режима 44°C, суховоздушный термостат для температурных режимов 37°C и 44°C, прибор для мембранной фильтрации под вакуумом с устройством для создания разрежения (0,5–1,0) атм.

**Питательные среды:** агар Эндо, лактозо-пептонные среды (п. 1.3.2).

**Реактивы:** красители для окрашивания по Граму и реактивы для теста на оксидазу (по п. 1.3.5).

**1.4.3.1. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий в пробе воды методом мембранной фильтрации.** Метод основан на фильтрации установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов на дифференциальной питательной среде с лактозой и последующей идентификацией колоний по культуральным и биохимическим свойствам.

**Выполнение анализа.** При исследовании питьевой воды анализируют 3 объема по 100 см<sup>3</sup>. При получении стабильных отрицательных результатов допустима фильтрация 300 см<sup>3</sup> воды через один фильтр. При фильтрации воды неизвестного качества целесообразно увеличение количества фильтруемых объемов для получения изолированных колоний на фильтре (например, 10, 40, 100, 150 см<sup>3</sup> воды).

Отмеренный объем воды фильтруют через мембранные фильтры с соблюдением требований, изложенных ниже.

**Подготовка фильтровального аппарата.** На руки надевают резиновые перчатки, протирают руки в перчатках этанолом. Воронку установки для фильтрования обтирают марлевым (ватным) тампоном, смоченным этанолом, и фламбируют. Пинцет обтирают марлевым (ватным) тампоном, смоченным этанолом, фламбируют и используют для укладывания стерильного мембранного фильтра в обработанную воронку.

**Фильтрование воды.** В воронку установки для фильтрования наливают часть отмеренного объема воды для смачивания фильтра, затем создают вакуум и в несколько приемов дозируют отмеренный объем воды.

При фильтровании 1 см<sup>3</sup> исследуемой воды нужно в воронку налить предварительно не менее 10 см<sup>3</sup> стерильной воды, а затем внести анализируемую воду.

После окончания фильтрования и осушения фильтра отключают вакуум, воронку снимают, фильтр осторожно поднимают за край фламбированным пинцетом и переносят его, не переворачивая, на питательную среду Эндо, приготовленную по п. 1.3.2 и разлитую в чашки Петри, избегая пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх.

Чашки с фильтрами ставят в термостат дном вверх и инкубируют посевы при температуре 37°C в течение 24 ч.

**Учет результатов посева (промежуточный).** Если на фильтрах нет роста или выросли колонии пленчатые, губчатые, плесневые, прозрачные, расплывчатые, то выдают отрицательный ответ: отсутствие ОКБ и ТКБ в 100 см<sup>3</sup> исследуемой воды. Анализ заканчивают через 24 ч. Если на фильтрах обнаружен рост изолированных типичных лактозоположительных колоний: темно-красных, красных с металлическим блеском или без него либо других подобного типа колоний с отпечатком на обратной стороне фильтра, то подсчитывают число колоний каждого типа отдельно и приступают к подтверждению их принадлежности к ОКБ и ТКБ.

Для **подтверждения наличия ОКБ** исследуют все колонии, если на фильтрах выросло менее 5 колоний, и не менее 3 колоний каждого типа, если число колоний больше 5.

Для **подтверждения наличия ТКБ** исследуют все типичные колонии, но не более 10.

Каждую выбранную изолированную колонию исследуют:

- на наличие оксидазной активности;
- принадлежность к грамотрицательной группе бактерий (микроскопия окрашенного по Граму препарата или постановка теста Греггера);
- ферментацию лактозы до кислоты и газа.

**Постановка оксидазного теста.** Полоску фильтровальной бумаги помещают в чистую чашку Петри и смачивают 2–3 каплями реактива для оксидазного теста по п. 1.3.5. Готовые бумажные системы смачивают дистиллированной водой. Часть изолированной колонии стеклянной палочкой или платиновой петлей (металлическая

петля из нихрома может дать ложноположительную реакцию) наносят штрихом на подготовленную фильтровальную бумагу. Реакция считается положительной, если в течение 1 мин появляется фиолетово-коричневое (при приготовлении реактивов по варианту 1) или синее (при приготовлении реактивов по варианту 2 либо при использовании тест-дисков или тест-полосок СИБ-оксидаза) окрашивание штриха. При отрицательной реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется. При положительном результате эту колонию из дальнейшего исследования исключают.

Если при исследовании колоний, окрашенных в темно-красный цвет, получают недостаточно четкий результат, необходимо пересеять культуру со среды Эндо на питательный агар. После инкубации тест повторяют.

Если на части или на всей поверхности фильтра наблюдается наложение колоний или сплошной рост, выполняют оксидазный тест путем помещения мембранного фильтра на кружок фильтровальной бумаги большего диаметра, чем фильтр, обильно смоченный реактивом, или на диск «СИБ-оксидаза», смоченный дистиллированной водой. При появлении первых признаков реакции, но не более чем через 5 мин, мембранный фильтр переносят обратно на среду Эндо. После четкого проявления реакции определяют результат. При появлении фиолетово-коричневого или синего окрашивания (в зависимости от примененного реактива) оксидазный тест считают положительным.

Если на фильтрах все колонии оксидазоположительные, они не учитываются и выдают ответ об отсутствии ОКБ и ТКБ и завершают анализ. При отрицательной оксидазной реакции проводят рассев до получения изолированных колоний и подтверждают их принадлежность к ОКБ и ТКБ.

**Определение принадлежности к грамотрицательной группе бактерий.** Из оксидазоотрицательной колонии делается фиксированный мазок, окрашивается по Граму и микроскопируется. Приготовление реактивов для окраски по Граму изложено в п. 1.3.5.

На обезжиренное мылом или спиртом предметное стекло наносят петлей 1 каплю дистиллированной воды, вносят небольшое количество культуры из анализируемой колонии и распределяют по центру поверхности предметного стекла. Слева и справа с соблюдением той же процедуры наносят суспензии клеток заведомо

грамположительной (*P. aeruginosa*) и грамотрицательной (*E. coli*) бактериальных культур соответственно. Мазки высушивают при комнатной температуре и фиксируют трехкратным проведением через пламя горелки. На препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор генциана фиолетового на 0,5–1,0 мин, снимают бумагу, наливают раствор Люголя на 0,5–1,0 мин, сливают раствор Люголя и стекло промывают в этиловом спирте в течение 0,5–1,0 мин, пока не перестанет отходить краситель. Затем стекло тщательно промывают водой и докрашивают в течение 1–2 мин фуксином Циля, разведенным 1 : 10 дистиллированной водой. После промывания и просушивания препарата мазок микроскопируют.

При анализе результата окраски вначале просматривают мазки контрольных культур: грамположительные бактерии должны окраситься в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в розовый. Только в случае, если контрольные клетки приобрели соответствующую окраску, изучают результаты опытного теста.

Окраска по Граму может быть заменена тестом Грегерсена (п. 1.3.5): в капле 3%-ного водного раствора КОН на предметном стекле эмульгируют фрагмент колонии, взятой с плотной среды. После нескольких секунд перемешивания петлей взвесь ослизняется и за петлей тянутся слизистые нити, что указывает на принадлежность испытуемой культуры или колонии к грамотрицательному виду. У грамположительных бактерий слизистые нити не образуются.

При использовании теста Грегерсена для характеристики формы клеток и образуемых исследуемой культурой скоплений клеток готовят и микроскопируют препарат «раздавленная капля», подкрашенный метиленовым синим.

Колиформные бактерии являются грамотрицательными палочками.

**Определение ферментации лактозы.** Оставшуюся часть оксидазоотрицательной грамотрицательной изолированной колонии засевают параллельно в две пробирки с полужидкой лактозопептонной средой. Посев производят уколом до дна пробирки.

Для подтверждения наличия ОКБ посев инкубируют при температуре 37°C в течение 48 ч. Для подтверждения наличия ТКБ посев осуществляют в среду, предварительно прогретую до температуры 44°C, и инкубируют при температуре 44°C в течение 24 ч. При обнаружении кислоты и газа дают положительный ответ.

При образовании кислоты цвет питательной среды изменяется с зеленого на желтый. При газообразовании газ скапливается или по уколу, или на поверхности, либо в толще среды появляются разрывы. При инкубации посевов более 5 ч газ может улетучиться. В таких случаях на присутствие газа указывают оставшиеся в толще среды «карманы» – потемнения среды на месте бывшего пузырька газа.

Если колония, подлежащая исследованию, незначительных размеров, ее пересекают на скошенный питательный агар и после инкубации в течение 18–24 ч выполняют все необходимые подтверждающие тесты.

**Учет результатов (окончательный).** Грамотрицательные колонии учитываются как ОКБ при отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при температуре 37°C с образованием кислоты и газа.

Грамотрицательные колонии учитываются как ТКБ при отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при температуре 44°C с образованием кислоты и газа.

При отсутствии ОКБ и ТКБ на всех фильтрах результат записывают «не обнаружено КОЕ ОКБ в 100 см<sup>3</sup>» и «не обнаружено КОЕ ТКБ в 100 см<sup>3</sup>».

В случае идентификации всех выросших подозрительных колоний число колониеобразующих единиц ОКБ и ТКБ подсчитывают на всех фильтрах и выражают результат анализа КОЕ в 100 см<sup>3</sup> воды.

Окончательный результат выдают: количество КОЕ ОКБ в 100 см<sup>3</sup>, из них количество КОЕ ТКБ в 100 см<sup>3</sup>.

Ориентировочный результат может быть выдан при обнаружении типичных колиформных колоний на среде Эндо, образованных грамотрицательными оксидазоотрицательными бактериями. Окончательный ответ подтверждается по результатам ферментации лактозы.

При наложении колоний или сплошном росте на всех фильтрах в случае подтверждения принадлежности к ОКБ и ТКБ выдается качественный результат «обнаружено ОКБ в 100 см<sup>3</sup>».

Если все колонии на фильтре оксидазоположительные или не подтвердилась их принадлежность к ОКБ и ТКБ, анализ завершается, в протоколе отмечают «зарост фильтров».

**1.4.3.2. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий в пробе воды титрационным методом.** Титрационный метод может быть использован при отсутствии материалов

и оборудования, необходимых для выполнения анализа методом мембранной фильтрации, при анализе воды с большим содержанием взвешенных веществ и в случае преобладания в воде посторонней микробиоты, препятствующей получению на фильтрах изолированных колоний ОКБ.

Метод основан на накоплении бактерий после посева установленного объема воды в жидкую питательную среду с последующим пересевом на дифференциальную плотную питательную среду с лактозой и идентификацией колоний по культуральным и биохимическим тестам.

**Выполнение анализа.** При исследовании питьевой воды с целью количественного определения ОКБ и ТКБ производят посев: 3 объема по 100 см<sup>3</sup>, 3 объема по 10 см<sup>3</sup>, 3 объема по 1 см<sup>3</sup>.

Каждый объем исследуемой воды засевают в лактозо-пептонную среду, приготовленную по п. 1.3.2. Посев 100 см<sup>3</sup> и 10 см<sup>3</sup> воды производят в 10 и 1 см<sup>3</sup> концентрированной лактозо-пептонной среды, посев 1 см<sup>3</sup> пробы проводят в 10 см<sup>3</sup> среды обычной концентрации.

Посевы инкубируют при 37°С в течение 48 ч. Не ранее 24 ч инкубации проводят предварительную оценку посевов. Из емкостей, где отмечено наличие роста (помутнение) и образование газа, производят высев бактериологической петлей на секторы среды Эндо для получения изолированных колоний.

Емкости без наличия роста и образования газа оставляют в термостате и окончательно просматривают через 48 ч. Посевы без признаков роста считают отрицательными, и дальнейшему исследованию они не подлежат. Из емкостей, где отмечено помутнение и образование газа или только помутнение, делают высев на секторы среды Эндо.

Посевы на среде Эндо инкубируют при температуре 37°С в течение 18–20 ч.

**Учет результатов посева (промежуточный).** При образовании помутнения и газа в среде накопления и росте на среде Эндо колоний, типичных для лактозоположительных бактерий: темно-красных или красных, с металлическим блеском или без него, выпуклых с красным центром и отпечатком на питательной среде, дают положительный ответ на присутствие общих колиформных бактерий в данном объеме пробы.

При исследовании трех объемов по 100 см<sup>3</sup> результаты оцениваются качественно и при обнаружении ОКБ и ТКБ хотя бы в одном из трех объемов делается запись в протоколе «обнаружены в 100 см<sup>3</sup>».

При исследовании количественным методом определяют наиболее вероятное число (НВЧ) ОКБ и ТКБ по табл. 2. Результат сообщают без доверительного интервала.

Таблица 2

**Расчет наиболее вероятного числа бактерий в 100 см<sup>3</sup> питьевой воды**

| Число положительных результатов<br>из трех объемов |                    |                   | НВЧ<br>бактерий<br>в 100 см <sup>3</sup> | Доверительный<br>интервал (95%) |         |
|----------------------------------------------------|--------------------|-------------------|------------------------------------------|---------------------------------|---------|
| 100 см <sup>3</sup>                                | 10 см <sup>3</sup> | 1 см <sup>3</sup> |                                          | нижний                          | верхний |
| 0                                                  | 0                  | 1                 | 0,3                                      | 0                               | 1,4     |
| 0                                                  | 0                  | 2                 | *                                        |                                 |         |
| 0                                                  | 0                  | 3                 | *                                        |                                 |         |
| 0                                                  | 1                  | 0                 | 0,3                                      | 0,1                             | 1,4     |
| 0                                                  | 1                  | 1                 | *                                        |                                 |         |
| 0                                                  | 1                  | 2                 | *                                        |                                 |         |
| 0                                                  | 1                  | 3                 | *                                        |                                 |         |
| 0                                                  | 2                  | 0                 | 0,6                                      | 0,1                             | 2,8     |
| 0                                                  | 2                  | 1                 | *                                        |                                 |         |
| 0                                                  | 2                  | 2                 | *                                        |                                 |         |
| 0                                                  | 2                  | 3                 | *                                        |                                 |         |
| 0                                                  | 3                  | 0                 | *                                        |                                 |         |
| 0                                                  | 3                  | 1                 | *                                        |                                 |         |
| 0                                                  | 3                  | 2                 | *                                        |                                 |         |
| 0                                                  | 3                  | 3                 | *                                        |                                 |         |
| 1                                                  | 0                  | 0                 | 0,4                                      | 0,1                             | 1,7     |
| 1                                                  | 0                  | 0                 | 0,7                                      | 0,2                             | 3,4     |
| 1                                                  | 0                  | 2                 | *                                        |                                 |         |
| 1                                                  | 0                  | 3                 | *                                        |                                 |         |
| 1                                                  | 1                  | 0                 | 0,7                                      | 0,2                             | 3,4     |
| 1                                                  | 1                  | 1                 | 1,1                                      | 0,2                             | 5,2     |
| 1                                                  | 1                  | 2                 | *                                        |                                 |         |
| 1                                                  | 1                  | 3                 | *                                        |                                 |         |
| 1                                                  | 2                  | 0                 | 1,1                                      | 0,2                             | 5,3     |
| 1                                                  | 2                  | 1                 | *                                        |                                 |         |
| 1                                                  | 2                  | 2                 | *                                        |                                 |         |
| 1                                                  | 2                  | 3                 | *                                        |                                 |         |
| 1                                                  | 3                  | 0                 | *                                        |                                 |         |
| 1                                                  | 3                  | 1                 | *                                        |                                 |         |
| 1                                                  | 3                  | 2                 | *                                        |                                 |         |
| 1                                                  | 3                  | 3                 | *                                        |                                 |         |
| 2                                                  | 0                  | 0                 | 0,9                                      | 0,2                             | 4,3     |
| 2                                                  | 0                  | 1                 | 1,4                                      | 0,3                             | 6,7     |
| 2                                                  | 0                  | 2                 | *                                        |                                 |         |

| Число положительных результатов<br>из трех объемов |                    |                   | НВЧ<br>бактерий<br>в 100 см <sup>3</sup> | Доверительный<br>интервал (95%) |       |
|----------------------------------------------------|--------------------|-------------------|------------------------------------------|---------------------------------|-------|
| 100 см <sup>3</sup>                                | 10 см <sup>3</sup> | 1 см <sup>3</sup> |                                          |                                 |       |
| 2                                                  | 0                  | 3                 | *                                        |                                 |       |
| 2                                                  | 1                  | 0                 | 1,5                                      | 0,3                             | 6,9   |
| 2                                                  | 1                  | 1                 | 2                                        | 0,4                             | 9,6   |
| 2                                                  | 1                  | 2                 | *                                        |                                 |       |
| 2                                                  | 1                  | 3                 | *                                        |                                 |       |
| 2                                                  | 2                  | 0                 | 2                                        | 0,5                             | 9,9   |
| 2                                                  | 2                  | 1                 | 3                                        | 0,6                             | 12,9  |
| 2                                                  | 2                  | 2                 | *                                        |                                 |       |
| 2                                                  | 2                  | 3                 | *                                        |                                 |       |
| 2                                                  | 3                  | 0                 | 3                                        | 0,6                             | 133   |
| 2                                                  | 3                  | 1                 | *                                        |                                 |       |
| 2                                                  | 3                  | 2                 | *                                        |                                 |       |
| 2                                                  | 3                  | 3                 | *                                        |                                 |       |
| 3                                                  | 0                  | 0                 | 2                                        | 0,5                             | 10,8  |
| 3                                                  | 0                  | 1                 | 4                                        | 0,8                             | 18,0  |
| 3                                                  | 0                  | 2                 | 6                                        | 1,4                             | 29,7  |
| 3                                                  | 0                  | 3                 | *                                        |                                 |       |
| 3                                                  | 1                  | 0                 | 4                                        | 0,9                             | 20,0  |
| 3                                                  | 1                  | 1                 | 8                                        | 1,6                             | 35,0  |
| 3                                                  | 1                  | 2                 | 12                                       | 2,5                             | 53,8  |
| 3                                                  | 1                  | 3                 | *                                        |                                 |       |
| 3                                                  | 2                  | 0                 | 9                                        | 2,0                             | 43,6  |
| 3                                                  | 2                  | 1                 | 15                                       | 3,2                             | 69,8  |
| 3                                                  | 2                  | 2                 | 21                                       | 4,6                             | 100,3 |
| 3                                                  | 2                  | 3                 | 29                                       | 6,2                             | 136,4 |
| 3                                                  | 3                  | 0                 | 24                                       | 5,1                             | 112,1 |
| 3                                                  | 3                  | 1                 | 46                                       | 9,3                             | 216,0 |
| 3                                                  | 3                  | 2                 | 110                                      | 23,5                            | 516,6 |
| 3                                                  | 3                  | 3                 | >240                                     | —                               | —     |

\*Вероятность ниже допустимого уровня. Количественный учет не возможен, результат оценивается качественно.

**Подтверждение принадлежности к ОКБ.** Выполняют, если в среде накопления отмечено только помутнение и если принадлежность к лактозоположительным колониям вызывает сомнение у исследователя. В этих случаях:

— проверяют наличие отпечатка на среде Эндо после снятия петлей подозрительной колонии;

- выполняют оксидазный тест;
- подтверждают принадлежность к Граму;
- подтверждают способность к газообразованию при посеве изолированных 1–2 колоний каждого типа с каждого сектора на среду с лактозой по п. 1.3.2 с последующей инкубацией посевов при температуре 37°C в течение 24–48 ч.

**Учет результатов при подтверждении наличия ОКБ.** Отрицательный ответ дают, если выполняется любое из условий:

- в лактозо-пептонной среде нет признаков роста;
- на секторах среды Эндо нет роста либо выросли нехарактерные для колиформных бактерий колонии;
- все колонии оказались оксидазоположительными;
- все колонии оказались грамположительными;
- в подтверждающем тесте на полужидкой лактозо-пептонной среде не отмечено газообразования.

**Подтверждение принадлежности к ТКБ.** Работают с секторами среды Эндо, где выросли типичные лактозоположительные колонии. Делают посев 2–3 изолированных колоний каждого типа с каждого сектора в пробирки с любой из лактозных сред, приготовленных по п. 1.3.2, помещают их в термостат и инкубируют при температуре 44°C в течение 24 ч. При образовании кислоты цвет питательной среды изменяется с зеленого на желтый. При газообразовании газ скапливается под колпачком, при значительном газообразовании колпачок всплывает.

Допустимо для ускорения выдачи ответа на присутствие ТКБ производить высев 1 см<sup>3</sup> из объемов среды накопления, где отмечено помутнение и газообразование в пробирке с лактозо-пептонной средой с поплавком. Посевы выдерживают в термостате при температуре 44°C в течение 24 ч. При обнаружении кислоты и газа дают положительный ответ.

**Учет результатов при подтверждении наличия ТКБ.** При образовании газа в среде накопления, росте на среде Эндо лактозоположительных бактерий и выявлении способности этих бактерий ферментировать лактозу до кислоты и газа в течение 24 ч при температуре 44°C дают положительный ответ на наличие в этом объеме пробы воды ТКБ. Во всех остальных случаях дают отрицательный ответ.

**Учет результатов (окончательный).** Выполняется в порядке, изложенном в подп. 1.4.4.1.

При отрицательном ответе на наличие ОКБ и ТКБ во всех исследованных объемах выдают заключение в протоколе «не обнаружены в 100 см<sup>3</sup>».

#### **1.4.4. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий в пробе воды**

Сульфитредуцирующие клостридии – спорообразующие анаэробные палочковидные бактерии, восстанавливающие сульфит натрия на железосульфитном агаре при температуре 44°C в течение 16–18 ч.

Метод определения основан на выращивании посевов в железосульфитном агаре в условиях, приближенных к анаэробным, и подсчете числа черных колоний.

**Оборудование:** водяной термостат для температурного режима 75°C, суховоздушный термостат для температурного режима 44°C, прибор для мембранной фильтрации под вакуумом с устройством для создания разрежения (0,5–1,0) атм.

**Питательная среда:** железосульфитный агар (п. 1.3.3).

**Выполнение анализа.** Пробу воды объемом 20 см<sup>3</sup> прогревают на водяной бане в пробирках при температуре 75°C в течение 15 мин для исключения вегетативных форм. При исследовании хлорированной воды прогревание пробы можно не производить.

Прогретую пробу воды фильтруют в соответствии с требованиями, изложенными в подп. 1.4.3.1. Определение далее может выполняться в пробирках или чашках Петри.

При определении по первому варианту пробирки с железосульфитным агаром, приготовленным по п. 1.3.3, перед посевом расплавляют, избегая кипения, в течение посева поддерживают среду нагретой до 70–80°C в водяной бане. После фильтрования установленного объема воды мембранный фильтр фламбированным пинцетом берут за два противоположных края и согнутый в виде трубочки помещают в пробирку с горячим агаром. Сторона фильтра с осевшими бактериями обращена внутрь. При этом фильтр распрямляется и располагается по стенке пробирки. Сразу же после посева пробирку с агаром и фильтром для создания анаэробных условий быстро охлаждают, помещая в емкость с холодной водой.

При определении по второму варианту чашки Петри заливают тонким слоем железосульфитного агара. После фильтрации фильтр помещают фильтрующей поверхностью вниз на застывшую пита-

тельную среду так, чтобы под фильтром не было пузырьков воздуха. Затем заливают расплавленным железосульфитным агаром до верхнего края чашки, чтобы крышка плотно прилегала к среде для создания анаэробных условий.

Культивируют посевы, выполненные по любому из вариантов, при 44°C в течение 16–18 ч.

**Учет результатов.** Количественному учету подлежат только те посевы, где получены изолированные колонии. Подсчитывают черные колонии, выросшие как на фильтрах, так и в толще питательной среды.

Результат анализа выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) спор сульфитредуцирующих клостридий в 20 см<sup>3</sup> воды.

При отсутствии роста черных колоний на всех фильтрах дают ответ «не обнаружено в 20 см<sup>3</sup> воды».

При невозможности учета колоний из-за сливного роста результат оценивается как качественный, в протоколе отмечают «обнаружено в 20 см<sup>3</sup> воды». При необходимости получения количественного результата анализ повторяют.

#### **1.4.5. Анализ результатов санитарно-микробиологического исследования питьевой водопроводной воды**

Общее микробное число – чувствительный показатель увеличения в воде легкоусвояемых органических веществ и характеризует, как правило, санитарное состояние разводящих водопроводных сетей и их герметичность.

Наличие в воде бактерий-индикаторов фекального загрязнения ОКБ, ТКБ и непосредственно *E. coli* свидетельствует о возможном присутствии патогенных бактерий – возбудителей кишечных инфекций. Общие колиформные бактерии не всегда напрямую связаны с наличием фекального загрязнения: бактерии родов *Serratia* и *Citrobacter* могут обитать в воде водоемов. Однако этот тест все же применим для микробиологического контроля качества воды, так как коррелирует с содержанием *E. coli*. ТКБ, способные ферментировать лактозу при 44°C, подтверждают свежий фекальный характер загрязнений.

Споры сульфитредуцирующих клостридий живут в воде дольше и более устойчивы к обеззараживанию, чем колиформные бактерии, и поэтому их присутствие в воде, прошедшей дезинфекцию, свидетельствует о недостаточной очистке и возможном наличии устойчивых патогенных микроорганизмов.

## 1.5. Лабораторная работа

### Санитарно-микробиологический контроль воздуха закрытых помещений

Микробная загрязненность воздуха имеет непостоянный и локальный характер. В атмосферном воздухе СПМ (стафилококки и стрептококки) обнаруживают лишь в 3,7% проб, взятых в местах большого скопления людей. Среди микроорганизмов доминируют виды, обитающие в почве. В атмосферном воздухе в основном встречаются пигментообразующие кокки (в солнечные дни составляют 70–80% всей флоры), почвенные споровые и гнилостные микроорганизмы (содержание резко увеличивается в сухую и ветреную погоду), плесневые грибы и дрожжи (содержание увеличивается при повышении влажности атмосферного воздуха). Обычно выделяют бактерии родов *Micrococcus*, *Bacillus*, *Actinomyces*, грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и др. В атмосферном воздухе постоянно идут процессы самоочищения благодаря осадкам, инсоляции, температурным воздействиям и другим факторам. В свою очередь атмосферный воздух сам по себе – фактор очищения воздуха жилых помещений.

Микробиота воздуха закрытых помещений более однообразна и относительно стабильна. Среди микроорганизмов доминируют обитатели носоглотки человека, в том числе патогенные виды, попадающие в воздух при кашле, чихании или разговоре. Уровень микробного загрязнения зависит главным образом от плотности заселения, активности движения людей, санитарного состояния помещения, в том числе пылевой загрязненности, вентиляции, частоты проветривания, способа уборки, степени освещенности и других условий. Так, регулярные проветривания и влажная уборка помещений снижают обсемененность воздуха в 30 раз (по сравнению с контрольными помещениями). Самоочищение воздуха закрытых помещений не происходит.

Основная задача санитарно-микробиологического исследования воздуха – гигиеническая и эпидемиологическая оценка воздушной среды. При оценке санитарного состояния закрытых помещений в зависимости от задач исследования определяют ОМЧ, наличие СПМ (стафилококков,  $\alpha$ - и  $\beta$ -гемолитических стрептококков).

Во всех случаях, когда в воздухе жилых или производственных помещений обнаруживаются патогенные микроорганизмы, воздух считается загрязненным и эпидемически опасным.

В связи с развитием биотехнологической промышленности, использующей различные микроорганизмы-продуценты БАВ, существенно возрос риск выброса в атмосферу больших концентраций микроорганизмов, в том числе с измененным генотипом. На таких предприятиях исследуют количественное и качественное содержание в воздухе микроорганизмов-продуцентов с целью предупреждения воздействия их на организм работающих людей (возможность заболевания и развития сенсбилизации). Все микроорганизмы, разрешенные Министерством здравоохранения в качестве промышленных штаммов и компонентов бактериальных препаратов, относятся к непатогенным или условно-патогенным.

Исследование воздуха закрытых помещений проводится в медицинских (табл. 3), детских, культурных учреждениях и на некоторых предприятиях (табл. 4) в соответствии с Гигиеническими нормативами.

Таблица 3

**Допустимые значения санитарно-микробиологических показателей  
безопасности воздушной среды помещений организаций,  
занимающихся оказанием медицинской помощи**

| Наименование помещений                                                                              | Санитарно-микробиологические показатели                         |                 |                                                                     |                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------|
|                                                                                                     | Общее количество микроорганизмов, КОЕ/м <sup>3</sup> , не более |                 | Количество колоний <i>S. aureus</i> , КОЕ/м <sup>3</sup> , не более |                 |
|                                                                                                     | до начала работы                                                | во время работы | до начала работы                                                    | во время работы |
| Операционные для проведения сложных хирургических вмешательств                                      | 10                                                              | 50              | Не должно быть                                                      | Не должно быть  |
| Иные операционные, послеоперационные палаты, помещения стерильной зоны в стерилизационном отделении | 200                                                             | 500             | Не должно быть                                                      | Не должно быть  |
| Предоперационные, родильные залы, перевязочные, процедурные, прививочные кабинеты                   | 500                                                             | 750             | Не должно быть                                                      | Не должно быть  |
| Палаты хирургических отделений, послеродовые палаты                                                 | 750                                                             | 1000            | Не должно быть                                                      | 2               |

Таблица 4

**Среднесуточные ПДК микроорганизмов-продуцентов в воздухе  
рабочих помещений и в атмосферном воздухе населенных пунктов**

| Наименование<br>микроорганизма*                       | Назначение                                              | ПДК, кл./м <sup>3</sup> ,<br>в воздухе |                      | Класс<br>опас-<br>ности | Особенности<br>действия<br>на организм |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------------------------|
|                                                       |                                                         | рабочей<br>зоны                        | атмо-<br>сферном     |                         |                                        |
| <i>Escherichia coli</i> , штамм 472-Т-23              | Продуцент L-треонина                                    | Не нормируется                         | Выброс за-<br>прещен | —                       | А**                                    |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> , штамм 9741, «беж»    | Продуцент бензилпенициллина                             | 5 000                                  | 500                  | 3                       | А                                      |
| <i>Streptomyces aureofaciens</i> 777                  | Продуцент биовита и хлортетрациклина                    | 5 000                                  | 500                  | 3                       | А                                      |
| <i>Trichoderma reesei</i> , штамм NIBT 182-33, 182/КК | Продуцент целловиридина                                 | Не нормируется                         | 500                  | 3                       | —                                      |
| <i>Trichoderma viride</i> , штамм 44-11-62/3          | Продуцент комплекса целлюлолитических ферментов         | 2 000                                  | Не нормируется       | 3                       | —                                      |
| <i>Bacillus polymyxa</i> , штамм F-12                 | Продуцент β-амилазы                                     | 2 000                                  | 200                  | 3                       | А                                      |
| <i>Pseudomonas fluorescens (denitrificans)</i> B99    | Продуцент витамина В <sub>12</sub>                      | 2 000                                  | 200                  | 3                       | —                                      |
| <i>Bacillus subtilis</i> Био-реактор-1 БКМП2160       | Продуцент рибофлавина                                   | 5 000                                  | 500                  | 3                       | А                                      |
| <i>Bacillus thuringiensis</i>                         | Компонент средства защиты растений                      | 20 000                                 | Не нормируется       | 4                       | —                                      |
| <i>Pichia membranifaciens</i> , штамм ВМК-У-934       | Продуцент цитохрома С                                   | 2 000                                  | 200                  | 3                       | А                                      |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> , штамм В-6844         | Компонент препарата для очистки от нефтяных загрязнений | 5 000                                  | 500                  | 3                       | А                                      |
| <i>Lactobacillus casei</i> , штамм 21                 | Компонент препарата «Байкал»                            | 20 000                                 | 2 000                | 4                       | —                                      |

| Наименование микроорганизма*                                                    | Назначение                  | ПДК, кл./м <sup>3</sup> ,<br>в воздухе |                | Класс опасности | Особенности действия на организм |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|----------------|-----------------|----------------------------------|
|                                                                                 |                             | рабочей зоны                           | атмосферном    |                 |                                  |
| Микробный аэрозоль животноводческих и птицеводческих производственных помещений | Производственная микробиота | 50 000                                 | Не нормируется | 4               | А                                |

\* Названия индивидуальных микроорганизмов приведены в соответствии с определением бактерий Берджи (1997 г.).

\*\* А – микроорганизмы, способные вызывать аллергические заболевания

Для выделения микроорганизмов из воздуха используют следующие методы: седиментационный, фильтрационный и методы, основанные на принципе ударно-прибивного действия струи воздуха.

Седиментационный метод используют для установления состава микробиоты в закрытых помещениях. Данный метод контроля основан на явлении оседания частиц с имеющимися на них микроорганизмами из воздуха на горизонтальную поверхность питательной среды в течение определенного периода времени. Чашки Петри со средой расставляют в различные места и открывают на определенное время, затем закрывают и инкубируют, подсчитывают число колоний на чашках и выявляют их видовую принадлежность. Чаще всего в воздухе определяют ОМЧ (применяют чашки с МПА), содержание стафилококков (используют чашки с желточно-солевым агаром), по эпидемическим показаниям устанавливают содержание стрептококков (применяют чашки с кровяным агаром). При обследовании воздуха аптек производят определение содержания грибов, используя чашки со средой Сабуро. Во всех случаях время экспозиции 15 мин. Полагают, что при спокойном состоянии воздуха на площадь 100 см<sup>2</sup> за это время оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 0,01 м<sup>3</sup>. Главный недостаток седиментационного метода – выявление только больших оседающих частиц и большая неопределенность в объеме пробы воздуха.

Суть фильтрационного метода заключается в пропускании струи забранного воздуха через слой воды, затем проводят посев жидкости

на различные среды, выделяют и идентифицируют микроорганизмы, попавшие в воду.

Методы, основанные на принципе ударно-прибивного действия струи воздуха, реализуются с использованием специальных аппаратов (например, конструкции Ю. А. Кротова). Струя воздуха проходит через узкую щель и ударяется о влажную поверхность питательной среды. Во время отбора чашка Петри вращается вместе со столиком, чтобы обеспечить равномерное распределение микроорганизмов по поверхности среды.

Санитарно-микробиологический контроль воздуха закрытых помещений в лабораторной работе изложен согласно Инструкции 4.2.10-22-1–2006 с дополнением из ГОСТ 31746–2012.

Микробиологическое исследование воздушной среды лечебных учреждений предусматривает обязательное определение общего микробного числа (КОЕ/м<sup>3</sup>) и содержания *S. aureus* (КОЕ/м<sup>3</sup>). По усмотрению врача-эпидемиолога проводят определение содержания дрожжеподобных и плесневых грибов, микобактерий туберкулеза, патогенных грамотрицательных бактерий и др.

Пробы воздуха отбирают аспирационным (предпочтителен) или седиментационным методом, последний допускается для боксов при микробиологических исследованиях. Чашки с питательными средами устанавливают в зонах наиболее высокой вероятности контаминации воздуха.

В учебных лабораториях кафедры биотехнологии БГТУ студенты работают с промышленными продуцентами биологически активных веществ и других ценных компонентов микробных клеток, спиртов и органических кислот, а также используемыми в биотехнологической и фармацевтической отрасли тест-микроорганизмами. Такие работы ведутся с соблюдением правил асептики при работе с микробными культурами, в лаборатории периодически проводится обеззараживание воздуха с использованием ультрафиолетовых ламп, но в то же время загруженность лабораторий и число исполнителей (персонала, студентов) довольно велики. Поэтому оценка микробной загрязненности воздуха разных учебных лабораторий становится интересной задачей и предметом обсуждения.

**Цель работы:** санитарно-бактериологическая оценка состояния воздуха учебной лаборатории.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред и реактивов (подразд. 1.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды, питательных сред и растворов, бумажных фильтров. 3. Определение ОМЧ воздуха учебной лаборатории. 4. Установление количества бактерий *S. aureus* в воздухе учебной лаборатории. 5. Анализ результатов определения критериев санитарной микробиологии, вывод об уровне загрязненности воздушной среды учебной лаборатории в сопоставлении с требованиями Гигиенического норматива (табл. 3 и 4).

#### **1.5.1. Определение общего микробного числа воздуха учебной лаборатории**

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 37°C, хладотермостат на температурный режим 22°C.

**Питательные среды:** ПА или ГРМ-агар (п. 1.3.1).

**Проведение анализа.** В две чашки Петри наливают 12–20 см<sup>3</sup> расплавленной полноценной питательной агаризованной среды для бактерий (п. 1.3.1), после застывания среды устанавливают в учебной лаборатории на рабочую поверхность стола, в ламинарном шкафу и т. п. Предпочтительно расположить их на высоте, соответствующей уровню дыхания сидящего или стоящего человека. Чашки открывают, крышки кладут рядом не переворачивая и оставляют открытыми в течение 15 мин. Затем чашки накрывают крышками и посевы инкубируют: одну чашку при 37°C в течение 1–2 сут, вторую при 22°C в течение 3–5 сут.

**Учет результатов.** Подсчитывают число колоний, выросших на каждой чашке, результат умножают на 100. Полученные значения ОМЧ 37 и ОМЧ 22 записывают в отчет с указанием размерности КОЕ/м<sup>3</sup>.

По характерным морфологическим признакам колоний, полученных при учете общего микробного числа, также отдельно определяют количество бактерий, дрожжеподобных и мицелиальных грибов в размерности КОЕ/м<sup>3</sup>.

#### **1.5.2. Установление количества бактерий *S. aureus* в воздухе учебной лаборатории**

Метод определения основан на высеве на агаризованную селективно-диагностическую среду, инкубировании посевов, подсчете

типичных и (или) атипичных колоний, подтверждении по биохимическим признакам принадлежности выделенных колоний к *S. aureus*.

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 37°C.

**Питательные среды и реактивы:** ЖСА (п. 1.3.4), полужидкая среда Гисса с маннитом (п. 1.3.2), реактивы для окраски по Граму (п. 1.3.5), сердечно-мозговой бульон и лиофилизированная плазма крови кролика (п. 1.3.5).

**Проведение анализа.** В две чашки Петри наливают 12–20 см<sup>3</sup> расплавленного ЖСА, после застывания среды устанавливают в учебной лаборатории на рабочую поверхность стола, в ламинарном шкафу и т. п. (предпочтительно расположить их на высоте, соответствующей уровню дыхания сидящего или стоящего человека). Чашки открывают (крышки кладут рядом, не переворачивая) и оставляют открытыми в течение 20 мин. Затем чашки накрывают крышками и посеы инкубируют при 37°C в течение 48 ч. Бактерии *S. aureus* на желточно-солевом агаре растут в виде круглых, блестящих, маслянистых, выпуклых пигментированных колоний, в 60–70% случаев образуют радужный венчик вокруг колонии (положительная лецитиназная реакция).

**Учет результатов посева (промежуточный).** Подсчитывают суммарное число характерных колоний микроорганизмов, подозрительных на принадлежность к бактериям *S. aureus* и выросших на обеих чашках, результат усредняют.

**Проведение уточняющих испытаний на наличие бактерий *S. aureus*.** Для накопления культуры на скошенный ЖСА отсевают не менее двух колоний, подозрительных на стафилококк, и прежде всего колонии, дающие положительную лецитиназную реакцию. При отсутствии на чашках таких колоний дальнейшему исследованию подвергаются пигментированные колонии, схожие по морфологии со стафилококком. При одновременном наличии на чашках колоний стафилококка, отличающихся пигментом, следует исследовать не менее двух колоний различного вида.

Пробирки с посевом помещают в термостат при 37°C. После суточной инкубации у выделенных штаммов проверяют морфологические (микроскопирование препарата «раздавленная капля» при увеличении ×900) и тинкториальные свойства (окраска по Граму), наличие плазмокоагулазной активности.

При микроскопировании окрашенные по Граму стафилококки имеют вид фиолетово-синих кокков, располагающихся гроздьями или небольшими скоплениями («кружево»).

Плазмокоагулирующую активность определяют по реакции коагуляции плазмы. Коагулазы, вырабатываемые *S. aureus*, участвуют в трансформации фибриногена в фибрин. Переносят колонию с селективной среды для выделения *S. aureus* в сердечно-мозговой бульон и инкубируют при 37°C в течение 4–6 ч. В стерильной пробирке смешивают 0,5 см<sup>3</sup> культуральной среды и 0,5 см<sup>3</sup> раствора плазмы крови кролика, инкубируют при 37°C при наблюдении в течение 1, 2, 4, 8, 24 ч. Инкубировать более 24 ч не рекомендуется, потому что возможен самопроизвольный фибринолиз. Проверяют образование тромба с использованием стерильной петли.

С учетом результатов теста на коагулазу и лецитиназную активность может быть подтверждена принадлежность выделенного штамма к виду золотистого стафилококка и выдан соответствующий ответ.

Если культура обладает только плазмокоагулирующей или только лецитиназной активностью, то для окончательного ответа требуется определение ферментации маннита в анаэробных условиях (табл. 5).

Таблица 5

Тесты для идентификации *S. aureus*

| Вариант | Плазмокоагулаза | Ферментация маннита в анаэробных условиях | Принадлежность штамма к виду |
|---------|-----------------|-------------------------------------------|------------------------------|
| 1       | +               | –                                         | Да                           |
| 2       | +               | +                                         | Да                           |
| 3       | –               | –                                         | Нет                          |
| 4       | –               | +                                         | Да                           |

Для проведения теста ферментации маннита в анаэробных условиях суточную агаровую культуру засевают уколом в столбик полужидкой среды Гисса с маннитом, на поверхность среды наливают 1,5 см<sup>3</sup> стерильного вазелинового масла. Посевы инкубируют при 37°C в течение 5 сут, ежедневно просматривают и ведут учет. Положительной считается реакция изменения цвета среды.

**Учет результатов.** Количество бактерий *S. aureus* в воздухе учебной лаборатории определяют по числу типичных и (или) атипичных (дающих или не дающих положительную лецитиназную реакцию) колоний, выросших на чашках Петри с ЖСА, для которых подтверждены характерные морфологические признаки, клетки грамположительные, в тесте на плазмокоагулазу получена положительная реакция и (или) культура утилизирует маннит в анаэробных условиях. Подсчитывают суммарное число колоний, выросших на обеих чашках и соответствующих указанным выше признакам, рассчитывают среднее значение, результат умножают на 100, полученное значение записывают в отчет с указанием размерности КОЕ/м<sup>3</sup>.

## **2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ОБЪЕКТОВ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЯХ**

---

Перенос загрязнений происходит преимущественно по воздуху, так как в воздух могут попадать загрязнения от любых контаминирующих источников. Возможен перенос загрязнений и контактным способом, поскольку в производстве лекарственных средств есть и ручные операции. По этой причине главными объектами микробиологического мониторинга являются воздух, поверхности и персонал, а предметом контроля – жизнеспособные микроорганизмы.

Микробиологический мониторинг является системой методов контроля производственной среды фармацевтического предприятия и проводится с целью получения объективной информации для оценки эффективности управления факторами, влияющими на качество продукции и процессов. Он должен быть организован так, чтобы своевременно выявлять вероятные пути загрязнения чистого помещения (зоны), обеспечивая возможность принятия эффективных мероприятий, предупреждающих загрязнение продукции.

Для анализа результативности микробиологического мониторинга используют проверки (аудиты), внеплановые отбор и анализ проб. Показателем эффективности функционирования программы мониторинга может служить доля бракованной продукции по показателю «микробиологическая чистота».

### **2.1. Объекты, точки и частота отбора проб при контроле микробиологической загрязненности производственной среды**

Объектами микробиологического контроля на фармацевтическом производстве являются все объекты производственного процесса: воздух, поверхности помещения и оборудования, руки и одежда персонала, первичная упаковка, антисептические и дезинфицирующие средства.

Мониторинг проводят в чистых зонах А, В, С, D, К и в неклассифицированных, но контролируемых производственных помещениях в оснащённом и эксплуатируемом состояниях.

Точки отбора проб выбирают исходя из результатов исследования по анализу и оценке риска каждой стадии или операции технологического процесса получения лекарственного средства. Зонами наибольшего риска являются зоны (помещения), в которых проводятся операции с открытой продукцией, которые в дальнейшем не подвергаются стерилизации. При проведении анализа на конкретном производстве учитывают правила:

- операции, при которых исходные материалы, полупродукты или продукт, упаковка или ее компоненты являются открытыми для окружающей среды, имеют повышенный риск загрязнения;

- процесс, включающий ручные операции, имеет повышенный риск загрязнения;

- работающий персонал является основным источником загрязнений;

- все вносимое в чистые помещения должно рассматриваться как потенциальный источник загрязнения;

- работающее оборудование может быть источником загрязнений из-за того, что его конструкционные особенности могут затруднять проведение очистки и дезинфекции.

В одном помещении число точек проведения контроля воздуха должно быть не менее 2, поверхностей – не менее 3, контролируются руки каждого оператора.

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.

Частота отбора проб устанавливается с учетом типа чистой зоны, результатов предыдущего контроля и загруженности производства. Увеличение частоты отбора рекомендовано, если:

- часто превышаются уровень предупреждения и (или) действия;
- обнаруживаются патогенные микроорганизмы в зоне риска;

– состоялось вмешательство в системы, обеспечивающие соблюдение нормируемых параметров в контролируемой окружающей среде (например, строительные работы, существенное изменение в системе вентиляции);

– изменилась процедура очистки, дезинфекции, санитарной обработки;

– изменился технологический процесс, оказывающий влияние на контролируемую окружающую среду;

– были инциденты, которые могут увеличить микробиологическое загрязнение (например, сезонные всплески заболеваемости);

– обнаружены другие отклонения (например, получение необычных результатов микробиологического мониторинга).

Снижение периодичности мониторинга может быть обосновано, если используются полностью закрытые системы во время приготовления продукта или его компонентов, продукт немедленно используется (например, разливается) после приготовления, предусмотрена финишная стерилизация продуктов.

## **2.2. Общая схема контроля микробиологической загрязненности производственной среды**

При проведении микробиологического контроля надо получить сведения не только о наличии или отсутствии микробиологического загрязнения, но и о количестве микроорганизмов и их характеристиках. Последовательность действий при проведении микробиологического анализа включает выделение микроорганизмов из производственной среды (на пластину, агар, в жидкость, на мембранный фильтр), посев на питательную среду (если требуется), культивирование, подсчет, действия по идентификации, регистрацию результатов.

По окончании инкубации проводят подсчет количества колоний, которые выросли на каждой чашке Петри, находят среднее арифметическое значение и вычисляют количество КОЕ бактерий и грибов, округляя значение до целого. Полученные результаты пересчитывают на объем воздуха, площадь поверхности и т. д.

При подозрении в ходе мониторинга на наличие специфических микроорганизмов должна выполняться идентификация.

Если превышен уровень действия в зонах А и В – микроорганизмы идентифицируют до вида, если превышен уровень предупреждения – до рода. В зонах класса С – если превышен уровень действия, то идентификацию ведут до рода. В зонах класса D для изолятов, обнаруживаемых часто, проводится идентификация с использованием окрашивания по Граму.

К микроорганизмам, которые наиболее часто могут быть выделены из производственных сред асептического производства, относятся бактерии, колонизирующие кожные покровы и слизистые оболочки человека: представители родов *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina* и *Streptococcus*. Споровые формы (эндоспоры бактерий рода *Bacillus*, конидии мицелиальных грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium*) обычны для пыли. При обнаружении спорообразующих бактерий и грибов должны быть предприняты дополнительные меры по дезинфекции или замене дезинфицирующего агента.

Рекомендации по определению содержания микроорганизмов в воздухе и на поверхностях оборудования приведены в ТКП 096-2017, на одежде и руках персонала – в ТКП 095-2017.

### **2.3. Меры предосторожности и контроль соблюдения условий асептики при проведении микробиологического мониторинга и выполнении микробиологического анализа**

При организации и отборе проб уделяется внимание предотвращению (сведению к минимуму) риска нанесения вреда имеющейся защите чистой зоны. Все вносимое в зону и персонал, выполняющий отбор проб, не должны сами являться источником микробиологического загрязнения, а работающее пробоотборное оборудование не должно изменять параметры воздушного потока, обеспечивающего чистоту данного помещения.

Перед проведением испытания подготавливают и стерилизуют лабораторную посуду, вспомогательные материалы, питательные среды и растворы, проводят уборку и дезинфекцию чистых помещений и оборудования. Посуда должна быть промаркирована с указанием даты и времени отбора пробы, наименования образца

(включает номер пробы, номер точки отбора проб, ссылки на план отбора проб), типа питательной среды.

Работник должен быть одет в халат (или костюм из штанов и свитшота), волосы убраны под шапочку, нос и рот закрыты маской, на руках тонкие резиновые перчатки, на ногах сменная обувь или бахилы. Руки в перчатках обрабатывают до и после выполнения посева 76%-ным раствором этанола.

Для создания и поддержания условий асептики в помещении микробиологической лаборатории используют ламинарные шкафы и боксы микробиологической безопасности, размещенные в отдельных помещениях. Внутри ламинарного шкафа создают условия, соответствующие зоне чистоты класса А, окруженной зоной чистоты класса Б (помещение или бокс микробиологической лаборатории, в котором размещен ламинарный шкаф). Боксы микробиологической безопасности III класса (изоляторы) представляют собой герметично замыкающиеся стерилизуемые пространства, внутри которых с использованием вмонтированных перчаток можно производить необходимые манипуляции. В приложении представлены порядок подготовки к работе и эксплуатации ламинарного шкафа, устройство изолятора и порядок подготовки его к работе, указания к эксплуатации изолятора при проведении испытания на стерильность.

Меры предосторожности, принимаемые против контаминации, не должны влиять ни на один из микроорганизмов, обнаруживаемых в ходе испытания. Рабочие условия контролируются путем отбора проб воздуха, поверхностей рабочей зоны и соответствующих контрольных испытаний.

Параллельно с проведением испытания осуществляют контроль воздушной среды в ламинарных зонах боксов и рук персонала. Для этого чашки Петри со средой № 1 (или соево-казеиновый агар) и со средой № 2 (или агар Сабуро с декстрозой) ставят вблизи проводимого испытания, снимая крышки (которые кладут внутренней частью вниз на рабочую поверхность), и оставляют открытыми в течение всего времени испытания, меняя на новые каждые 4 часа. Чашки маркируют с указанием даты, номера чистого помещения. Микробиолог и лаборант-микробиолог ежедневно по окончании работ осуществляют контроль рук методом отпечатков. Отпечатки пальцев обеих рук (в перчатках) делают на чашки Петри со средой № 1 с указанием даты, номера чашки Петри, фамилии персонала. Параллельно с испытаниями проводят контроль негативного влияния

промывной жидкости на результат. Если проводится испытание нескольких серий одного наименования или разных наименований образцов одним методом, причем используется одна серия промывной жидкости, то контроль негативного влияния промывной жидкости выполняется 1 раз в смену.

## **2.4. Питательные среды и растворы для оценки микробной обсемененности объектов микробиологического мониторинга, фармацевтического сырья и продукции**

Оценку обсемененности микроорганизмами проводят с использованием полноценных питательных сред, пригодных для культивирования бактерий и грибов.

Для проведения микробиологического мониторинга и контроля микробной чистоты нестерильных лекарственных средств используют агаризованную среду на основе гидролизата казеина и соевых бобов (альтернативно – среду № 1) и декстрозный агар Сабуро (альтернативно – среду № 2). Для испытания на стерильность признаны пригодными жидкая тиогликолевая среда (предназначена в первую очередь для культивирования анаэробных бактерий, но также пригодна для обнаружения и аэробных бактерий) и среда на основе гидролизатов соевых бобов и казеина (альтернативно – декстрозный бульон Сабуро, среда № 2), они подходят для культивирования как грибов, так и аэробных бактерий. Могут быть использованы также и другие среды при условии их соответствия требованиям испытаний на пригодность.

Если не указано иное, то среды и растворы стерилизуют автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин.

Бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов: панкреатический гидролизат казеина – 17,0 г, папаиновый гидролизат соевых бобов – 3,0 г, натрия хлорид – 5,0, дикалия гидрофосфат – 2,5 г, глюкоза моногидрат – 2,5 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН после стерилизации – 7,3. Стерилизуют в автоклаве.

Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов: панкреатический гидролизат казеина – 15,0 г, папаиновый гидролизат соевых бобов – 5,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, агар – 15,0 г,

вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН после стерилизации 7,3. Стерилизуют в автоклаве.

Декстрозный бульон Сабуро: декстроза – 20,0 г, смесь пепсинового гидролизата животных тканей и панкреатического гидролизата казеина (1 : 1) – 10,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН после стерилизации – 5,6. Стерилизуют в автоклаве.

Декстрозный агар Сабуро: декстроза – 40,0 г, смесь пепсинового гидролизата животных тканей и панкреатического гидролизата казеина (1 : 1) – 10,0 г, агар – 15,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН после стерилизации – 5,6. Стерилизуют в автоклаве.

Агаризованная среда № 1 (для выращивания бактерий): пептон ферментативный сухой – 10,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, глюкоза моногидрат – 1,0 г, агар – 13,0 г, мясная вода – до 1 дм<sup>3</sup>. Все компоненты растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, значение рН доводят до 7,3. Кипятят в течение 1 мин, прибавляя агар, нагревают до полного его растворения, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют в автоклаве.

Жидкая среда № 1 (мясо-пептонный бульон): пептон ферментативный сухой – 10,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, глюкоза моногидрат – 1,0 г, мясная вода – до 1 дм<sup>3</sup>. К мясной воде прибавляют пептон и натрия хлорид, растворяют при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, значение рН доводят до 7,3. Кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве.

Агаризованная среда № 2 (Сабуро-агар): пептон ферментативный сухой – 10,0 г, глюкоза моногидрат – 40,0 г, агар – 13,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН после стерилизации – 5,6. Все компоненты растворяют в воде, очищенной при нагревании, вносят агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Для подавления роста бактерий после стерилизации прибавляют 100 мг бензилпенициллина натрия и 100 мг тетрациклина (либо перед стерилизацией 50 мг хлорамфеникола) на 100 см<sup>3</sup> среды. Стерилизуют в автоклаве.

Жидкая среда № 2 (среда Сабуро): пептон ферментативный сухой – 10,0 г, глюкоза моногидрат – 40,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН после стерилизации – 5,6. Все компоненты растворяют в воде, очищенной при нагревании, раствор фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве.

Жидкая тиогликолевая среда: L-цистин – 0,5 г, агар – 0,75 г, натрия хлорид – 2,5 г, глюкоза моногидрат (глюкоза безводная) – 5,5

(5,0) г, дрожжевой экстракт (водорастворимый) – 5,0 г, панкреатический гидролизат казеина – 15,0 г, натрия тиогликолят – 0,5 г или тиогликолевая кислота – 0,3 см<sup>3</sup>, раствор резазурина натрия 0,1%-ный свежеприготовленный – 1,0 см<sup>3</sup>, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН среды после стерилизации – 7,1.

Смешивают L-цистин, агар, натрия хлорид, глюкозу, водорастворимый дрожжевой экстракт и панкреатический гидролизат казеина с 1 дм<sup>3</sup> воды и нагревают до получения раствора. Натрия тиогликолят или тиогликолевую кислоту растворяют в полученной смеси, раствор фильтруют в горячем виде, прибавляют раствор резазурина натрия, перемешивают и помещают среду в подходящие сосуды, которые обеспечивают такое отношение поверхности к глубине среды, чтобы изменению окраски, указывающему на поглощение кислорода в конце периода инкубирования, был подвержен только верхний слой, составляющий не более трети от общего объема среды. Стерилизуют в автоклаве. Среду хранят при температуре от 2 до 25°C в стерильном воздухонепроницаемом контейнере. Если верхний слой, составляющий не более трети от общего объема среды, приобретает розовую окраску, среду можно однократно регенерировать путем нагрева контейнеров на водяной бане или в струе пара до исчезновения розовой окраски с последующим быстрым охлаждением; при этом должны быть приняты меры предосторожности против попадания в контейнер нестерильного воздуха. 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 (резазурин) на красный. Низкий редокс-потенциал помогает поддерживать небольшое количество агара в среде.

Для смыва микробиоты с поверхности контролируемого объекта, приготовления разведений, промывки мембранных фильтров используют растворы, в состав которых включены забуферивающие, эмульгирующие, создающие физиологически приемлемое для микроорганизмов осмотическое давление компоненты.

Основной буферный раствор: 34 г калия дигидрофосфата помещают в мерную колбу вместимостью 1 дм<sup>3</sup>, растворяют в 0,5 дм<sup>3</sup> очищенной воды, корректируют значение рН раствора до 7,2 натрия гидроксидом, доводят водой очищенной до объема 1 дм<sup>3</sup>

и перемешивают. Готовый раствор разливают во флаконы и стерилизуют в автоклаве; хранят при температуре 2–8°C.

Фосфатный буферный раствор pH 7,2: смешивают основной буферный раствор и очищенную воду (1 : 800, об/об.) и стерилизуют в автоклаве.

Забуференный раствор натрия хлорида и пептона pH 7,0: калия дигидрофосфат – 3,6 г, динатрия гидрофосфат дигидрат – 7,2 г, натрия хлорид – 4,3 г, пептон (мясной или казеиновый) – 1,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>. Стерилизуют в автоклаве.

9%-ный раствор натрия хлорида: 9,0 г натрия хлорида растворяют в 1 дм<sup>3</sup> воды очищенной. Раствор фильтруют через бумажный фильтр, стерилизуют в автоклаве.

Раствор № 1 (для промывания мембраны): пептон ферментативный – 1,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH 7,1. Стерилизуют в автоклаве.

Раствор № 2 (для промывания мембраны после фильтрования эмульсий): пептон ферментативный – 5,0 г, полисорбат 80 – 10,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH 7,1. Стерилизуют в автоклаве.

## **2.5. Лабораторная работа**

### **Микробиологический контроль производственной среды**

Контроль микробной контаминации поверхностей производственных помещений и персонала (одежды, перчаток, масок, обуви) заключается в определении количества жизнеспособных микроорганизмов, извлеченных с поверхности (в том числе одежды) общей площадью 100 см<sup>2</sup> (четыре по 25 см<sup>2</sup>) с использованием контактного метода (метода отпечатков) и метода смывов.

Метод смывов рекомендован при контроле пористых, неровных поверхностей, мелких предметов. Смывы с поверхности производят с помощью аккуратных движений близко расположенными параллельными линиями. Затем такими же движениями происходит смыв в направлении, перпендикулярном предыдущему. Время контакта и смыва должно составлять 10 мин.

Контроль персонала производства осуществляют методом смывов или контактным методом (методом отпечатков). Контролируют количество микроорганизмов на поверхности одежды (предплечья,

грудь, маска, шапочка) с площади 25 см<sup>2</sup> для каждого объекта и рук в перчатках. 1 раз в месяц производится проверка рук персонала после обработки антисептиком. В оснащем состоянии контролируют техническую одежду персонала из упаковки.

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 методами, в помещениях классов С, D, К (не классифицируемых, но контролируемых) – аспирационным.

Период времени обычно соответствует длительности контролируемого процесса и составляет от нескольких минут до нескольких часов. Время седиментации для зон А и В составляет 4 ч.

Фактически седиментационный метод является качественным, полученные результаты нельзя использовать для пересчета в количество микроорганизмов в единице объема воздуха. Но этот метод может быть использован для характеристики микробиологических загрязнений, попадающих в продукцию из воздуха, позволяет определить весь спектр присутствующих микроорганизмов в данный момент времени.

При седиментационных испытаниях по известной формуле площади чашки Петри и известном времени экспозиции можно определить количество жизнеспособных клеток, осевших на поверхность питательной среды в единицу времени на каждую чашку Петри.

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 помещения | Оснащенное состояние помещения | Эксплуатируемое состояние помещения | Оснащенное состояние помещения |
| А                           | –                                   | Менее 1                        | –                                   | Менее 1                        |
| В                           | 2                                   | 3                              | 3                                   | 5                              |
| С                           | 10                                  | 15                             | 15                                  | 25                             |
| D                           | 15                                  | 25                             | 25                                  | 50                             |

*Примечание.* Присутствие спорообразующих бактерий и грибов, бактерий семейства Enterobacteriaceae, бактерий *P. aeruginosa* и *S. aureus* не допускается.

В табл. 7 представлены требования, предъявляемые к поверхностям рук в перчатках и технологической одежды, при контроле персонала контактным методом.

Таблица 7

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

| Категория чистоты помещения | Руки                                |                                | Технологическая одежда              |                                |
|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
|                             | Эксплуатируемое состояние помещения | Оснащенное состояние помещения | Эксплуатируемое состояние помещения | Оснащенное состояние помещения |
| A                           | –                                   | Менее 1                        | –                                   | Менее 1                        |
| B                           | 1                                   | 2                              | 1                                   | 2                              |
| C                           | 7                                   | 10                             | 10                                  | 15                             |
| D                           | 10                                  | 15                             | 15                                  | 25                             |

*Примечание.* Не допускается присутствие спорообразующих бактерий и грибов, бактерий семейства Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

Пределы содержания микроорганизмов в воздухе рабочих помещений приведены в табл. 8.

Таблица 8

**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.

**Цель работы:** оценка микробиологической чистоты учебной лаборатории по результатам контроля рабочих поверхностей, чистоты рук и воздуха.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред и буферного раствора (подразд. 2.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды и бумажных фильтров, стерильных трафаретов. 3. Проведение испытания микробиологической чистоты поверхностей рабочего стола и стены учебной лаборатории. 4. Проведение испытания микробиологической чистоты рук студентов в учебной лаборатории. 5. Проведение испытания микробиологической чистоты воздуха учебной лаборатории.

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 35°C, суховоздушный термостат на температурный режим 25°C.

**Питательные среды и реактивы:** агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (альтернативно – среда № 1), декстрозный агар Сабуро (альтернативно – среда № 2), фосфатный буферный раствор (подразд. 2.3).

### **2.5.1. Микробиологический контроль поверхностей рабочего стола и стены учебной лаборатории методом смывов**

**Проведение анализа.** Для проведения испытания контактным методом используют контактные чашки (либо пластины, либо полоски) с известной площадью (25 см<sup>2</sup>) с подходящими агаризованными средами для обнаружения бактерий и грибов. Контактную чашку открывают, прикладывают к контролируемой поверхности на несколько секунд при одинаковом давлении без поворота и смещения, затем снимают чашку и закрывают крышкой. Место отбора проб очищается от остатков питательной среды и дезинфицируется 76%-ным раствором этилового спирта.

Для проведения испытания методом смывов подготавливают стерильные трафареты площадью 50 см<sup>2</sup>, 10 см<sup>3</sup> стерильного фосфатного буферного раствора в пробирке с ватным тампоном (или 10 см<sup>3</sup> стерильного фосфатного буферного раствора в пробирке и марлевую салфетку).

Трафарет изготавливают из проволоки, после каждого смыва и перед употреблением прожигают над пламенем горелки.

В день взятия смыва в пробирку с ватным тампоном наливают 10 см<sup>3</sup> стерильного фосфатного буферного раствора так, чтобы ватный тампон находился над уровнем жидкости. Марлевые салфетки 5×5 см заворачивают по одной в бумагу, к каждой салфетке готовят заранее пробирку с 10 см<sup>3</sup> стерильного фосфатного буферного

раствора в пробирке. Непосредственно перед взятием смыва пробирку наклоняют, увлажняя находящийся в ней тампон. Салфетки в случае их применения захватывают кончиком стерильного пинцета, прокаленного над пламенем горелки, и увлажняют буферным раствором из пробирки.

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. Тампон после процедуры смыва помещают во флакон с 10 см<sup>3</sup> фосфатного буферного раствора, интенсивно встряхивают в течение 2–3 мин и используют жидкость из флакона для посева на питательные среды:

- 1 см<sup>3</sup> для посева в чашку Петри с агаризованной средой на основе гидролизата казеина и соевых бобов (либо средой № 1) для контроля бактериальной микробиоты;

- 1 см<sup>3</sup> для посева в чашку Петри с декстрозным агаром Сабуро (либо средой № 2) для контроля грибной микробиоты;

- 2 см<sup>3</sup> для проведения испытания на наличие бактерий семейства Enterobacteriaceae;

- 2 см<sup>3</sup> для проведения испытания на наличие бактерий *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

Контроль бактериальной и грибной микробиоты ведут с использованием метода глубинного посева. В чашку Петри вносят 1 см<sup>3</sup> испытуемого образца, 15–20 см<sup>3</sup> подходящей агаризованной среды, расплавленной и охлажденной до температуры не более 45°C. После застывания среды чашки Петри переворачивают и инкубируют при 30–35°C в течение 5 сут (для контроля бактериальной микробиоты) и при 20–25°C 5–7 сут. Устанавливают количество жизнеспособных микроорганизмов в 1 см<sup>3</sup> смыва, КОЕ/см<sup>3</sup>. Рассчитывают количество микроорганизмов в 10 см<sup>3</sup> смыва, соответствующее общему числу микроорганизмов, находящихся на той площади, с которой произведен смыв (для этого величину, соответствующую количеству микроорганизмов в 1 см<sup>3</sup> смыва, умножают на 10).

Для каждой из обнаруженных микробных культур подтверждают отсутствие способности образовывать споровые формы. Эндоспоры образуют грамположительные бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*, конидии и спорангии споры формируют мицелиальные грибы. Микроорганизмы из этих групп обычно образуют колонии

на полноценной питательной среде для бактерий. Для установления способности к спорообразованию у культур изучают морфологию колоний, микроскопируют фиксированный мазок после окрашивания по Граму и (или) дифференциального окрашивания спор при увеличении  $\times 900$ .

Порядок проведения испытания на наличие бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* приведены в подразд. 3.6. В рамках данной лабораторной работы может быть использован упрощенный вариант идентификационных испытаний или идентификация может не проводиться. Упрощенный вариант включает описание колоний (характеризуют их диаметр, форму, край, поверхность, цвет, консистенцию) и микроорганизмов на основании результатов микроскопирования: характеризуют морфологию, результат окраски по Граму, спорообразование.

**Учет результатов.** Подсчитывают колонии на чашках, определяют содержание жизнеспособных клеток микроорганизмов в разности «КОЕ на 25 см<sup>2</sup> поверхности».

### **2.5.2. Микробиологический контроль одежды и рук персонала методом смывов**

**Проведение анализа.** Для проведения испытания контактным методом используют контактные чашки (либо пластины, либо полоски) известной площадью (25 см<sup>2</sup>) с подходящими агаризованными средами для обнаружения бактерий и грибов. Контактный метод используют по окончании производственного процесса. Контактную чашку открывают, отпечатки пальцев каждой руки отдельно ставят на поверхность плотной среды в чашке Петри, осуществляя легкие скользящие движения по поверхности, затем чашку закрывают крышкой. Место отбора проб очищается от остатков питательной среды и дезинфицируется 76%-ным раствором этанола.

Для осуществления контроля методом смывов подготавливают 10 см<sup>3</sup> стерильного фосфатного буферного раствора с ватным тампоном (или 10 см<sup>3</sup> стерильного фосфатного буферного раствора в пробирке и марлевую салфетку). Протирают стерильным увлажненным тампоном или салфеткой руку с обеих сторон, используя по одному тампону на каждую руку. Сначала протирают кожу левой, а затем правой руки (от участков с меньшей к участкам с большей загрязненностью): тыльная часть кисти, поверхность ладони,

межпальцевые пространства, ногтевые ложа. Тампон после процедуры смыва помещают в ту же пробирку с 10 см<sup>3</sup> фосфатного буферного раствора, интенсивно встряхивают и используют жидкость из флакона для высева на питательные среды, описанного в п. 2.5.1.

**Учет результатов.** Подсчитывают колонии на чашках, определяют содержание жизнеспособных клеток микроорганизмов в размерности «КОЕ на 25 см<sup>2</sup> поверхности».

### **2.5.3. Микробиологический контроль воздуха рабочих помещений седиментационным методом**

**Проведение анализа.** Контроль воздушной среды осуществляют с использованием четырех чашек Петри, две – с агаризованной средой на основе гидролизата казеина и соевых бобов (либо средой № 1) для учета количества бактерий, еще две – с декстрозным агаром Сабуро (либо средой № 2) для учета количества грибов.

Для контроля воздушной среды седиментационным методом чашки Петри устанавливают в контрольной точке (недалеко от зоны работы), снимают крышки и кладут их внутренней стороной на рабочую поверхность, тыльной стороной вверх. Через 20 мин или по окончании работы отбор пробы воздуха прекращают, чашки закрывают и помещают для инкубирования в суховоздушный термостат при 30–35°C (для культивирования бактерий) и 20–25°C (для культивирования грибов) соответственно на 5 сут.

Приводят описание одной или нескольких колоний с каждой чашки (характеризуют их диаметр, форму, край, поверхность, цвет, консистенцию), дают описание клеток микроорганизмов на основании результатов микроскопирования (характеризуют форму клеток, отмечают наличие или отсутствие спорообразования, относят к грамположительным или грамотрицательным в случае изучения клеток бактерий).

**Учет результатов.** Подсчитывают количество колоний на чашках, определяют количество жизнеспособных клеток, осевших на поверхность питательной среды в единицу времени на каждую чашку Петри.

### 3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

#### 3.1. Принципы нормирования микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств и фармацевтических субстанций для их производства

Нестерильные лекарственные средства и исходное сырье (в том числе фармацевтические субстанции) испытывают на микробиологическую чистоту, включающую определение общего количества жизнеспособных аэробных микроорганизмов (мезофильных бактерий и грибов, способных расти в аэробных условиях) и проверку на наличие специфических организмов. Допустимое содержание их в нестерильных лекарственных средствах и фармацевтических субстанциях зависит от лекарственной формы и пути введения препарата (табл. 9 и 10).

Таблица 9

#### Критерии приемлемости для микробиологической чистоты фармацевтических субстанций для производства нестерильных лекарственных средств

| Тип субстанции                                                                                                                                                                                                               | Общее кол-во аэробов, КОЕ/г (КОЕ/см <sup>3</sup> ), не более | Общее кол-во грибов, КОЕ/г (КОЕ/см <sup>3</sup> ), не более | Специфические микроорганизмы                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Фармацевтические субстанции синтетического происхождения для производства нестерильных лекарственных средств и вспомогательные вещества                                                                                      | 10 <sup>3</sup>                                              | 10 <sup>2</sup>                                             | <i>E. coli</i> – отсутствие в 1 г (1 см <sup>3</sup> )                                                                                                                                                                                                                                    |
| Субстанции для фармацевтического использования для производства лекарственных средств, в которых лимитируется содержание <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> и бактерий семейства Enterobacteriaceae | 10 <sup>3</sup>                                              | 10 <sup>2</sup>                                             | <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , бактерии рода <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> – отсутствие в 1 г (1 см <sup>3</sup> ), грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, либо бактерий семейства Enterobacteriaceae – не более 10 <sup>2</sup> КОЕ в 1 г (1 см <sup>3</sup> ) |

| Тип субстанции                                                                                                                                                                   | Общее кол-во аэробов, КОЕ/г (КОЕ/см <sup>3</sup> ), не более | Общее кол-во грибов, КОЕ/г (КОЕ/см <sup>3</sup> ), не более | Специфические микроорганизмы                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Субстанции для фармацевтического использования природного происхождения (растительного, животного, минерального), для которых предварительная антимикробная обработка невозможна | Более 10 <sup>3</sup> , но не более 10 <sup>4</sup>          | 10 <sup>2</sup>                                             | <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> – отсутствие в 1 г (1 см <sup>3</sup> ); <i>Salmonella</i> – отсутствие в 10 г (10 см <sup>3</sup> ); грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, либо бактерий семейства Enterobacteriaceae – не более 10 <sup>2</sup> КОЕ в 1 г (1 см <sup>3</sup> ) |

Таблица 10

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

| Способ применения                                                                                                                                       | Общее кол-во аэробов, КОЕ/г (КОЕ/см <sup>3</sup> ), не более | Общее кол-во грибов, КОЕ/г (КОЕ/см <sup>3</sup> ), не более | Специфические микроорганизмы                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Внутреннее применение:<br>– неводные лекарственные средства;<br>– водные лекарственные средства                                                         | 10 <sup>3</sup><br>10 <sup>2</sup>                           | 10 <sup>2</sup><br>10 <sup>1</sup>                          | <i>E. coli</i> – отсутствие в 1 г (1 см <sup>3</sup> )                                                    |
| Для использования на слизистой оболочке ротовой полости, десенного использования, кожного использования, назального использования, ушного использования | 10 <sup>2</sup>                                              | 10 <sup>1</sup>                                             | <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> – отсутствие в 1 г (1 см <sup>3</sup> )                           |
| Трансдермальный (на 1 пластырь, включая клейкую поверхность и подложку)                                                                                 | 10 <sup>2</sup>                                              | 10 <sup>1</sup>                                             | <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> – отсутствие в 1 г (1 см <sup>3</sup> )                           |
| Вагинальный                                                                                                                                             | 10 <sup>2</sup>                                              | 10 <sup>1</sup>                                             | <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> – отсутствие в 1 г (1 см <sup>3</sup> ) |
| Ректальный                                                                                                                                              | 10 <sup>3</sup>                                              | 10 <sup>2</sup>                                             | –                                                                                                         |

| Способ применения                                                                                                                                                                                                | Общее кол-во аэробов, КОЕ/г (КОЕ/см <sup>3</sup> ), не более | Общее кол-во грибов, КОЕ/г (КОЕ/см <sup>3</sup> ), не более | Специфические микроорганизмы                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ингаляционный                                                                                                                                                                                                    | 10 <sup>2</sup>                                              | 10 <sup>1</sup>                                             | <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, либо бактерий семейства Enterobacteriaceae при испытании в соответствии с альтернативной методикой определения – отсутствие в 1 г (1 см <sup>3</sup> )                                                                                                                 |
| Специальные меры предосторожности фармакопей для готовых лекарственных средств для орального применения, в состав которых входят фармацевтические субстанции и вспомогательные вещества природного происхождения | 10 <sup>4</sup>                                              | 10 <sup>2</sup>                                             | Грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, либо бактерий семейства Enterobacteriaceae при испытании в соответствии с альтернативной методикой определения – не более 10 <sup>2</sup> КОЕ в 1 г (1 см <sup>3</sup> ), <i>Salmonella</i> – отсутствие в 10 г (10 см <sup>3</sup> ), <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> – отсутствие в 1 г (1 см <sup>3</sup> ) |

Методы испытания для определения соответствия требованиям спецификации по микробиологической чистоте изложены в Государственной Фармакопее Республики Беларусь (изд. II, Т. 1, 2012 г.).

### 3.2. Перечень и условия культивирования тест-организмов, используемых при микробиологическом контроле лекарственных средств

В качестве тест-микроорганизмов для микробиологического контроля лекарственных средств используют коллекционные штаммы аэробных бактерий (*S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*),

анаэробных бактерий (*Clostridium sporogenes*), дрожжеподобных (*C. albicans*) и мицелиальных (*Aspergillus brasiliensis*) грибов.

Применяется техника сохранения эталонного банка культур микроорганизмов таким образом, чтобы живые микроорганизмы, использованные для инокуляции, были удалены не более чем на 5 пересевов от оригинального контрольного банка культур микроорганизмов.

Суспензии вегетативных клеток и спор тест-микроорганизмов используют для проверки ростовых свойств сред. Для приготовления испытуемой суспензии применяют забуференный раствор натрия хлорида и пептона pH 7,0 или фосфатный буферный раствор pH 7,2; для суспендирования спор *A. brasiliensis* в буфер может быть добавлен полисорбат 80 в количестве 0,05%. Суспензии используют в течение 2 ч или, при условии хранения при температуре от 2 до 8°C, в течение 24 ч. В качестве альтернативы приготовлению и последующему разведению свежей суспензии вегетативных клеток *A. brasiliensis* или *B. subtilis* готовят стабильную суспензию спор и затем необходимый объем приготовленной суспензии используют для инокуляции. Стабильная суспензия спор может храниться при температуре от 2 до 8°C в течение валидированного периода времени.

### **3.3. Питательные среды для обнаружения и идентификации специфических микроорганизмов-контаминантов лекарственных средств**

Нижеописанные растворы и питательные среды удовлетворяют целям, для которых они предназначены в фармакопейном испытании на микробную контаминацию. Могут быть использованы и другие среды при условии, что их пригодность может быть доказана. Если не указано иное, то среды и растворы стерилизуют автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин.

Обогащительный бульон Мосселя для энтеробактерий: панкреатический гидролизат желатина – 10,0 г, глюкоза моногидрат – 5,0 г, дегидратированная бычья желчь – 20,0 г, калия дигидрофосфат – 3,0 г, динатрия гидрофосфата дигидрат – 8,0 г, бриллиантовый зеленый – 15 мг, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH после стерилизации – 7,2.

Бульон Мосселя нагревают при температуре 100°C в течение 30 мин и немедленно охлаждают.

Агаризованная среда с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью: дрожжевой экстракт – 3,0 г, панкреатический гидролизат желатина – 7,0 г, соли желчных кислот – 1,5 г, натрия хлорид – 5,0 г, глюкоза моногидрат – 10,0 г, агар – 15,0 г, нейтральный красный – 30 мг, кристаллический фиолетовый – 2 мг, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН после стерилизации – 7,4. Нагревают до кипения, не автоклавируют.

Бульон Макконки: панкреатический гидролизат желатина – 20,0 г, лактоза моногидрат – 10,0 г, дегидратированная бычья желчь – 5,0 г, бромкрезоловый пурпурный – 10 мг, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН после стерилизации – 7,3. Стерилизуют в автоклаве.

Агаризованная среда Макконки: панкреатический гидролизат желатина – 17,0 г, пептоны (мясной и казеиновый) – 3,0 г, лактоза моногидрат – 10,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, соли желчных кислот – 1,5 г, агар – 13,5 г, нейтральный красный – 30 мг, кристаллический фиолетовый – 1 мг, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН после стерилизации – 7,3. Кипятят в течение 1 мин при постоянном встряхивании, затем стерилизуют в автоклаве.

Обогащительный питательный бульон Раппапорта – Вассилиадиса для *Salmonella*: соевый пептон – 4,5 г, магния хлорид гексагидрат – 29,0 г, дикалия гидрофосфат – 0,4 г, калия дигидрофосфат – 0,6 г, малахитовый зеленый – 36 мг, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН после стерилизации – 5,2. Растворяют при осторожном нагревании, затем стерилизуют в автоклаве при температуре не более 115°C.

Агаризованная среда на основе ксилозы, лизина, дезоксихолата: ксилоза – 3,5 г, L-лизин – 5,0 г, лактоза моногидрат – 7,5 г, сахароза – 7,5 г, натрия хлорид – 5,0 г, дрожжевой экстракт – 3,0 г, феноловый красный – 80 мг, агар – 13,5 г, натрия дезоксихолат – 2,5 г, натрия тиосульфат – 6,8 г, железа (III) аммония цитрат – 0,8 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН после стерилизации – 5,2. Нагревают до кипения, охлаждают до температуры 50°C и разливают по чашкам Петри. Не автоклавируют.

Агаризованная среда на основе цетримиды: панкреатический гидролизат желатина – 20,0 г, магния хлорид – 1,4 г, калия сульфат – 10,0 г, цетримид – 0,3 г, агар – 13,6 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>, глицерин – 10,0 см<sup>3</sup>; рН после стерилизации – 7,2. Нагревают

до кипения и кипятят в течение 1 мин при встряхивании, затем стерилизуют в автоклаве.

Агаризованная среда на основе маннита и соли: панкреатический гидролизат казеина – 5,0 г, пепсиновый гидролизат животных тканей – 5,0 г, говяжий экстракт – 1,0 г, D-маннит – 10,0 г, натрия хлорид – 75,0 г, агар – 15,0 г, феноловый красный – 25 мг, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH после стерилизации – 7,4. Нагревают до кипения и кипятят в течение 1 мин при встряхивании, затем стерилизуют в автоклаве.

Обогащенная питательная среда для клостридий: говяжий экстракт – 10,0 г, пептон – 10,0 г, дрожжевой экстракт – 3,0 г, растворимый крахмал – 1,0 г, глюкоза моногидрат – 5,0 г, цистеина гидрохлорид – 0,5 г, натрия хлорид – 5,0 г, натрия ацетат – 3,0 г, агар – 0,5 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH после стерилизации – 6,8. Агар замачивают, растворяют при нагревании до кипения при постоянном перемешивании. Стерилизуют в автоклаве.

Колумбийский агар: панкреатический гидролизат казеина – 10,0 г, пепсиновый гидролизат мяса – 5,0 г, панкреатический гидролизат сердца – 3,0 г, дрожжевой экстракт – 5,0 г, кукурузный крахмал – 1,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, агар, в зависимости от гелеобразующей способности – 10,0–15,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH после стерилизации – 7,3. Агар замачивают, растворяют при нагревании до кипения при постоянном перемешивании. Стерилизуют в автоклаве. Охлаждают до температуры 45–50°C и при необходимости прибавляют гентамицина сульфат в количестве, соответствующем 20 мг основания гентамицина; разливают по чашкам Петри.

Кроме описанных выше сред, в некоторых испытаниях могут использоваться следующие альтернативные питательные среды и реактивы, для удобства они были помечены номерами 1–15.

Фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном (1/15 моль): калия дигидрофосфат – 3,56 г, динатрия гидрофосфат дигидрат – 7,23 г, натрия хлорид – 4,3 г, пептон ферментативный сухой – 1,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH после стерилизации – 7,2. Компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве.

Нейтрализующая жидкость: полисорбат 80–30 г, лецитин яичный – 3 г, гистидина гидрохлорид – 1 г, пептон (мясной или казеиновый) – 1 г, натрия хлорид – 4,3 г, калия дигидрофосфат – 3,6 г, динатрия гидрофосфат дигидрат – 7,2 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>.

Если нейтрализующая способность раствора недостаточна, концентрация полисорбата 80 или лецитина может быть увеличена. Стерилизуют в автоклаве.

Среда № 3 (среда обогащения для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*): пептон ферментативный сухой – 10,0 г, калия дигидрофосфат – 2,5 г, динатрия гидрофосфат дигидрат – 7,5 г, глюкоза моногидрат – 10,0 г, феноловый красный – 80 мг, малахитовый зеленый – 15 мг, мясная вода – до 1 дм<sup>3</sup>; pH после стерилизации – 7,3. Пептон и соли растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, прибавляют 8 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора фенолового красного и 3 см<sup>3</sup> 0,5%-ного раствора малахитового зеленого, кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве.

Среда № 4 (для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, агар Эндо): панкреатический гидролизат рыбной муки – 12,0 г, экстракт пекарных дрожжей – 1,0 г, натрия хлорид – 3,4 г, натрия сульфит безводный – 0,8 г, динатрия гидрофосфат дигидрат – 0,5 г, лактоза моногидрат – 10,0 г, фуксин основной – 0,2 г, агар – 15,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH стерильной среды – 7,4. Все компоненты размешивают в воде очищенной, нагревают до полного расплавления агара и кипятят в течение 2–3 мин. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, снова нагревают до момента закипания. Охлаждают до температуры от 45 до 50°C и разливают в чашки Петри.

Среда № 5 (для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, висмутсульфитный агар): панкреатический гидролизат мяса – 10,0 г, динатрия гидрофосфат дигидрат – 3,68 г, натрия хлорид – 2,6 г, натрия карбонат – 0,65 г, висмута цитрат – 2,38 г, железа (II) аммония сульфат – 0,97 г, глюкоза моногидрат – 3,9 г, бриллиантовый зеленый – 28 мг, агар – 15,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH стерильной среды – 7,6. Все компоненты размешивают в воде очищенной, нагревают до полного расплавления агара и кипятят в течение 3–5 мин. Охлаждают до температуры от 45 до 50°C и разливают в чашки Петри.

Среда № 6 (для определения ферментации глюкозы, среда Гисса): пептон ферментативный сухой – 10,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, глюкоза моногидрат – 40,0 г, феноловый красный – 80 мг, мясная вода – до 1 дм<sup>3</sup>, pH стерильной среды 7,2. Пептон и натрия хлорид растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, прибавляют 8 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора фенолового красного, кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр

и разливают в пробирки с поплавками по 4–5 см<sup>3</sup>. Стерилизуют в автоклаве, по окончании стерилизации быстро охлаждают.

Среда № 7 (питательная основа для постановки реакции с реактивом Грисса при определении восстановления нитратов в нитриты): пептон ферментативный сухой – 5,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, калия нитрат – 1,5 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН стерильной среды – 7,2. Все компоненты растворяют в воде, очищенной при нагревании, кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по 4–5 см<sup>3</sup>. Стерилизуют в автоклаве.

Среда № 8 (среда обогащения для *P. aeruginosa* и *S. aureus*): пептон ферментативный сухой – 10,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, дикалия гидрофосфат – 2,5 г, глюкоза моногидрат – 2,5 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН стерильной среды – 7,3. Пептон и соли растворяют в воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве.

Среда № 9 (для выявления пигмента пиоцианина): пептон ферментативный сухой – 20,0 г, магния хлорид безводный – 1,4 г, калия сульфат безводный – 10,0 г, глицерин – 10,0 см<sup>3</sup>, агар – 15,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН стерильной среды – 7,3. Пептон и соли растворяют в воде очищенной. Затем вносят глицерин, растворяют при нагревании, кипятят в течение 1 мин, прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют в автоклаве.

Среда № 10 (для идентификации *S. aureus* по способности ферментировать маннит и давать рост при высокой концентрации хлорида натрия): пептон ферментативный сухой – 10,0 г, натрия хлорид – 75,0 г, D-маннит – 10,0 г, феноловый красный – 25 мг, агар – 15,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН стерильной среды – 7,4. Все компоненты растворяют в воде очищенной, прибавляют 2,5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора фенолового красного, кипятят в течение 1 мин, прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют в автоклаве.

Среда № 11 (для предварительного обогащения бактерий семейства Enterobacteriaceae, лактозный бульон без индикатора): пептон ферментативный сухой – 8,0 г, лактоза моногидрат – 5,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; рН стерильной среды – 6,9. Все компоненты растворяют в воде, очищенной при нагревании, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве.

Среда № 12 (для накопления и выделения бактерий рода *Salmonella*, селенитовая среда): панкреатический гидролизат казеина – 5,26 г, лактоза моногидрат – 6,23 г, динатрия гидрофосфат дигидрат – 6,23 г, натрия гидроселенит (без теллура) – 4,21 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH стерильной среды – 7,5. Все компоненты тщательно размешивают в 1 дм<sup>3</sup> воды очищенной. Колбу закрывают ватной пробкой, быстро доводят до кипения (до образования пузырьков) и сразу прекращают нагрев.

Среда № 13 (для выявления сероводорода и определения ферментации лактозы, глюкозы и сахарозы; трехсахарный агар с солями железа): мясной экстракт – 3,0 г, дрожжевой экстракт – 3,0 г, пептон – 20,0 г, лактоза моногидрат – 10,0 г, сахароза – 10,0 г, глюкоза моногидрат – 1,0 г, железа (II) сульфат – 0,2 г, натрия хлорид – 5,0 г, натрия тиосульфат – 0,3 г, феноловый красный – 24 мг, агар – 15,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH стерильной среды – 7,3. Все компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Среду разливают в пробирки по 7 см<sup>3</sup>, стерилизуют в автоклаве, при охлаждении скашивают, оставляя столбик высотой 2,5–3,0 см.

Среда № 14 (для определения утилизации натрия цитрата, цитратный агар Симмонса): натрия хлорид – 5,0 г, магния сульфат – 0,2 г, аммония дигидрофосфат – 1,0 г, дикалия гидрофосфат – 1,0 г, натрия цитрат – 3,0 г, бромтимоловый синий – 80 мг, агар – 20,0 г, вода очищенная – до 1 дм<sup>3</sup>; pH стерильной среды – 7,2. Соли растворяют в воде очищенной, вносят агар и нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, прибавляют 40 см<sup>3</sup> 0,2%-ного водного раствора бромтимолового синего. Среду разливают в пробирки по 5–7 см<sup>3</sup>, стерилизуют в автоклаве, при охлаждении скашивают, оставляя столбик высотой 2,0–2,5 см.

Среда № 15 (для определения индола, бульон Хоттингера): натрия хлорид – 5,0 г, дикалия гидрофосфат – 1,0 г, раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 1200–1400 мг/л – до 1 дм<sup>3</sup>; pH стерильной среды – 7,5. Гидролизат Хоттингера разводят водой до содержания в среде 1200–1400 мг/л аминного азота, прибавляют соли, кипятят в течение 15 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве.

1%-ный раствор фенолового красного: 1,0 г фенолового красного растирают в ступке, прибавляя небольшими порциями 0,1 М раствор натрия гидроксида. Полученный раствор переносят в мерную

колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят объем раствора до метки водой очищенной. Хранят во флаконе из нейтрального стекла при температуре от 4 до 10°C в защищенном от света месте.

0,5%-ный раствор малахитового зеленого: 0,5 г малахитового зеленого растворяют в горячей стерильной воде очищенной и доводят до объема 100 см<sup>3</sup> этим же растворителем. Раствор выдерживают в термостате в течение 1 сут, периодически перемешивая.

Реактив Грисса: раствор № 1: 0,5 г кислоты сульфаниловой растворяют в 30 см<sup>3</sup> кислоты уксусной ледяной, прибавляют 100 см<sup>3</sup> воды очищенной, фильтруют.

Раствор № 2: 0,1 г нафтиламина растворяют в 100 см<sup>3</sup> кипящей воды очищенной, охлаждают, прибавляют 30 см<sup>3</sup> кислоты уксусной ледяной, фильтруют.

Перед употреблением смешивают равные объемы растворов № 1 и № 2.

Реактив на цитохромоксидазу: раствор № 1: 1%-ный раствор  $\alpha$ -нафтола в 96%-ном этаноле.

Раствор № 2: 1%-ный раствор N, N-диметил-п-фенилендиамина дигидрохлорида.

Перед употреблением смешивают растворы № 1 и № 2 в соотношении 2 : 3.

Реактив Ковача: 5,0 г п-диметиламинобензальдегида растворяют в 75,0 г пентанола или изоамилового спирта при легком нагревании до 50–55°C (на водяной бане), охлаждают и медленно прибавляют 20,0 см<sup>3</sup> кислоты хлористоводородной. Раствор должен быть желтого цвета.

Реактив Эрлиха: 1,0 г п-диметиламинобензальдегида растворяют в 95 см<sup>3</sup> 96%-ного этанола и медленно прибавляют 20 см<sup>3</sup> кислоты хлористоводородной.

### **3.4. Контроль стерильности, ростовых и индикаторных свойств питательных сред**

Для контроля стерильности 5% флаконов приготовленных и простерилизованных питательных сред инкубируют в течение 14 сут в подходящих условиях (среды для культивирования бактерий при 30–35°C, для грибов при 20–25°C). Рост микроорганизмов наблюдаться не должен.

Испытание на ростовые свойства сред проводится в отношении аэробов, анаэробов и грибов. Проверке подвергают каждую партию готовой среды и каждую партию среды, приготовленной из обезвоженных составов или ингредиентов. Порции жидкой тиогликолевой среды инокулируют небольшим количеством (не более 100 КОЕ) микроорганизмов, используя отдельную порцию среды для каждого из следующих штаммов: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Cl. sporogenes*. Порции среды на основе гидролизата соевых бобов и казеина (или среды Сабуро) инокулируют небольшим количеством (не более 100 КОЕ) микроорганизмов, используя отдельную порцию среды для каждого из следующих штаммов: *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*. Инкубируют в течение не более 3 сут (при температуре от 30 до 35°C) в случае бактерий и не более 5 дней (при температуре от 20 до 25°C) в случае грибов. Жидкая среда пригодна, если обнаруживается отчетливо заметный рост микроорганизмов в сравнении с ростом, который был ранее получен с использованием ранее испытанной и утвержденной среды. Рост, обнаруживаемый на каждой агаризованной среде, не должен отличаться от значения, найденного для стандартизованного инокулята, более чем в 2 раза. Допускается использование альтернативных питательных сред, например, жидкой среды № 1 (мясо-пептонный бульон) и агаризованной среды № 1 – для приготовления тест-штаммов и определения общего количества аэробов (ОКА), жидкой среды № 2 и агаризованной среды № 2 – для приготовления тест-штаммов и определения общего количества грибов (ОКГ).

При испытании на специфические микроорганизмы контролируют ростовые, ингибирующие рост и индикаторные свойства всех используемых питательных сред. Например, при испытании на грам-отрицательные бактерии, толерантные к желчи, обогатительный питательный бульон Мосселя для энтеробактерий должен проявлять ростовые свойства в отношении *E. coli* и *P. aeruginosa* и ингибирующее в отношении *S. aureus*. При испытании на *P. aeruginosa* агар на основе цетримиды должен проявлять ростовые свойства в отношении *P. aeruginosa* и ингибирующее в отношении *E. coli*. Используемый в испытании на *S. aureus* агар на основе маннита и соли должен проявлять ростовое и индикаторное свойства в отношении *S. aureus* и ингибирующее в отношении *E. coli*.

### **3.5. Лабораторная работа**

#### **Контроль общего количества аэробов и грибов в нестерильных лекарственных средствах**

Общее количество жизнеспособных аэробов определяют методом мембранной фильтрации или методом чашечного подсчета (прямого посева). Метод наиболее вероятного числа (НВЧ) обычно является наименее точным методом микробиологических подсчетов, однако он может оказаться наиболее подходящим для некоторых групп продуктов с очень низкой бионагрузкой. Выбор метода определяется природой испытуемого образца и требуемым пределом содержания микроорганизмов.

**Цель работы:** оценка обсемененности образца нестерильного лекарственного средства или фармацевтической субстанции бактериальной и грибной микробиотой.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред и фосфатного буферного раствора (подразд. 2.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды, питательных сред и растворов, мембранных и бумажных фильтров. 3. Определение допустимого содержания жизнеспособных клеток бактерий и грибов в нестерильном лекарственном средстве или фармацевтической субстанции по табл. 9 и 10. 4. Подготовка образца лекарственного средства или субстанции к испытанию. 5. Проведение испытания на определение общего количества аэробов и грибов методом глубинного посева или методом мембранной фильтрации.

##### **3.5.1. Подготовка образца лекарственного средства или субстанции к испытанию**

От каждой серии лекарственного средства, субстанции, вспомогательного вещества отбирают пробу 10 г (или 10 см<sup>3</sup>) для каждого из разделов испытания. Чем больше масса взятого на анализ испытуемого образца, тем выше статистическая достоверность вывода об отсутствии патогенных микроорганизмов.

Водорастворимые продукты растворяют или разводят (1 : 10) в забуференном растворе хлорида натрия и пептона, рН 7,0,

в фосфатном буферном растворе, рН 7,2, или в бульоне на основе гидролизата казеина и соевого белка (соево-казеинового бульона). Дальнейшие разведения, при необходимости, готовят с помощью этого же разбавителя.

Нерастворимые в воде продукты, не относящиеся к жирам, суспендируют (в соотношении 1 : 10) в забуференном растворе хлорида натрия и пептона, рН 7,0, в фосфатном буферном растворе, рН 7,2, или в бульоне на основе гидролизата казеина и соевого белка (соево-казеинового бульона). Дальнейшие разведения, при необходимости, готовят с помощью этого же разбавителя. Для получения суспензии плохо смачиваемых веществ может быть добавлен ПАВ (1 г/дм<sup>3</sup> водного раствора полисорбата 80).

Жироподобный испытуемый продукт растворяют в изопропилмиристате, стерилизованном с помощью фильтрации, или смешивают с минимально необходимым количеством полисорбата 80 или иного неингибирующего стерильного ПАВ, нагретого при необходимости до температуры не более 45°C, аккуратно перемешивают и поддерживают температуру на водяной бане. Аккуратно перемешивают, поддерживая температуру в течение минимального времени, необходимого для получения эмульсии. Дальнейшие серийные разведения (10×) могут быть приготовлены с использованием выбранного стерильного растворителя, содержащего подходящую концентрацию полисорбата 80 или иного стерильного неингибирующего ПАВ.

Возможность обнаружения микроорганизмов-контаминантов в испытании в присутствии исследуемого 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.

В качестве нейтрализующего агента используют химические вещества неспецифического действия (табл. 11) 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.

Таблица 11

**Общие нейтрализующие агенты для мешающих веществ**

| Мешающее вещество                                                                       | Возможный метод нейтрализации          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Глутаровый альдегид, ртутьсодержащие вещества                                           | Натрия гидросульфит (натрия бисульфит) |
| Фенольные вещества, спирт, альдегиды, сорбат                                            | Разведение                             |
| Альдегиды                                                                               | Глицин                                 |
| Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), парагидроксibenзоаты (парабены), бисгуанидины | Лецитин                                |
| ЧАС, йод, парабены                                                                      | Полисорбат                             |
| Ртутьсодержащие вещества                                                                | Тиогликолят                            |
| Ртутьсодержащие вещества, галогены, альдегиды                                           | Тиосульфат                             |
| Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)                                                          | Ионы магния и кальция                  |

Для нейтрализующих агентов должна быть продемонстрирована их эффективность и нетоксичность в отношении микроорганизмов.

### 3.5.2. Определение общего количества аэробов и грибов методом глубинного посева

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C, водяной термостат на температурный режим 45°C.

**Питательные среды и реактивы:** агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (альтернативно среда № 1), декстрозный агар Сабуро (альтернативно среда № 2).

**Проведение анализа.** В две чашки Петри вносят по 1 см<sup>3</sup> подготовленного к испытанию лекарственного средства (п. 3.5.1), 15–20 см<sup>3</sup> агаризованной среды на основе гидролизата казеина и соевых бобов или среды № 1 с температурой не более 45°C, по 2 чашки Петри для каждого уровня разведения. После застывания среды чашки

Петри переворачивают и инкубируют 5 сут при 30–35°C. Через 2 сут и окончательно через 5 сут отбирают чашки Петри, соответствующие уровню разведения с максимальным количеством колоний менее 250 для определения общего количества аэробов. Рассчитывают среднее арифметическое значение числа колоний на двух чашках и определяют количество жизнеспособных клеток в размерности КОЕ/г (или КОЕ/см<sup>3</sup>).

В две чашки Петри вносят по 1 см<sup>3</sup> подготовленного к испытанию лекарственного средства, 15–20 см<sup>3</sup> декстрозного агара Сабуро или среды № 2 с температурой не более 45°C, по 2 чашки Петри для каждого уровня разведения. Если из-за микробного роста ожидается превышение предельных значений общего количества грибов, допускается использование декстрозного агара Сабуро или среды № 2, содержащей антибиотика. После застывания среды чашки Петри переворачивают и инкубируют 5–7 сут при 20–25°C. Через 3 сут и окончательно через 5–7 сут отбирают чашки Петри с количеством колоний менее 50 для определения общего количества грибов. Рассчитывают среднее арифметическое значение числа колоний на двух чашках и определяют количество жизнеспособных клеток в размерности КОЕ/г (или КОЕ/см<sup>3</sup>).

**Учет результатов.** Общее количество аэробов считается равным числу КОЕ, найденному с использованием агаризованной среды на основе гидролизата казеина и соевого белка (соево-казеиновый агар) или среды № 1. Если на этой среде обнаруживаются колонии грибов, они рассчитываются как часть общего количества аэробов.

Общее количество грибов считается равным числу КОЕ, найденному с использованием агаризованной среды на основе декстрозного агара Сабуро или среды № 2. Если на этой среде обнаруживаются колонии бактерий, они рассчитываются как часть общего количества грибов.

Если при испытании образца методом посева на чашки при разведении 1 : 10 не выявлен рост микроорганизмов на чашках, результаты отмечают: «В 1 г или см<sup>3</sup> лекарственного средства (исходных материалов) общее количество аэробов (грибов) менее 10».

Допустимые критерии приемлемости микробиологической чистоты интерпретируют:

- 10<sup>1</sup> КОЕ: максимально допустимое количество 20;
- 10<sup>2</sup> КОЕ: максимально допустимое количество 200;
- 10<sup>3</sup> КОЕ: максимально допустимое количество 2000 и т. д.

### 3.5.3. Определение общего количества аэробов и грибов методом мембранной фильтрации

Используется для субстанций и лекарственных средств, в отношении которых есть указание в нормативной документации. Фильтры из нитрата целлюлозы применяют для водных, масляных и для разбавленных спиртовых растворов, а из ацетата целлюлозы – для растворов с высоким содержанием спирта, для испытания антибиотиков применяют специальные фильтры с гидрофобным краем. Диаметр пор – 0,45 мкм. Используют фильтрующие системы открытого типа. Аппарат для фильтрации и мембранные фильтры обязательно стерилизуют подходящим образом. Конструкция должна обеспечивать возможность извлечения мембраны для переноса ее на поверхность плотной питательной среды.

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C, суховоздушный термостат на температурный режим 20–25°C, установка мембранной фильтрации открытого типа.

**Питательные среды и реактивы:** агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (альтернативно среда № 1), декстрозный агар Сабуро (альтернативно среда № 2), раствор для промывки мембраны (подразд. 2.3).

**Проведение анализа.** Перед проведением испытания образец готовят по стандартной процедуре так, чтобы на фильтр нанести 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) испытуемого средства (п. 3.5.1). Если ожидают выявления концентрации микроорганизмов более 10<sup>2</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> (или 10<sup>2</sup> КОЕ/г), то допускается сделать высев разбавленной подготовленной пробы. Установку для фильтрования подготавливают так, как описано в подп. 1.4.3.1. Аликвоты образца, подготовленного к испытанию лекарственного средства объемом 10 см<sup>3</sup> (либо количество, соответствующее 1 г (1 см<sup>3</sup>)), переносят на два мембранных фильтра, фильтруют, промывают каждый фильтр путем пропускания через него некоторого объема выбранного растворителя (раствора для промывки мембраны). Число циклов промывки должно быть не более 5 из расчета по 100 см<sup>3</sup> на фильтр. Помещают фильтр с задержанными на нем микроорганизмами на чашки с соответствующими питательными средами и инкубируют в подходящих условиях. Для определения общего количества жизнеспособных аэробов первый фильтр переносят на чашку Петри с агаризованной средой на основе гидролизата казеина и соевого белка или на среду № 1. Инкубируют

2 и 5 сут при 30–35°C. Второй фильтр, предназначенный для определения общего количества грибов, переносят на чашку Петри с декстрозным агаром Сабуро или на среду № 2. Инкубируют 3 и 5–7 сут при 20–25°C.

**Учет результатов.** Подсчитывают количество колоний, далее определяют концентрацию жизнеспособных клеток микроорганизмов в лекарственном средстве, сравнивают ее с требованиями, представленными в табл. 9 и 10.

Если при испытании образца методом мембранной фильтрации при разведении 1 : 10 не выявлен рост микроорганизмов на мембранном фильтре, результаты отмечаются следующим образом: «В 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) лекарственного средства (исходных материалов) общее количество аэробов (грибов) не выявлено».

### **3.6. Лабораторная работа**

#### **Испытание на наличие специфических микроорганизмов в нестерильных лекарственных средствах**

В перечень специфических микроорганизмов входят грамотрицательные бактерии, толерантные к желчи (бактерии семейства *Enterobacteriaceae*), бактерии рода *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli*.

**Цель работы:** оценка обсемененности образца нестерильного лекарственного средства или фармацевтической субстанции специфическими микроорганизмами.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред (подразд. 2.3, 3.3), фосфатного буферного раствора (подразд. 2.3) и реактивов (подразд. 3.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды, питательных сред и растворов, мембранных и бумажных фильтров. 3. Определение допустимого содержания специфических микроорганизмов в нестерильном лекарственном средстве или фармацевтической субстанции по табл. 9 и 10. 4. Подготовка образца лекарственного средства или субстанции к испытанию (п. 3.5.1). 5. Проведение испытания на определение специфических микроорганизмов методом глубинного посева или методом мембранной фильтрации.

### **3.6.1. Испытание на наличие грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи**

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 25°C, суховоздушный термостат на температурный режим 35°C.

**Питательные среды и реактивы:** бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов (подразд. 2.3), обогатительный питательный бульон Моссея для энтеробактерий, агаризованная среда с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью (подразд. 3.3).

#### **Проведение анализа**

**Приготовление образца и предварительное инкубирование.** Готовят образец разведением 1 к 10 из 1 г испытуемого продукта, используя бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов в качестве разбавителя, перемешивают и инкубируют при температуре 20–25°C в течение времени, достаточного для оживления бактерий, но недостаточного для увеличения числа организмов (обычно 2 ч, но не более 5 ч).

**Испытание на отсутствие бактерий.** Подготовленный к испытанию образец, соответствующий 1 г лекарственного средства, используется для инокуляции 100 см<sup>3</sup> обогатительного питательного бульона Моссея для энтеробактерий, посевы инкубируют при 30–35°C в течение 1–2 сут. Затем делают пересев петлей на чашку Петри с агаризованной средой с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью, посев инкубируют при 30–35°C в течение 18–24 ч. Продукт выдерживает испытание, если рост не наблюдается.

**Количественное испытание. Селекция и пересев.** Инокулируют подходящие количества обогатительного питательного бульона Моссея для энтеробактерий подготовленным образцом или его разбавлениями, содержащими соответственно 0,1 г, 0,01 г и 0,001 г (или 0,1 см<sup>3</sup>, 0,01 см<sup>3</sup> и 0,001 см<sup>3</sup>) испытуемого продукта. Инкубируют при температуре 30–35°C в течение 24–48 ч. Каждую из культур пересевают на чашку с агаризованной средой с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью. Инкубируют при температуре 30–35°C в течение 18–24 ч.

**Учет результатов.** Рост колоний свидетельствует о положительном результате. Отмечают наименьшее количество продукта, которое дает положительный результат, и наибольшее количество,

которое дает отрицательный результат. Вероятное количество бактерий определяют по табл. 12.

Таблица 12

**Результаты для каждого количества продукта**

| 0,1 г/см <sup>3</sup> | 0,01 г/см <sup>3</sup> | 0,001 г/см <sup>3</sup> | Вероятное количество бактерий в 1 г (1 см <sup>3</sup> ) продукта |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| +                     | +                      | +                       | Более 10 <sup>3</sup>                                             |
| +                     | +                      | –                       | Менее 10 <sup>3</sup> , но более 10 <sup>2</sup>                  |
| +                     | –                      | –                       | Менее 10 <sup>2</sup> , но более 10 <sup>1</sup>                  |
| –                     | –                      | –                       | Менее 10                                                          |

*Примечание:* «+» – наличие роста бактерий; «–» – отсутствие роста бактерий.

В качестве альтернативного испытания допускается определение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и других микроорганизмов (например, родов *Aeromonas*, *Pseudomonas*), как указано ниже.

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 35°C.

**Питательные среды и реактивы:** агаризованная среда № 1 (подразд. 2.3), жидкая среда № 11, жидкая среда № 3, агаризованная среда № 4, жидкая среда № 6, жидкая среда № 7, реактив Грисса, реактивы для теста на цитохромоксидазу (подразд. 3.3), стерильное вазелиновое масло.

### **Проведение анализа**

**Приготовление образца и предварительное инкубирование.** Готовят образец разведением 1 к 10 из 1 г испытуемого продукта, используя среду № 11 в качестве разбавителя, инкубируют в течение 2–5 ч при температуре 30–35°C.

**Испытание на отсутствие бактерий.** Подготовленный к испытанию образец (10 см<sup>3</sup>), соответствующий 1 г лекарственного средства, вносят в 100 см<sup>3</sup> питательной среды № 3, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 24–48 ч. При наличии роста делают пересев на среду № 4 в чашке Петри. Посевы инкубируют при температуре 30–35°C в течение 24–48 ч. Наличие роста малиновых с металлическим блеском или без него, розовых, бесцветных, блестящих, выпуклых колоний грамотрицательных палочек указывает на возможную контаминацию лекарственного средства бактериями семейства *Enterobacteriaceae* и некоторыми другими

грамотрицательными бактериями. Выросшие колонии пересевают каждую отдельно со среды № 4 на скошенную в пробирках среду № 1 и выращивают при температуре 30–35°C течение 18–20 ч. Из каждой пробирки с чистой культурой делают пересевы на среду № 6 (в двух повторностях) и среду № 7.

После посева в половину пробирок со средой № 6 вносят по 0,5 см<sup>3</sup> стерильного вазелинового масла. Все посеvy инкубируют при температуре 30–35°C в течение 18–20 ч. Ферментацию глюкозы устанавливают по изменению цвета среды № 6 из красного в желтый в пробирках с маслом и без него. О наличии нитритов в среде № 7 судят по появлению красного окрашивания при внесении в среду реактива Грисса. Параллельно исследуют чистые культуры на наличие фермента цитохромоксидазы. Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают отрицательную оксидазную реакцию, ферментируют глюкозу с образованием кислоты (или кислоты и газа) и восстанавливают нитраты в нитриты, испытуемый продукт контаминирован бактериями семейства *Enterobacteriaceae*.

**Тест на цитохромоксидазу.** Полоску фильтровальной бумаги смачивают реактивом и наносят стеклянной палочкой суточную чистую культуру исследуемых бактерий со среды № 1. Синее окрашивание, появляющееся через 2–5 мин, свидетельствует о положительной оксидазной реакции.

**Количественное испытание.** Инокулируют подходящие количества среды № 3 для энтеробактерий подготовленным образцом или его разбавлениями, содержащими соответственно 0,1 г, 0,01 г и 0,001 г (или 0,1 см<sup>3</sup>, 0,01 см<sup>3</sup> и 0,001 см<sup>3</sup>) испытуемого продукта. Инкубируют при температуре 30–35°C в течение 24–48 ч. При наличии роста делают пересев на плотную среду № 4 и инкубируют при той же температуре в течение 18–24 ч.

В случае появления характерных для *Enterobacteriaceae* колоний грамотрицательных палочек определяют количество энтеробактерий в 1 г (или в 1 см<sup>3</sup>) образца по табл. 12.

### **3.6.2. Испытание на наличие бактерий *E. coli***

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 35°C, суховоздушный термостат на температурный режим 42°C.

**Питательные среды и реактивы:** бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов (подразд. 2.3), бульон Макконки, агар Макконки (подразд. 3.3).

### **Проведение анализа**

**Приготовление образца и предварительное инкубирование.** Готовят образец разведением 1 к 10 не менее чем из 1 г (1 см<sup>3</sup>) испытуемого продукта, как описано выше. Используют 10 см<sup>3</sup> подготовленного образца или количество, соответствующее 1 г (1 см<sup>3</sup>) испытуемого продукта, для инокуляции 100 см<sup>3</sup> бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 18–24 ч.

**Селекция и пересев.** Встряхивают контейнер, переносят 1 см<sup>3</sup> бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов в 100 см<sup>3</sup> бульона Макконки и инкубируют при температуре 42–44°C в течение 24–48 ч. Пересевают на чашки с агаром Макконки и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 18–72 ч.

**Учет результатов (промежуточный).** Рост колоний свидетельствует о возможном присутствии *E. coli*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями (п. 3.6.7).

Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

В качестве альтернативного испытания допускается определение *E. coli*, как указано ниже.

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C.

**Питательные среды и реактивы:** жидкая среда № 11, жидкая среда № 3, агаризованная среда № 4, агаризованная среда № 1, агаризованная среда № 14, жидкая среда № 15, реактивы для теста на цитохромоксидазу, реактив Ковача или Эрлиха (подразд. 3.3).

### **Проведение анализа**

**Приготовление образца и предварительное инкубирование.** Готовят образец разведением 1 к 10 из 1 г (1 см<sup>3</sup>) испытуемого продукта, используя среду № 11 в качестве разбавителя, инкубируют в течение 2–5 ч при температуре 30–35°C.

**Испытание на отсутствие бактерий.** Подготовленный к испытанию образец (10 см<sup>3</sup>), соответствующий 1 г лекарственного средства, вносят в 100 см<sup>3</sup> питательной среды № 3 и инкубируют

при температуре 30–35°C в течение 18–24 ч. Затем делают пересев на среду № 4 в чашке Петри. Посевы инкубируют при температуре 30–35°C в течение 18–24 ч. На среде № 4 *E. coli* образуют, как правило, характерные малиновые колонии с металлическим блеском или без него диаметром 2–4 мм. Подозрительные на принадлежность к *E. coli* колонии микроскопируют. При обнаружении грамотрицательных палочек каждую культуру отсевают на скошенную в пробирках плотную среду № 1 и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 18–24 ч. Из каждой пробирки с чистой культурой делают пересевы бактериологической петлей на среды № 14 и 15, а также используют для теста на цитохромоксидазу. Через 18–24 ч инкубации при температуре 30–35°C отмечают бактериальный рост или его отсутствие на средах № 14 и 15. Утилизацию цитрата устанавливают по изменению цвета среды № 14 из зеленого в синий. Наличие индола определяют по появлению красного кольца на поверхности среды № 15 при добавлении реактива Ковача или Эрлиха.

**Учет результатов.** Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидазой, не утилизирующие цитрат натрия и образующие индол, считают, что испытуемый продукт контаминирован *E. coli*.

### **3.6.3. Испытание на наличие бактерий рода *Salmonella***

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C.

**Питательные среды и реактивы:** бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов (подразд. 2.3), обогатительный питательный бульон Раппапорта – Вассилиадиса, агаризованная среда на основе ксилозы, лизина, дезоксихолата (подразд. 3.3).

#### **Проведение анализа**

**Приготовление образца и предварительное инкубирование.** Готовят образец разведением 1 к 10 из 10 г (или 10 см<sup>3</sup>) испытуемого продукта, используя бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов в качестве разбавителя, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1 сут.

**Селекция и пересев.** Переносят 0,1 см<sup>3</sup> бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов с предыдущей стадии в 10 см<sup>3</sup> обогатительного питательного бульона Раппапорта – Вассилиадиса для *Salmonella* и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1 сут.

Пересевают на чашки с агаром на основе ксилозы, лизина, дезокси-холата. Инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1–2 сут.

**Учет результатов (промежуточный).** На возможное присутствие *Salmonella* указывает рост хорошо развитых красных колоний или красных колоний с черным центром. Присутствие *Salmonella* подтверждается в идентификационных испытаниях (п. 3.6.7).

**Учет результатов.** Продукт выдерживает испытание, если колонии описанного типа не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

В качестве альтернативного испытания допускается определение *Salmonella*, как указано ниже.

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C.

**Питательные среды и реактивы:** агаризованная среда № 1 (подразд. 2.3), жидкая среда № 3, жидкая среда № 12, агаризованная среда № 5, агаризованная среда № 13, реактивы для теста на цитохромоксидазу (подразд. 3.3).

### Проведение анализа

**Приготовление образца и предварительное инкубирование.** Готовят образец разведением 1 к 10 из 10 г (или 10 см<sup>3</sup>) испытуемого продукта, используя среду № 3 в качестве разбавителя, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1 сут.

**Селекция и пересев.** 1 см<sup>3</sup> обогащенной культуры на среде № 3 вносят в пробирку с 10 см<sup>3</sup> среды № 12 и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 16–18 ч. Делают пересев петлей на среду № 5 и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1–2 сут. На среде № 5 *Salmonella* образует, как правило, типичные черные колонии с характерным металлическим блеском, при этом участок среды под колонией прокрашивается в черный цвет. Подозрительные на принадлежность к *Salmonella* колонии микроскопируют и при обнаружении в мазках грамотрицательных палочек отсевают на плотную среду № 13, нанося небольшое количество культуры петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик, и на плотную среду № 1. Через 18–24 ч инкубации при 30–35°C отмечают изменение цвета среды из красного в желтый только в столбике питательной среды. Почернение среды свидетельствует об образовании сероводорода. Делают тест на цитохромоксидазу, используя чистую культуру с плотной среды № 1.

**Учет результатов.** Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидаза, не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород, считают, что испытуемый продукт контаминирован *Salmonella*.

#### **3.6.4. Испытание на наличие бактерий *P. aeruginosa***

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C.

**Питательные среды и реактивы:** бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов (подразд. 2.3), агаризованная среда на основе цетримиды (подразд. 3.3), фосфатный буферный раствор (подразд. 2.3).

#### **Проведение анализа**

**Приготовление образца и предварительное инкубирование.** Готовят образец разведением 1 к 10 из 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) испытуемого продукта, используя фосфатный буферный раствор в качестве разбавителя, перемешивают. Используют 10 см<sup>3</sup> или количество, соответствующее 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) лекарственного средства, для инокуляции 100 см<sup>3</sup> бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1 сут.

**Селекция и пересев.** Пересевают бульон с предыдущей стадии на чашки с агаризованной средой на основе цетримиды и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1–3 сут.

**Учет результатов.** На возможное присутствие *Ps. aeruginosa* указывает рост колоний. Результат подтверждается идентификационными испытаниями (п. 3.6.7). Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

В качестве альтернативного испытания допускается определение *P. aeruginosa*, как указано ниже.

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C.

**Питательные среды и реактивы:** физиологический раствор, агаризованная среда № 1 (подразд. 2.3), жидкая среда № 8, жидкая среда № 9, реактивы для окрашивания по Граму, реактивы для теста на цитохромоксидазу (п. 1.3.5 или подразд. 3.3).

### Проведение анализа

#### Приготовление образца и предварительное инкубирование.

Готовят образец разведением 1 к 10 из 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) испытуемого продукта, используя физиологический раствор в качестве разбавителя, перемешивают. Используют 10 см<sup>3</sup> или количество, соответствующее 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) лекарственного средства, для инокуляции 100 см<sup>3</sup> питательной среды № 8, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1–2 сут. Делают пересев бактериологической петлей на чашку с плотной питательной средой № 9 и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1–2 сут. Рост зеленоватых колоний, как правило флюоресцирующих, голубых в ультрафиолетовом свете (что свидетельствует о наличии пигмента пиоцианина), указывает на возможность загрязнения лекарственного средства *P. aeruginosa*. В этом случае подозрительные колонии пересевают на скошенную плотную среду № 1, инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1 сут. Выросшие колонии микроскопируют и, при выявлении грамотрицательных палочек, проводят тест на наличие фермента цитохромоксидаза.

**Учет результатов.** Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают положительную оксидазную реакцию и образуют сине-зеленый пигмент, испытуемый продукт контаминирован *P. aeruginosa*.

#### 3.6.5. Испытание на наличие бактерий *S. aureus*

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C.

**Питательные среды и реактивы:** фосфатный буферный раствор, бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов (подразд. 2.3), агаризованная среда на основе маннита и соли (подразд. 3.3).

### Проведение анализа

#### Приготовление образцов и предварительное инкубирование.

Готовят образец разведением 1 к 10 из 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) испытуемого продукта, используя фосфатный буферный раствор в качестве разбавителя, перемешивают. Используют 10 см<sup>3</sup> или количество, соответствующее 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) лекарственного средства, для инокуляции 100 см<sup>3</sup> бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1 сут.

**Селекция и пересев.** Делают пересев каждой культуры бактериологической петлей на чашки с агаризованной средой на основе маннита и соли и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1–3 сут.

**Учет результатов.** На возможное присутствие *S. aureus* указывает рост желтых или белых колоний, окруженных желтыми зонами. Результат подтверждается идентификационными испытаниями (п. 3.6.7). Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный ответ.

В качестве альтернативного испытания допускается определение *S. aureus*, как указано ниже.

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C.

**Питательные среды и реактивы:** физиологический раствор (подразд. 2.3), жидкая среда № 8, агаризованная среда № 10, агаризованная среда № 1, реактивы для окраски по Граму, реактивы для теста на наличие фермента плазмокоагулаза (п. 1.3.5).

### Проведение анализа

**Приготовление образца и предварительное инкубирование.** Готовят образец разведением 1 к 10 из 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) испытуемого продукта, используя физиологический раствор в качестве разбавителя, перемешивают. Используют 10 см<sup>3</sup> или количество, соответствующее 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) лекарственного средства, для инокуляции 100 см<sup>3</sup> питательной среды № 8, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 24–48 ч. Делают пересев на чашку с плотной питательной средой № 10 и инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1–2 сут. Рост золотисто-желтых колоний, окруженных желтыми зонами (что свидетельствует о ферментации маннита), указывает на возможность загрязнения лекарственного средства *S. aureus*. В этом случае колонии пересевают на скошенную плотную среду № 1, инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1 сут. Выросшие колонии микроскопируют и, при выявлении грамположительных кокков, расположенных гроздьями, проводят тест на наличие фермента плазмокоагулаза (п. 1.5.2).

**Учет результатов.** Если в образце обнаружены грамположительные кокки, которые ферментируют маннит и дают положительную реакцию плазмокоагуляции, испытуемый продукт загрязнен *S. aureus*.

### **3.6.6. Испытание на наличие специфических микроорганизмов методом мембранной фильтрации**

Используется для субстанций, вспомогательных веществ, лекарственных средств, в отношении которых есть указание в нормативной документации. Фильтры из нитрата целлюлозы применяют для водных, масляных и разбавленных спиртовых растворов, а из ацетата целлюлозы – для растворов с высоким содержанием спирта, для испытания антибиотиков используют специальные фильтры с гидрофобным краем. Диаметр пор 0,45 мкм.

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C, установка мембранной фильтрации открытого типа.

**Питательные среды и реактивы:** бульон МакКонки (альтернативно – среда № 3), бульон на основе казеина и соевого белка (альтернативно – среда № 8) (подразд. 3.3), раствор для промывки мембраны (подразд. 2.3).

#### **Проведение анализа**

Перед проведением испытания образец готовят по стандартной процедуре так, чтобы на фильтр нанести 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) испытуемого средства (п. 3.5.1). Аликвоты испытуемого образца подготовленного к испытанию лекарственного средства объемом 10 см<sup>3</sup> (или количество, соответствующее 1 г (или 1 см<sup>3</sup>)) переносят на два мембранных фильтра, фильтруют, промывают каждый фильтр путем пропускания через него некоторого объема растворителя (раствора для промывки мембраны). Число циклов промывки должно быть не более 5 из расчета по 100 см<sup>3</sup> на фильтр.

Первый фильтр переносят в бульон МакКонки или среду № 3, второй фильтр переносят в бульон на основе казеина и соевого белка или среду № 8. Затем испытания на наличие специфических микроорганизмов осуществляют аналогично методу прямого посева.

**Учет результатов.** Если при испытании образца методом мембранной фильтрации при разведении 1 : 10 не выявлен рост микроорганизмов на мембранном фильтре, результаты отмечают следующим образом: «В 1 г (или 1 см<sup>3</sup>) лекарственного средства (исходных материалов) общее количество аэробов (грибов) не выявлено».

### **3.6.7. Идентификация микроорганизмов**

Идентификация штаммов микроорганизмов, дающих колонии при микробиологическом мониторинге (подразд. 2.5), испытании

на общее количество жизнеспособных аэробов и общее количество грибов (подразд. 3.5), а также уточняющие испытания при установлении отсутствия специфических микроорганизмов (подразд. 3.6) проводятся на основании описания колоний и микроорганизмов, а также биохимических реакций. При описании колоний характеризуют их диаметр, форму, край, поверхность, цвет, консистенцию. Описание микроорганизмов производится на основании результатов микроскопирования: характеризуют морфологию, результат окраски по Граму, спорообразование, а также результаты индивидуальной системы идентификации. Исследуют следующие биохимические реакции: утилизация цитрата, наличие индола, тест на цитохромоксидазу, наличие плазмокоагулазы, наличие пигмента пиоцианина, утилизация лактозы, утилизация сахарозы, утилизация глюкозы, наличие сероводорода. Допускается использование коммерческих тест-систем.

## 4. ИНАКТИВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ДЕЗИНФЕКЦИИ И СТЕРИЛИЗАЦИИ

---

**Дезинфекция** – комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов на (в) объектах внешней среды с помощью механических, физических и химических средств и воздействий.

К химической дезинфекции относят обработку объекта химическими веществами – дезинфектантами. Для дезинфекции применяют окислители, поверхностно-активные вещества, спирты, альдегиды, надкислоты, фенолы. Объектами химической дезинфекции в условиях производства нестерильных лекарственных средств являются поверхности помещений, поверхности и внутренние полости оборудования.

Дезинфицирующие препараты представляют собой композиции на основе сбалансированной формулы, включающей одно или более активно действующих веществ в соотношениях, позволяющих добиться максимального синергизма в отношении наиболее устойчивых микроорганизмов, а также функциональных добавок, целенаправленно изменяющих их свойства, и вспомогательных веществ (стабилизаторов, ингибиторов коррозии, моющих веществ, красителей, отдушек). Дезинфицирующие препараты производятся в форме жидких концентратов, готовых к применению жидкостей, порошков, таблеток, гелей, спреев, салфеток, биоцидных лакокрасочных материалов и других.

**Антисептика** – отдельная область химической дезинфекции, которая предусматривает использование веществ неспецифического антимикробного действия (антисептиков) для уничтожения или подавления размножения микроорганизмов на поверхности кожи (реже слизистых оболочках) персонала, занятого в производстве. Для антисептики применяют спирты и поверхностно-активные вещества.

Антисептики выпускаются в виде готовых к использованию растворов, концентратов, дезинфицирующих салфеток, пропитанных кожным антисептиком, аэрозолей (беспропеллентных аэрозольных упаковок), гелей, кремов антисептических, мыл (жидких и твердых).

## 4.1. Характеристика промышленно выпускаемых средств для дезинфекции и антисептики

На рынке моющих, чистящих и дезинфицирующих средств (ДС) Республики Беларусь представлены три основных производителя: ЗАО «БелАсептика», ИП «Инкраслав» и ООО НПЦ «Химмедсинтез». В табл. 13 приведены характеристики коммерческих препаратов дезинфектантов и антисептиков, применяемых на предприятиях фармацевтической промышленности.

Таблица 13

### Коммерческие препараты дезинфектантов и антисептиков

| Наименование препарата  | Антимикробная активность | Действующие вещества                                                                    | Рабочие дозы, норма нанесения, время экспозиции                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Дезинфектанты</i>    |                          |                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Полидез <sup>1</sup>    | **                       | Водорастворимый полимер на основе производных гуанидина, бензалкония хлорид, комплексон | 0,25%-ный раствор, 60 мин (бактерицидный эффект); 0,5%-ный раствор, 120 мин (фунгицидный эффект); 1%-ный раствор, 45 мин (вирулицидный эффект); 2,5%-ный раствор, 60 мин (туберкулоцидный эффект)                               |
| Гексадекон <sup>1</sup> | **                       | Бензалкония хлорид, смесь альдегидов и органических кислот, комплексообразователь       | 0,1%-ный раствор, 120 мин, или 0,5%-ный раствор, 30 мин (бактерицидный эффект); 0,5%-ный раствор, 120 мин (фунгицидный эффект); 1,0%-ный раствор, 20 мин (вирулицидный эффект); 2%-ный раствор, 30 мин (туберкулоцидный эффект) |
| Анасепт <sup>2</sup>    | **                       | Алкилдиметил-бензиламмония хлорид, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид                | 1%-ный раствор, 30 мин (бактерицидный, фунгицидный, вирулицидный эффекты, исключая возбудителей туберкулеза); 1%-ный раствор, 60 мин (то же, включая возбудителей туберкулеза)                                                  |

| Наименование препарата                    | Антимикробная активность | Действующие вещества                                                                                                                | Рабочие дозы, норма нанесения, время экспозиции                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Инкрасепт-10А <sup>2</sup>                | **                       | Полигексаметиленгуанидина гидрохлорид                                                                                               | 1%-ный раствор, 15–30 мин (бактерицидный, фунгицидный, вирулицидный эффекты, исключая возбудители туберкулеза); 1%-ный раствор, 60 мин (то же, включая возбудители туберкулеза)                    |
| Пероксин <sup>2</sup>                     | **                       | Перекись водорода, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид, ингибитор коррозии, комплексобразователь                                  | 0,5%-ный раствор, 30 мин (бактерицидный эффект); 2,0%-ный раствор, 30 мин (фунгицидный эффект); 2,0%-ный раствор, 90 мин (вирулицидный эффект); 2,5%-ный раствор, 45 мин (туберкулоцидный эффект)  |
| Комбинированный дезинфектант <sup>1</sup> | *                        | Глутаровый альдегид, бензалконий хлорид и дидецилдиметиламмоний хлорид (ЧАС), изопропанол, ингибитор коррозии, комплексобразователь | 0,1%-ный раствор, 30 мин (бактерицидный эффект); 0,5%-ный раствор, 60 мин (фунгицидный эффект); 4,0%-ный раствор, 15 мин (туберкулоцидный эффект); 10,0%-ный раствор, 60 мин (спороцидный эффект)  |
| Сандим-Д <sup>1</sup>                     | *                        | Перекись водорода, уксусная кислота, надуксусная кислота, комплексон                                                                | 1,0%-ный раствор, 30 мин (бактерицидный, вирулицидный, фунгицидный эффекты); 2,5%-ный раствор, 60 мин (туберкулоцидный эффект); 12,0%-ный раствор, 30 мин (спороцидный эффект)                     |
| Пероксин плюс <sup>2</sup>                | *                        | Перекись водорода, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид, гидроксикислота (гликолевая кислота)                                      | 0,5%-ный раствор, 30 мин (бактерицидный эффект); 1,0%-ный раствор, 15 мин (фунгицидный эффект); 1,5%-ный раствор, 15 мин (вирулицидный эффект); 2,0%-ный раствор, 15 мин (туберкулоцидный эффект). |

| Наименование препарата              | Антимикробная активность | Действующие вещества                                    | Рабочие дозы, норма нанесения, время экспозиции                                                                                               |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Антисептики</i>                  |                          |                                                         |                                                                                                                                               |
| Этанол антисептический <sup>1</sup> | **                       | 70%-ный этиловый спирт                                  | 10 см <sup>3</sup> на одну обработку                                                                                                          |
| Септоцид Синерджи <sup>1</sup>      | **                       | Спирт этиловый, полигексаметиленбигуанидина гидрохлорид | 3 см <sup>3</sup> средства втираются в кожу рук в течение 12 с; остаточное действие на коже до 3 ч                                            |
| ДезОР <sup>2</sup>                  | **                       | Полигексаметиленгуанидина гидрохлорид                   | 3 см <sup>3</sup> средства втираются в кожу рук в течение 15 с; остаточное действие на коже до 3 ч                                            |
| Инол <sup>2</sup>                   | **                       | Спирт этиловый, спирт изопропиловый, полиэтиленгликоль  | 3 см <sup>3</sup> средства втираются в кожу рук в течение 30 с; для хирургов – не менее 2 порций по 5 см <sup>3</sup> втирают в течение 5 мин |

<sup>1</sup> ОАО «Беласептика».

<sup>2</sup> ИП «Инкраслав».

\* Бактерицидная (включая микобактерии туберкулеза), фунгицидная, вирулицидная, спороцидная активность.

\*\* Бактерицидная (включая микобактерии туберкулеза), фунгицидная, вирулицидная активность.

К каждому дезинфектанту прилагается инструкция, обязательными элементами которой являются: описание органолептических свойств продукта, содержание активных действующих веществ, срок годности при условии его хранения в невскрытой упаковке и после приготовления рабочих растворов, спектр действия в отношении микробиоты, класс опасности при воздействии на организм человека, рекомендации по использованию и правила приготовления рабочих растворов, меры предосторожности и оказания первой помощи, физико-химические и аналитические методы контроля качества средства для контрольных исследований, условия транспортировки и хранения.

Субстанции, предназначенные для производства ДС, должны хорошо растворяться в воде или других растворителях, обладать биоцидной активностью (убивать микроорганизмы, а не задерживать

их рост), иметь удовлетворительные органолептические (по цвету, запаху) и физико-химические (по растворимости, биоразлагаемости и стабильности при хранении) свойства.

При исследовании субстанций, предназначенных для производства дезинфицирующих препаратов, определяют спектр антимикробного действия в экспериментах *in vitro*. Исследование дезинфицирующих средств должно включать три этапа:

- определение спектра антимикробной активности и влияния на нее различных факторов, например, pH, температуры, присутствия органических веществ (суспензионный метод);

- оценку эффективности обеззараживания искусственно контаминированных тест-микроорганизмами объектов в лабораторных условиях для разработки режимов применения (суспензионный метод, метод батистовых тест-объектов, обеззараживание рабочих поверхностей; при разработке антисептиков – изучение эффективности в отношении общей микробиоты и искусственно контаминированной кожи рук);

- испытание в практических условиях для подтверждения эффективности разработанных режимов.

На фармацевтических производствах поверхности в помещениях (пол, стены), жесткую мебель, поверхности приборов и аппаратов протирают ветошью, смоченной в растворе средства. Санитарно-техническое оборудование (ванны, раковины, унитазы и др.), резиновые коврики обрабатывают раствором средства с помощью щетки или ерша, по окончании дезинфекции промывают водой. Резиновые коврики можно обеззараживать способом погружения. По окончании дезинфекции помещение проветривают в течение 60 мин. Норма расхода раствора средств при обработке поверхностей составляет 100 см<sup>3</sup>/м<sup>2</sup> поверхности, санитарно-технического оборудования – 200 см<sup>3</sup>/м<sup>2</sup> поверхности. После проведения дезинфекции с объектов необходимо удалять остаточное количество антимикробного агента (промывка), а также вести химический контроль полноты удаления. Срок годности рабочих растворов дезинфектантов обычно 15 сут, для растворов перекисей – 5 сут. Приготовление свежих рабочих растворов рекомендуется до истечения сроков годности при изменении их органолептических свойств.

## 4.2. Консерванты лекарственных средств

Если лекарственное средство само по себе не обладает антимикробной активностью, в его состав могут быть введены консерванты – противомикробные стабилизаторы, сохраняющие физико-химические свойства лекарственного средства от микробиологического воздействия. Они подавляют (замедляют) рост микроорганизмов-контаминантов, стабилизируя либо снижая их количество, что обеспечивает сохранность уровня микробной чистоты либо стерильности лекарственного средства и защиту от нежелательного воздействия, которое может быть результатом микробного загрязнения лекарственного средства или размножения в нем микроорганизмов в процессе хранения или использования.

Антимикробные консерванты не должны применяться в качестве альтернативы надлежащей производственной практики.

Для стабилизации содержания микроорганизмов используют нипагин, нипазол, сорбиновую, бензойную и борную кислоты. В качестве консервантов, снижающих содержание микроорганизмов, применяют хлорбутанолгидрат, фенол, спирты этиловый и бензиловый. Содержание консервантов составляет от 0,05 до 0,50%.

Органические кислоты (сорбиновую, бензойную) используют в технологии сиропов, экстрактов, мазей. Сложные эфиры параоксибензойной кислоты: нипагин (метилловый эфир) и нипазол (этиловый эфир), – вводят в состав глазных капель, суспензий, эмульсий, капсул, мазей. Эфирные масла применяют в качестве консервантов для лекарственных средств наружного применения (мази, эмульсии, линименты). Например, эфирные масла, содержащие фенольные соединения (укропное, лавандовое анисовое, лимонное), используются в качестве консервантов и корригентов запаха мазей.

Эффективность антимикробных консервантов может усиливаться или ослабляться в результате взаимодействия с действующим веществом или другими компонентами готового лекарственного средства, а также с упаковочными или укупорочными материалами. Поэтому на протяжении срока годности следует контролировать антимикробную активность готового лекарственного средства, хранящегося в контейнере, с целью доказательства того, что она не снижается в процессе хранения. Такие исследования проводят на образцах, извлеченных из контейнера непосредственно перед испытанием.

### 4.3. Нейтрализаторы антимикробного действия субстанций дезинфицирующих средств

Нейтрализатор – это вещество, которое устраняет (нейтрализует) действие химического агента на микробную клетку, но не убивает и не задерживает рост тест-микроорганизма. При изучении антимикробной активности тест-объекты после воздействия химического агента промывают в нейтрализаторе или добавляют его непосредственно в питательную среду (если установлено, что вносимая концентрация нейтрализатора не убивает и не задерживает рост тест-микроорганизмов).

В качестве нейтрализаторов дезинфицирующих веществ из различных химических групп применяют:

- галоидактивных (хлор-, бром- и йодактивные) и кислородактивных (перекись водорода, ее комплексы с солями, надуксусная кислота, озон) – 0,1–1,0%-ные растворы тиосульфата натрия;

- четвертичных аммониевых солей (алкилдиметилбензиламмоний хлорид, дидецилдиметиламмоний хлорид и др.), производных гуанидина (полигексаметиленгуанидина гидрохлорид, хлоргексидин биглюконат и др.) – 0,1–1,0%-ные растворы лаурилсульфата натрия (сульфонол) или растворы лаурилсульфата натрия с 10% обезжиренного молока или универсальный нейтрализатор (см. ниже);

- альдегидов (глутаровый альдегид, глиоксаль, формальдегид, ортофталевый альдегид) – 1,0%-ный раствор пиросульфита (метабиосульфита) натрия или универсальный нейтрализатор (см. ниже);

- кислот – щелочи в эквивалентном количестве;
- щелочей – кислоты в эквивалентном количестве;
- спиртов – разведение в воде до недействующей концентрации;
- композиционных средств – универсальный нейтрализатор, содержащий: Твин-80 – 30 г, сапонин – 3–30 г, гистидин – 1 г, цистеин – 1 г, вода – до 1 дм<sup>3</sup>. Если в состав композиции входят окислители, в нейтрализатор дополнительно вводят тиосульфат натрия.

На фармацевтических производствах в качестве нейтрализатора используют гистидиновый растворитель с рН 7,6, в состав которого на 1 дм<sup>3</sup> входят: Твин-80 – 30 г, лецитин яичный – 3 г, гистидина гидрохлорид – 1 г, пептон казеиновый – 1 г, хлорид натрия – 4,3 г, однозамещенный фосфат калия – 3,6 г, двузамещенный фосфат натрия – 7,2 г.

#### 4.4. Тест-культуры, применяемые при установлении антимикробной активности дезинфицирующих средств

При разработке составов для производства дезинфицирующих средств оценивают бактерицидную, фунгицидную, вирулицидную и спорицидную активности. В качестве тест-микроорганизмов используют музейные культуры грамотрицательных бактерий *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, грамположительные бактерии рода *Staphylococcus aureus*, дрожжеподобные грибы *Candida albicans*, дерматофит *Trichophyton gypseum*, мицелиальные грибы *Aspergillus niger*, эндоспоры бактерий рода *Bacillus* и *Geobacillus*.

На фармацевтических предприятиях для рабочих растворов антисептиков и дезинфектантов проводят оценку их активности. В качестве тест-микроорганизмов используют аэробные бактерии – *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*, анаэробные бактерии – *Clostridium sporogenes*, грибы – *C. albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, а также изоляты культур, выделенных на производстве в ходе предыдущих мониторингов производственной среды. Выделение и идентификация изолятов, обнаруженных при мониторинге производства, отражается в журнале «Банк изолятов цеха». Эти изоляты используются для валидации эффективности антисептических и дезинфицирующих средств, валидации процесса стерилизующей фильтрации.

Тест-микроорганизмы должны иметь типичные биохимические, морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства, присущие данному виду, и обладать стандартной устойчивостью к эталонным дезинфицирующим средствам.

#### 4.5. Оценка эффективности работы стерилизующих устройств

Определение эффективности стерилизации проводят с применением специальных биологических и химических индикаторов, устройств для контроля физических параметров.

Контролю подлежат стерилизующие агенты, стерилизационное оборудование, стерилизационная упаковка, критические переменные

стерилизационных циклов (значения параметров режимов) и эффективность стерилизации.

Контроль работы стерилизаторов (автоклавов, сухожаровых шкафов) проводят физическим, химическим и бактериологическим методами при валидации или ревалидации процесса стерилизации, а также в ходе эксплуатации оборудования при производственном контроле. В процессе эксплуатации параметры режимов стерилизации контролируют физическим (используя контрольно-измерительные приборы) и химическим (применяя химические индикаторы) методами.

Химические и биологические индикаторы, а также устройства контроля процесса с химическими и биологическими индикаторами размещают внутри стерилизационной камеры по контрольным точкам – наименее доступным для стерилизующего агента местам. Расположение и число контрольных точек зависят от вида и объема стерилизационной камеры.

Физический метод контроля включает регистрацию таких параметров, как температура, давление, экспозиция, концентрация паров химического реагента, влажность и т. д., для разных видов стерилизации. Измерительные приборы для учета этих параметров могут быть штатные (входящие в комплект или встроенные в стерилизатор) либо независимые.

В основе химического метода лежит свойство индикаторного элемента изменять цвет в случае успешной стерилизации – паровой, воздушной, газовой и радиационной. Химическая индикация позволяет осуществить контроль стерилизации и оценить следующие параметры: при воздушной – температуру, время; при паровой – температуру, время, насыщенность паров; при газовой – температуру, время, влажность, концентрацию дезинфектора.

Для контроля температуры часто пользуются химическими термотестами, которые представляют собой вещества, изменяющие свой цвет и (или) физическое состояние после воздействия определенной температуры. Запаянные ампулы с порошком, смешанным с краской, или вещества, плавящиеся только при определенной температуре, помещают в стерилизационную камеру вместе с питательными средами, подлежащими стерилизации. При достижении в камере определенной температуры порошок плавится, образуя сплав, окрашенный в цвет добавленной краски, или плавящиеся вещества приобретают иное состояние – из кристаллического переходят в аморфное со спонтанным изменением окраски или только плавятся (табл. 14).

**Температуры плавления химических индикаторов,  
используемых для контроля режимов термической стерилизации**

| Наименование                     | Температурный параметр, подлежащий контролю, °С | Цвет расплавленного индикаторного вещества |
|----------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Резорцин, фуксин кислый          | 110                                             | Фиолетовый или темно-красный               |
| Бензойная кислота, фуксин кислый | 120                                             | Фиолетовый или темно-красный               |
| Бензамид, фуксин кислый          | 124                                             | Фиолетовый                                 |
| Сукцинамид, фуксин кислый        | 124                                             | Фиолетовый или темно-вишневый              |
| Никотинамид, фуксин кислый       | 132                                             | Фиолетовый или темно-вишневый              |
| Мочевина, фуксин кислый          | 132                                             | Фиолетовый или темно-вишневый              |
| Левомецетин, фуксин кислый       | 160                                             | Темно-красный или фиолетовый               |
| Лактоза, фуксин кислый           | 170                                             | Темно-коричневый или темно-фиолетовый      |
| Тиомочевина                      | 180                                             | Желтый или желто-зеленый                   |
| Гидрохинон                       | 180                                             | Серый с фиолетовым оттенком                |
| Кислота винная                   | 180                                             | Светло-коричневый или коричневый           |

В соответствии с ГОСТ ISO 11140-1–2011 химические индикаторы разделены на 6 классов. Химические индикаторы 1-го класса позволяют отличить изделия, прошедшие стерилизацию, от изделий, не обработанных в стерилизаторе. Химические индикаторы 4, 5 и 6-го классов используют для контроля параметров (критических переменных) в каждом цикле стерилизации. Их помещают внутрь или снаружи упаковки (в зависимости от модификации химического индикатора). Например, индикаторы 6-го класса обладают низкой погрешностью, дают реакцию на все контрольные значения параметров, а индикаторы 4-го класса реагируют на избирательные параметры стерилизации (для каждого режима используют специальный индикатор).

Для различных методов стерилизации в качестве критических приняты следующие переменные: паровая стерилизация – время,

температура и насыщенный пар; воздушная стерилизация (стерилизация горячим воздухом) – время и температура; стерилизация оксидом этилена – время, температура, относительная влажность и концентрация оксида этилена; радиационная стерилизация – поглощенная доза; пароформальдегидная стерилизация – время, температура, насыщенный пар, концентрация формальдегида; стерилизация с применением паров перекиси водорода – время, температура, концентрация перекиси водорода и, если применяется, плазма.

Биологический (бактериологический) метод считается самым надежным и достоверным. Биологические индикаторы – это препараты спорообразующих микроорганизмов с установленной стойкостью к конкретному виду стерилизационного процесса. Они обычно представляют собой популяцию спор бактерий, нанесенных на инертный носитель, например, на полоску фильтровальной бумаги, стеклянную пластинку или пластиковую пробирку. Инокулированный носитель изолируют таким образом, чтобы предотвратить его повреждение или загрязнение, но в то же время обеспечить контакт стерилизующего агента с микроорганизмами. Суспензии спор могут находиться в герметично закрытых ампулах.

Посевы простерилизованного материала вносятся в питательные среды, благоприятствующие росту и развитию микроорганизмов. При отсутствии в наблюдаемой пробе следов жизнедеятельности стерилизация считается успешной. Если микроорганизмы фиксируются, то стерилизационные мероприятия необходимо проводить повторно. Недостатком данного метода контроля является его длительность: достоверный результат можно получить спустя 48 ч от начала проб. До истечения этого срока никаких манипуляций со стерилизованными предметами проводить не представляется возможным. Современные тесты биологического контроля должны использоваться заблаговременно.

Биологический индикатор должен иметь следующие характеристики: название вида бактерий, используемых в качестве эталонных микроорганизмов; номер штамма в исходной коллекции; количество жизнеспособных спор, приходящееся на носитель; величину  $D$  (параметр стерилизации (продолжительность или поглощенная доза), обеспечивающий снижение числа жизнеспособных микроорганизмов до 10% от исходного числа).

Можно использовать биологические индикаторы, которые включают ампулу с питательной средой, помещенную в упаковку, защищающую инокулированный носитель.

Выбор тест-микроорганизмов для биологических индикаторов должен проводиться с учетом следующих требований:

- тест-микроорганизмы должны принадлежать к определенному штамму, взятому из обязательной коллекции культур, и однозначно идентифицироваться с эталонным номером этой коллекции культур;
- тест-штамм не должен быть патогенным;
- тест-штамм должен легко культивироваться;
- сопротивляемость тест-штамма конкретному методу стерилизации должна быть высокой по сравнению с сопротивляемостью всех патогенных микроорганизмов и сопротивляемостью микроорганизмов, потенциально контаминирующих продукт.

Каждая первичная упаковка для биологического индикатора должна иметь этикетку, содержащую следующую информацию: название тест-микроорганизма, номер серии биологического индикатора, срок годности биологического индикатора, указание процесса стерилизации, которому соответствует биологический индикатор, название изготовителя и торговую марку.

Для валидации паровой стерилизации в Государственной Фармакопее Республики Беларусь рекомендуется использование спор *Bacillus stearothermophilus*. Число жизнеспособных спор должно превышать  $5 \cdot 10^5$  на носитель. Величина  $D$  при температуре  $121^\circ\text{C}$  должна составлять более 1,5 мин. При обработке биологических индикаторов паром при температуре  $121^\circ\text{C}$  в течение 6 мин должно наблюдаться сохранение жизнеспособных спор, а обработка при той же температуре в течение 15 мин должна приводить к полной гибели эталонных тест-микроорганизмов.

Для приготовления биологических индикаторов с целью контроля сухожаровой стерилизации рекомендованы споры *B. subtilis*. Число жизнеспособных спор должно быть более  $1 \cdot 10^5$  на носитель. Величина  $D$  при температуре  $160^\circ\text{C}$  должна составлять 1–3 мин. Для стерилизации и депирогенизации стеклянной посуды часто применяется горячий воздух при температуре более  $220^\circ\text{C}$ . В этом случае в качестве подходящей замены биологическим индикаторам может быть использовано снижение термостойких бактериальных эндотоксинов на три порядка.

Биологические индикаторы радиационной стерилизации могут применяться для мониторинга текущих операций в качестве

дополнительный возможности оценки эффективности установленной дозы излучения, особенно в случае стерилизации ускоренными электронами. Рекомендуются споры *Bacillus pumilus*. Число жизнеспособных спор должно быть более  $1 \cdot 10^7$  на носитель. Величина  $D$  должна составлять более 1,9 кГр. Следует убедиться, что после облучения биологического индикатора дозой 25 кГр (минимальная поглощенная доза) не наблюдается рост эталонных микроорганизмов.

Для всех процедур газовой стерилизации необходимо использование биологических индикаторов. Число жизнеспособных спор должно быть более  $5 \cdot 10^5$  на носитель. Для этиленоксида и формальдегида рекомендуется использовать споры *B. subtilis*, для перекиси водорода и перуксусной кислоты – споры *B. stearothermophilus*. Для каждой конкретной процедуры должны быть известны параметры сопротивляемости тест-микроорганизма: например, для этиленоксида величина  $D$  должна составлять более 2,5 мин для цикла стерилизации со следующими параметрами: концентрация окиси этилена 600 мг/дм<sup>3</sup>, температура 54°C и относительная влажность 60%. Следует убедиться, что после 60-минутного цикла стерилизации с указанными параметрами рост эталонных микроорганизмов не наблюдается, тогда как после 15-минутного цикла при более низкой температуре (600 мг/дм<sup>3</sup>, 30°C, 60%) жизнеспособность спор сохраняется. Важно, чтобы биологические индикаторы позволяли выявить недостаточную влажность в стерилизаторе и продукте, чтобы гарантировать инактивацию обезвоженных микроорганизмов. Жизнеспособность спор должна сохраняться при воздействии на индикатор окиси этилена (600 мг/дм<sup>3</sup>, 54°C, 60 мин) без увлажнения.

#### **4.6. Лабораторная работа**

##### **Установление антимикробной активности дезинфицирующих средств с использованием суспензионного метода**

При анализе результатов испытаний дезинфектантов рекомендуется устанавливать связь эффективности дезинфицирующего действия с составом препарата дезинфицирующего средства, режимом обработки (концентрацией рабочего раствора, экспозицией), видом тест-микроорганизма.

**Цель работы:** оценка антимикробной активности рабочих растворов дезинфицирующих средств, используемых для санитарной подготовки помещений фармацевтических производств, с применением суспензионного метода.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред (п. 1.3.1) и нейтрализатора (подразд. 4.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды, питательных сред и растворов, мембранных и бумажных фильтров. 3. Приготовление рабочих суспензий тест-культур и определение их биологических концентраций. 4. Приготовление рабочих растворов дезинфектантов. 5. Установление антимикробной активности дезинфицирующих средств суспензионным методом, применяемым при разработке составов средств для дезинфекции. 6. Анализ результатов оценки антимикробной активности рабочих растворов дезинфицирующих средств, вывод о соответствии выбранного режима обработки заявленному производителем эффекту.

#### **4.6.1. Приготовление рабочей суспензии тест-культуры**

Культуру тест-штамма пересевают плотным штрихом на подходящую полноценную питательную среду и инкубируют до обильного роста. Для бактериальных культур используют МПА или казеиновый агар, инкубируют при температуре 37°C в течение 18–24 ч. Для грибных культур используют агар Сабуро, а температура и время культивирования определяются грибной культурой: *C. albicans* – при 27°C в течение 2–10 сут; *T. gypsum* – при 27°C в течение 28 сут; *A. niger* – при 37°C в течение 2 сут, а затем выдерживают 3–5 сут при 20°C в темном месте.

Далее культуру бактерий смывают с поверхности агаризованной среды 5 см<sup>3</sup> стерильной водопроводной воды для приготовления суспензии клеток и тщательно перемешивают. Культуру *C. albicans* готовят так же, как культуру бактерий. Суспензии клеток грибных культур *T. gypsum* и *A. niger* готовят следующим образом: извлекают культуру петлей из пробирки, помещают в фарфоровую ступку и растирают с небольшим количеством стерильного физиологического раствора до гомогенной взвеси с минимальным размером частиц.

Полученную суспензию фильтруют через ватно-марлевый фильтр и разводят физиологическим раствором до концентрации, соответствующей по мутности оптическому стандарту мутности № 5–10 (табл. 15).

**Соответствие концентрации клеток *E. coli*  
в бактериальной суспензии и мутности этой суспензии,  
оцененной с использованием стандарта мутности  
по сульфату бария и фотоэлектроколориметра**

| Параметр качества<br>суспензии клеток <i>E. coli</i>          | Номер стандарта мутности по сульфату бария |      |      |      |      |      |      |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                                                               | 0,5                                        | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 10   |
| Концентрация бактерий, $\times 10^8$ ,<br>КОЕ/см <sup>3</sup> | 1,0                                        | 3,0  | 6,0  | 9,0  | 12,0 | 15,0 | 30,0 |
| Пропускание, %, при длине<br>волны 600 нм                     | 74,3                                       | 55,6 | 35,6 | 26,4 | 21,5 | 17,1 | 8,3  |
| Поглощение при длине вол-<br>ны 600 нм                        | 0,13                                       | 0,26 | 0,45 | 0,58 | 0,67 | 0,78 | 1,30 |

Определение биологической концентрации тест-микроорганизмов выполняют методом последовательных десятикратных разведений суспензии тест-микроорганизма в стерильной питьевой воде с последующим высевом суспензии в чашки Петри с той же плотной питательной средой по методу Коха. После инкубации подсчитывают выросшие колониеобразующие единицы и определяют количество жизнеспособных бактерий в 1 см<sup>3</sup> суспензии.

#### **4.6.2. Приготовление рабочих растворов дезинфектантов**

Рабочие растворы ДС и их активных действующих веществ готовят непосредственно перед проведением исследований (кроме тех случаев, когда изучают стабильность рабочих растворов в процессе хранения). Если используют товарное дезинфицирующее средство, то следует руководствоваться инструкцией к нему. Выбирают режим обработки, активный в отношении бактерий и грибов. При изучении средств, производимых в форме гранул, порошков, таблеток и т. п., рабочие растворы используют только после полного растворения субстанции дезинфицирующего средства (если не указано на возможность выпадения осадка).

Для оценки антимикробного действия субстанций и ДС в лабораторных условиях и исследования эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания различных объектов, растворы готовят на стерильной питьевой воде. Для этого необходимое количество сухого ДС или жидкого концентрата вносят в пробирку (колбу) и добавляют расчетное количество воды, тщательно размешивают и

закрывают пробкой. Отмечают время полного растворения и внешний вид приготовленного рабочего раствора. Температура растворов ДС должна быть в пределах 20°C независимо от температуры окружающей среды.

При испытании ДС в практических условиях рабочие растворы готовят на нестерильной питьевой воде комнатной температуры 20°C или при необходимости – умеренно повышенной температуры 45–50°C. Навеску средства или отмеренное количество жидкого концентрата вносят в соответствующую емкость, добавляют воду, размешивают и закрывают крышкой. Работу с раствором начинают после полного растворения действующих веществ.

#### **4.6.3. Суспензионный метод установления антимикробной активности дезинфицирующих средств**

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 37°C, суховоздушный термостат на температурный режим 28°C.

**Питательные среды и реактивы:** ПБ или ГРМ-бульон, ПА или ГРМ-агар, сусло-бульон или бульон Сабуро, сусло-агар или агар Сабуро (п. 1.3.1), нейтрализатор (подразд. 4.3).

**Проведение анализа.** Готовят рабочие растворы дезинфицирующего средства с различными концентрациями. Далее по 4,5 см<sup>3</sup> разливают в стерильные пробирки, в которые добавляют 0,5 см<sup>3</sup> взвеси тест-микроорганизма или бульонной культуры, содержащей  $1 \cdot 10^9$  кл./см<sup>3</sup>, и тщательно перемешивают. Через определенные интервалы времени (5 мин) по 0,5 см<sup>3</sup> взвеси клеток тест-микроорганизмов в рабочем растворе дезинфицирующего вещества добавляют к 4,5 см<sup>3</sup> соответствующего нейтрализатора (см. подразд. 4.3), снова тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин.

Затем по 0,5 см<sup>3</sup> вливают в пробирку с 4,5 см<sup>3</sup> стерильной питьевой воды, после чего 0,1 см<sup>3</sup> из этой пробы вносят в пробирки с 5 см<sup>3</sup> жидкой среды и на поверхность подходящей агаризованной питательной среды. В контрольных опытах вместо растворов ДС используют стерильную питьевую воду, а посевы делают в среду без нейтрализации или с нейтрализацией. Посевы инкубируют в подходящих условиях: для культур бактерий – при 37°C в течение 24–48 ч, для культур грибов – при 28°C в течение 2–7 сут (*C. albicans*, *Asp. niger*) и 21–28 сут (*T. gypseum*).

**Учет результатов.** Результаты опыта оценивают по наличию или отсутствию роста микроорганизмов в жидкой и на твердой питательной среде. Сравнение проводят с контролем опыта, которым является посев тест-микроорганизмов в питательную среду без добавления ДС или субстанции.

Подсчитывают количество выросших колоний, затем рассчитывают плотность контаминации 100 см<sup>2</sup> поверхности и процент обеззараживания, принимая количество колоний, снятых с контрольных поверхностей, за 100%.

В испытании с использованием в качестве тест-культуры бактерий эффективной считают концентрацию средства, при которой трижды повторенный опыт при определенном времени воздействия дает отрицательный результат (отсутствие роста микроорганизмов) при наличии типичного роста тест-культуры в контроле.

Критерий эффективности обеззараживания поверхностей – не менее 99,99% гибели тест-грибов; время обеззараживания при контаминации *C. albicans*, *T. gypsum* – не более 240, *A. niger* – не более 360 мин.

#### **4.7. Лабораторная работа**

##### **Установление антимикробной активности дезинфицирующих средств с использованием метода батистовых тест-объектов**

При анализе результатов испытаний дезинфектантов рекомендуется устанавливать связь эффективности дезинфицирующего действия с составом препарата дезинфицирующего средства, режимом обработки (концентрацией рабочего раствора, экспозицией), видом тест-микроорганизма.

**Цель работы:** оценка антимикробной активности рабочих растворов дезинфицирующих средств, используемых для санитарной подготовки помещений фармацевтических производств, с использованием метода батистовых тест-объектов.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред (подразд. 1.3) и нейтрализатора (подразд. 4.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды, питательных сред и растворов, мембранных и бумажных фильтров. 3. Подготовка батистовых тест-объектов. 4. Приготовление рабочих суспензий тест-культур и определение их биологических концентраций (п. 4.6.1). 5. Контаминация батистовых тест-объектов. 6. Приготовление рабочих растворов дезинфектантов (п. 4.6.2). 7. Установление антимикробной активности дезинфицирующих средств методом батистовых тест-объектов, применяемым при разработке составов средств для дезинфекции. 8. Анализ результатов оценки антимикробной активности рабочих растворов дезинфицирующих средств, вывод о соответствии выбранного режима обработки заявленному производителем эффекту.

#### **4.7.1. Подготовка батистовых тест-объектов**

Кусок батиста погружают на 24 ч в холодную воду для удаления аплитур, крахмала. Затем его тщательно стирают с мылом, кипятят, сушат и гладят утюгом. С помощью иглы в приготовленном куске ткани выдергивают нитки в продольном направлении на расстоянии 11 мм друг от друга, а в поперечном – на расстоянии 6 мм. По этим линиям батист разрезают ножницами на тест-объекты и по 50 шт. раскладывают в чашки Петри, последние заворачивают в бумагу и стерилизуют в автоклаве 20 мин при 132°C.

#### **4.7.2. Контаминация батистовых тест-объектов**

Стерильные батистовые тест-объекты в чашке Петри заливают суспензией тест-микроорганизма из расчета 0,5 см<sup>3</sup> на 1 тест-объект, равномерно смачивая все тест-объекты. Чашку Петри закрывают крышкой и оставляют на 20 мин при комнатной температуре. Затем в асептических условиях батистовые тест-объекты, пропитанные суспензией тест-микроорганизмов, для удаления избытка жидкости переносят на поверхность стерильной фильтровальной бумаги (2–4 слоя на дне чашки Петри), прикрывают их сверху стерильной фильтровальной бумагой и закрывают чашку Петри крышкой. Через 10 мин тест-объекты переносят на поверхность сухой стерильной фильтровальной бумаги в чашке Петри и сверху прикрывают стерильным листом фильтровальной бумаги, подсушивают в термостате

при 37°C в течение 20 мин с приоткрытой крышкой. Хранят контаминированные батистовые тест-объекты в чашках Петри в холодильнике при температуре 4°C.

Срок хранения тест-объектов, контаминированных *E. coli*, *Sal. typhimurium*, *P. aeruginosa*, – 1 сут, *S. aureus* – 4 сут.

#### **4.7.3. Установление антимикробной активности дезинфицирующих средств методом батистовых тест-объектов**

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 37°C, суховоздушный термостат на температурный режим 28°C, жидкостной термостат на температурный режим 20°C.

**Питательные среды и реактивы:** ПБ или ГРМ-бульон, ПА или ГРМ-агар, сусло-бульон или бульон Сабуро, сусло-агар или агар Сабуро (п. 1.3.1), нейтрализатор (подразд. 4.3).

**Проведение анализа.** В стерильную пробирку пипеткой вносят требуемый объем приготовленного дезинфицирующего раствора (из расчета 0,5 см<sup>3</sup> на каждый тест-объект) и, не касаясь краев колбы, опускают в него с помощью стерильного пинцета все тест-объекты, используемые в эксперименте (по 2 на каждую экспозицию). Легким покачиванием колбы достигают смачивания тест-объектов исследуемым раствором. Колбу помещают в водяную баню с температурой 18–20°C и поддерживают данную температуру в течение всего эксперимента. При постоянной температуре в помещении 18–20°C эксперименты можно проводить без использования водяной бани.

Отсчет времени воздействия эталонного раствора начинают с момента смачивания всех тест-объектов раствором. Через определенные интервалы времени (5 мин) стерильным пинцетом или платиновой петлей извлекают по 2 тест-объекта из раствора и погружают в пробирки с 5 см<sup>3</sup> стерильного раствора соответствующего нейтрализатора. Через 5 мин тест-объекты переносят в пробирку со стерильной питьевой водой, а еще через 5 мин каждый из двух тест-объектов отдельно переносят в пробирки с жидкой питательной средой, необходимой для культивирования изучаемого тест-микроорганизма.

Контролем являются 2 тест-объекта, погруженные на весь период эксперимента в раствор нейтрализатора, и 2 тест-объекта, погруженные на этот же срок в питьевую воду, которые по окончании эксперимента переносят в питательную среду. Посевы инкубируют в подходящих для развития тест-культур условиях (п. 4.6.3).

**Учет результатов.** Результаты оценивают качественно по отсутствию (наличию) признаков роста тест-микроорганизма в питательном бульоне. Критерием активности ДС и субстанций является 100%-ная гибель тест-микроорганизмов (отсутствие роста в опытных пробах) при времени дезинфекционной выдержки для *S. aureus*, *E. coli*, *Sal. typhimurium*, *P. aeruginosa* – не более 30 мин, для *C. albicans*, *T. gypseum*, *A. niger* – не более 60 мин.

#### **4.8. Лабораторная работа**

##### **Исследование бактерицидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания поверхностей**

При анализе результатов испытаний дезинфектантов рекомендуется устанавливать связь эффективности дезинфицирующего действия с составом препарата дезинфицирующего средства, режимом обработки (концентрация рабочего раствора, экспозицией), видом тест-микроорганизма, характером обрабатываемой поверхности, бионагрузкой.

**Цель работы:** оценка антимикробной (бактерицидной) активности рабочих растворов дезинфицирующих средств, используемых для санитарной подготовки помещений фармацевтических производств, с применением нанесения их на поверхность.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред (подразд. 1.3) и нейтрализатора (подразд. 4.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды, питательных сред и растворов, мембранных и бумажных фильтров. 3. Подготовка поверхностей в испытанию. 4. Приготовление рабочих суспензий тест-культур и определение их биологических концентраций (п. 4.6.1). 5. Приготовление рабочих растворов дезинфектантов (п. 4.6.2). 6. Установление антимикробной активности дезинфицирующих средств методом батистовых тест-объектов, применяемым при разработке составов средств для дезинфекции. 7. Анализ результатов

оценки антимикробной активности рабочих растворов дезинфицирующих средств, вывод о соответствии выбранного режима обработки заявленному производителем эффекту.

#### **4.8.1. Подготовка поверхностей к испытанию**

В качестве тест-поверхностей используют поверхности размером 10×10 см из различных материалов: гладкие, шероховатые, впитывающие и не впитывающие (деревянные, оштукатуренные, поверхности, окрашенные масляной, силикатной, вододисперсионной или клеевой краской, оклеенные обоями, поверхности из линолеумных покрытий, из окрашенного или неокрашенного металла – нержавеющей хром-никелевой кислотостойкой стали, поверхности из пластика, стекла, искусственной или натуральной кожи, из облицовочной плитки – кафельной и метлахской, фаянса и др.), но не менее 5 их видов. Набор тест-поверхностей для исследований определяется назначением средства.

При разработке режима обеззараживания технологического оборудования и поверхностей в качестве тест-поверхностей используют неокрашенный металл, пластик, облицовочную плитку (кафельная, метлахская, фаянсовая), контаминированные санитарно-показательными и специфическими для предприятий данного вида промышленности микроорганизмами.

В качестве тест-микроорганизмов используют коллекционные штаммы *S. aureus*, *E. coli*, *Sal. typhimurium*, *P. aeruginosa*.

Перед контаминацией тест-культурой поверхности подвергают механической очистке – моют водой с мылом и щеткой (за исключением поверхностей, оклеенных обоями и окрашенных клеевой краской). Последние протирают несколько раз стерильной салфеткой, увлажненной стерильной питьевой водой.

Для имитации загрязнения поверхностей используют белковое (раствор инактивированной сыворотки) или фекальное (фекальная эмульсия) загрязнение.

Исследования проводят в зависимости от вида поверхностей, их положения (горизонтальное, вертикальное), способа и кратности обработки. При изучении эффективности обеззараживания линолеум, плитку, искусственную или натуральную кожу, стекло располагают горизонтально, а дерево, окрашенное масляной, силикатной, вододисперсионной или клеевой красками, поверхности, оклеенные обоями, пластик, кафельную и фаянсовую плитки – вертикально.

#### **4.8.2. Исследование бактерицидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания поверхностей в медицинских учреждениях**

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 37°C.

**Питательные среды и реактивы:** ЖСА (п. 1.3.4), или среда Эндо (п. 1.3.2), или основа агара с цетримидом без глицерина (п. 1.3.2), нейтрализатор (подразд. 4.3).

**Проведение анализа.** На высушенные поверхности пипеткой наносят взвесь тест-микроорганизмов из расчета  $0,5 \text{ см}^3 \cdot 2 \cdot 10^9$  КОЕ микробной взвеси на площадь в  $100 \text{ см}^2$  и равномерно распределяют ее по поверхности стеклянным шпателем. Поверхности подсушивают (до полного высыхания) при температуре 18–20°C и относительной влажности воздуха 50–60%, затем обрабатывают дезинфицирующим раствором. Обработку поверхностей проводят способами протирания или орошения (крупнокапельное и аэрозольное).

Для определения нормы расхода при однократной обработке дезинфицирующий раствор наносят с помощью пипетки на поверхность размером 10×10 см при применении способа протирания в количестве 1,0, 1,5 или 2,0 см<sup>3</sup>, а при крупнокапельном орошении наносят с помощью дозатора 1,5–3,0 см<sup>3</sup>. При аэрозольном методе обработки изучают эффективность обеззараживания при норме расхода 30–100 см<sup>3</sup>/м<sup>2</sup> (в зависимости от вида аэрозольного генератора и применяемой аэрозольной насадки). Многократное протирание или орошение проводят с интервалом между обработками 5–30 мин.

Контрольные поверхности обрабатывают стерильной питьевой водой так же и из того же расчета, что и опытные.

Исследования проводят при температуре 18–20°C. При необходимости оценивают эффективность обеззараживания поверхностей при повышенной до 50°C или пониженной до –30°C температуре исследования проводят в термо- или холодильной камере.

Контроль эффективности обеззараживания тест-поверхностей проводят следующим образом: марлевой салфеткой (размером 5×5 см), смоченной в растворе соответствующего для данного дезинфицирующего средства нейтрализатора, тщательно протирают тест-поверхность, затем эту салфетку погружают в 10 см<sup>3</sup> этого же нейтрализатора, находящегося в пробирках с бусами, отмывают 10 мин

при постоянном встряхивании. Смыв высевают по 0,1 см<sup>3</sup> в 2 чашки с агаризованной дифференциально-диагностической питательной средой.

Посевы инкубируют при температуре 37°C 1–2 сут.

**Учет результатов.** Подсчитывают количество выросших колоний, рассчитывают плотность контаминации 100 см<sup>2</sup> поверхности и процент обеззараживания, принимая количество колоний, снятых с контрольных поверхностей, за 100%.

Критерий эффективности обеззараживания поверхностей – не менее 99,99% гибели тест-микроорганизмов; время обеззараживания при контаминации *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* – не более 120 мин.

#### **4.8.3. Исследование бактерицидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания поверхностей на фармацевтическом производстве**

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C.

**Питательные среды и реактивы:** агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (альтернативно – среда № 1), физиологический раствор (подразд. 2.3), нейтрализатор (подразд. 4.3).

**Проведение анализа.** Готовят инокулят тест-культуры путем смыва клеток, выросших на плотной агаризованной питательной среде, и суспендирования в количестве  $(0,9–1,0) \cdot 10^9$  кл./см<sup>3</sup> в 0,9%-ном растворе хлорида натрия.

На две площади поверхности 25 см<sup>2</sup>, ограниченные трафаретами, наносят по 0,1 см<sup>3</sup> инокулята бактериальной тест-культуры, распределяют его по поверхности, подсушивают. На первый участок подсушенной поверхности наносят дезинфицирующее средство в количестве 1 см<sup>3</sup> и распределяют по поверхности, второй участок обрабатывают 1 см<sup>3</sup> стерильной воды (контроль). Экспозиция равна принятой на производстве. Затем наносят раствор нейтрализатора в количестве 10 см<sup>3</sup> для снятия остаточного действия дезинфектанта и высушивают поверхность 1 ч. Отбирают пробу с поверхности, используя контактную чашку. Инкубируют чашки при 30–35°C в течение 3 сут.

**Учет результатов.** В испытании должна достигаться полная деконтаминация поверхности после заданного времени экспозиции.

## 4.9. Лабораторная работа

### Установление антимикробной активности антисептиков

Кожные антисептики должны:

- обладать широким спектром антимикробного действия за короткое время;
- убивать транзиторную микрофлору и снижать количество резидентной микрофлоры;
- обеспечивать обеззараживание кожных покровов в течение от 30 с до 5 мин (в зависимости от назначения);
- обладать пролонгированным антимикробным (остаточным) действием в пределах от 1 до 3 ч;
- быть безопасными в рекомендованных режимах применения при многократном использовании.

Целью изучения кожных антисептиков является разработка эффективных режимов обеззараживания кожных покровов в зависимости от концентрации активно действующих веществ, времени воздействия, а также способа и кратности обработки.

До изучения эффективности кожных антисептиков, предназначенных для гигиенической обработки рук, определяют спектр их антимикробного действия, используя батистовые тест-объекты, контаминированные музейными штаммами тест-микроорганизмов: для оценки бактерицидной активности – *E. coli*, *S. aureus*, *Ps. aeruginosa*; туберкулоцидной активности – бактерии рода *Mycobacterium*; фунгицидной активности – *C. albicans*; вирулицидной активности – вирус полиомиелита 1 типа.

Методы изучения эффективности кожных антисептиков для гигиенической обработки рук включают определение эффективности кожного антисептика в отношении естественной микрофлоры кожи рук и при искусственной контаминации их тест-микроорганизмом.

При анализе результатов испытаний антисептиков рекомендуются устанавливать связь эффективности биоцидного действия с составом препарата антисептика, режимом обработки (концентрацией действующего вещества, экспозицией), бионагрузкой.

**Цель работы:** оценка антимикробной (бактерицидной) активности антисептиков, используемых для обработки рук персонала фармацевтических производств.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред и нейтрализатора (подразд. 2.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды, питательных сред и растворов, мембранных и бумажных фильтров. 3. Приготовление рабочих суспензий тест-культур и определение их биологических концентраций (п. 4.6.1). 4. Установление антимикробной активности антисептиков в отношении общей микробиоты кожи рук. 6. Установление антимикробной активности антисептиков в отношении искусственно контаминированной тест-микроорганизмом кожи рук. 7. Изучение пролонгированного антимикробного действия кожных антисептиков. 8. Анализ результатов оценки антимикробной активности антисептиков, вывод о соответствии бактерицидной активности заявленному производителем эффекту.

#### **4.9.1. Изучение эффективности кожных антисептиков в отношении общей микробиоты кожи рук**

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 37°C.

**Питательные среды и реактивы:** ПА или ГРМ-агар (п. 1.3.1), ЖСА (п. 1.3.4), среда Эндо (п. 1.3.2), нейтрализатор (подразд. 4.3).

**Проведение анализа.** С контрольной руки до обработки кожным антисептиком делают смыв стерильной марлевой салфеткой, смоченной стерильным раствором нейтрализатора. Затем обе руки обрабатывают кожным антисептиком, после чего с опытной руки делают смыв стерильной марлевой салфеткой размером 5×5 см, смоченной в стерильном растворе нейтрализатора.

Марлевые салфетки помещают в отдельные широкогорлые пробирки со стеклянными бусами и 10 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора и отмывают в течение 10 мин. Затем смывную жидкость вносят по 0,5 см<sup>3</sup> в чашку Петри и заливают полноценной питательной средой для бактерий, по 0,2 см<sup>3</sup> на среду Эндо и желточно-солевой агар. Посевы инкубируют в термостате при 37°C в течение 48 ч, после чего подсчитывают выросшие колонии.

**Учет результатов.** Критерий эффективности антисептика – снижение общей микробной обсемененности кожи не менее чем на 95%.

#### **4.9.2. Изучение эффективности кожных антисептиков в отношении искусственно контаминированной тест-микроорганизмом кожи рук**

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 37°C.

**Питательные среды и реактивы:** ПА или ГРМ-агар (п. 1.3.1), среда Эндо (п. 1.3.2), нейтрализатор (подразд. 4.3).

**Проведение анализа.** Для искусственной контаминации кожи рук испытуемых используют суспензию 18–20-часовой бульонной культуры *E. coli*, выращенной в термостате при температуре 37°C.

На ладонь наносят 1 см<sup>3</sup> суспензии, содержащей 10<sup>7</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>, и равномерно распределяют ее по поверхности кисти рук. После подсыхания микробной взвеси в течение 2–3 мин с контрольной руки делают смыв стерильной марлевой салфеткой, смоченной стерильным раствором нейтрализатора. После смыва руку осушают стерильным ватным тампоном для удаления остатков жидкости. Затем обе руки обрабатывают кожным антисептиком, после чего с опытной руки также делают смыв, как с контрольной.

Смывы с кожи рук и посев их на питательную среду Эндо делают так, как указано в п. 4.9.1, только без посева на ЖСА.

**Учет результатов.** Критерий эффективности антисептика – снижение обсемененности кожи тест-микроорганизмом *E. coli* не менее чем на 99,99%.

#### **4.9.3. Изучение пролонгированного антимикробного действия кожных антисептиков**

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 37°C.

**Питательные среды и реактивы:** ПА или ГРМ-агар (п. 1.3.1), ЖСА (п. 1.3.4), среда Эндо (п. 1.3.2), нейтрализатор (подразд. 4.3).

**Проведение анализа.** Руки испытуемых обрабатывают кожным антисептиком в течение 0,5–1,0 мин. Затем с одной (контрольной) руки у каждого испытуемого делают смыв стерильной марлевой салфеткой, смоченной стерильным раствором нейтрализатора, после чего испытуемые выполняют работу на своем рабочем месте, но в течение всего эксперимента (от 0,5 до 3 ч) не моют руки водой и туалетным мылом. Смывы с другой (опытной) руки делают

стерильной марлевой салфеткой, смоченной в стерильном растворе нейтрализатора, через каждый час от начала эксперимента (от 30 мин до 3 ч). Каждый час смывы делают у разных испытуемых. Марлевые салфетки после взятия смывов помещают в отдельные широкогорлые пробирки со стерильным физиологическим раствором (по 10 см<sup>3</sup> в каждой) и стеклянными бусами, встряхивают в течение 10 мин. Затем производят посев смывной жидкости из опытных и контрольных пробирок на полноценную питательную среду для бактерий, как указано в п. 4.9.1. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37°C в течение 48 ч, после чего подсчитывают выросшие колонии.

**Учет результатов.** Если кожный антисептик обладает пролонгированным антимикробным действием, то на протяжении нескольких часов после обработки им рук количество микроорганизмов, обнаруживаемое в смывах, остается минимальным (по сравнению с тем количеством, которое обнаруживается сразу после обработки рук антисептиком).

#### **4.10. Лабораторная работа**

##### **Оценка микробиологической загрязненности антисептиков и дезинфектантов на фармацевтическом производстве**

Почти все антимикробные вещества, применяемые для дезинфекции и антисептики, могут содержать микроорганизмы-контаминанты. Наиболее часто контаминированными оказываются растворы ЧАС (четвертичные аммониевые соединения) и другие ПАВ, растворы хинонов, перекиси водорода, формальдегида и др. Более 80% микроорганизмов-контаминантов представлено бактериями рода *Pseudomonas*.

Последствием использования контаминированных растворов дезинфектантов и антисептиков является опасность загрязнения готового продукта и распространение полирезистентных штаммов микроорганизмов.

Недавно проведено сравнительное исследование активности дезинфектантов в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa*, находящихся в форме суспензии (планктон) на поверхностях объектов, а также в составе биопленок. Показано, что более 80% клинических

штаммов *P. aeruginosa* способны образовывать биопленку на поверхности полистирола. В исследовании использованы рабочие растворы четырех ДС производства Республики Беларусь и Российской Федерации: «Хлормисепт-Р» (активный антимикробный компонент – натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты), «Комбинированный дезинфектант» (активные антимикробные компоненты – глутаровый альдегид, смесь четвертичных аммониевых соединений, изопропанол), «Полидез» (активные антимикробные компоненты – водорастворимый полимер на основе производных гуанидина, бензалкония хлорид), «Гексаниос Г + Р» (активные антимикробные компоненты – четвертичные аммонийные соединения, гуанидин). Активные в отношении синегнойной палочки препараты в порядке убывания активности распределяются следующим образом: «Хлормисепт-Р» – «Комбинированный дезинфектант» – «Полидез» – «Гексаниос Г + Р». Достоверное снижение активности дезинфектанта при действии на биопленки по сравнению с планктонными культурами установлены только в отношении ДС «Полидез». Удельный вес резистентных штаммов *P. aeruginosa* (при выбранных рабочих режимах) составил для ДС «Хлормисепт-Р» и «Комбинированный дезинфектант» 10–20%, для ДС «Полидез» и «Гексаниос Г + Р» – 90–100%.

Контроль антисептических и дезинфицирующих средств проводится для антисептических и дезинфицирующих средств, применяемых в чистых зонах типа А, В, С, D. Во время микробиологического мониторинга отбирают пробу объемом 100 см<sup>3</sup> в стерильные флаконы, проводят испытание методом мембранной фильтрации. Микробиологические требования к дезинфицирующим средствам для помещений класса чистоты А, В, С – стерильно, КОЕ/100 см<sup>3</sup>, а для помещения класса D – 5 КОЕ/100 см<sup>3</sup> (предупредительный), 10 КОЕ/100 см<sup>3</sup> (требующий принятия мер). Антисептические средства для помещений классов чистоты А, В, С, D должны быть стерильны.

При анализе результатов испытаний антисептиков и дезинфектантов рекомендуется устанавливать связь микробиологической контаминации со сроками хранения и годности основного и рабочего растворов, условиями хранения основного раствора и приготовления рабочего раствора, составом препарата антисептика и дезинфектанта.

**Цель работы:** оценка качественного и количественного состава микроорганизмов-контаминантов в рабочих растворах антисептиков и дезинфектантов, используемых на фармацевтическом производстве.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред и нейтрализатора (подразд. 2.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды, питательных сред и растворов, мембранных и бумажных фильтров. 3. Приготовление рабочих растворов антисептиков (если требуется) и дезинфектантов (п. 4.6.2). 4. Установление количества бактериальной и грибной микробиоты в рабочих растворах антисептиков и дезинфектантов методом мембранной фильтрации. 5. Идентификационные испытания (п. 3.6.7). 6. Анализ результатов оценки микробной контаминации рабочих растворов антисептиков и дезинфектантов, вывод о соответствии их микробиологической чистоты предъявляемым к ним требованиям.

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C, суховоздушный термостат на температурный режим 20–25°C, установка мембранной фильтрации открытого типа.

**Питательные среды и реактивы:** агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (альтернативно среда № 1), декстрозный агар Сабуро без добавления антибиотиков (альтернативно среда № 2), раствор для промывки мембраны или физиологический раствор (подразд. 2.3).

**Проведение анализа.** В стерильный флакон объемом 250 см<sup>3</sup>, укупоренный пробкой, отбирают пробу рабочего раствора дезинфектанта или антисептика объемом 100 см<sup>3</sup>. Установку для фильтрования подготавливают так, как описано в подп. 1.4.3.1. Мембранный фильтр смачивают небольшим количеством стерильного физиологического раствора, затем переносят на него отобранную пробу рабочего раствора дезинфектанта или антисептика, фильтруют, промывают каждый фильтр путем пропускания через него раствора для промывки мембраны. Число циклов промывки должно быть не более 5 из расчета по 100 см<sup>3</sup> на фильтр. Помещают фильтр с задержанными на нем микроорганизмами на чашки Петри с соответствующими питательными средами и инкубируют в подходящих условиях. Для определения общего количества жизнеспособных аэробов первый фильтр переносят на чашку Петри с агаризованной средой на основе гидролизата казеина и соевого белка или на среду № 1. Инкубируют 2 и 5 сут при 30–35°C. Второй фильтр,

предназначенный для определения общего количества грибов, переносят на чашку Петри с декстрозным агаром Сабуро или на среду № 2. Инкубируют 3 и 5–7 сут при 20–25°C.

**Учет результатов.** Подсчитывают количество колоний, ответ дают в размерности «КОЕ/100 см<sup>3</sup>».

#### **4.11. Лабораторная работа**

##### **Оценка бионагрузки на антимикробную активность рабочих растворов дезинфицирующих средств на фармацевтическом производстве**

Бионагрузка – популяция живых микроорганизмов на (в) объекте, подготовленном к антимикробной обработке, например, в лекарственном средстве или на упаковочных материалах до стерилизации, на поверхности перед химической дезинфекцией.

Например, контроль микробной контаминации растворов лекарственных средств перед стадией стерилизующей фильтрации (оценка бионагрузки на мембранный фильтр) проводится с целью получения объективной информации для оценки эффективности управления факторами, влияющими на качество процессов и продукции. Контроль осуществляется для каждой серии продукции, наполненной в асептических условиях, и продукции, подвергаемой конечной стерилизации. Отбор проб (100 см<sup>3</sup>) проводят из корпуса стерилизующего фильтра в конце стадии стерилизующей фильтрации в стерильный флакон объемом 250 см<sup>3</sup>, укупоренный пробкой. Испытание проводят методом мембранной фильтрации на установках мембранной фильтрации открытого типа. Число колоний на фильтре в чашке Петри не должно превышать 10 КОЕ на 100 см<sup>3</sup> испытуемого образца.

Изучение влияния возрастающей бионагрузки при дезинфекционной обработке позволяет определить способность антимикробного агента сохранять активность и оценить время сохранения им антимикробной активности.

**Цель работы:** оценка антимикробной активности рабочих растворов дезинфицирующих средств в условиях обычной и возрастающей бионагрузки.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред и нейтрализатора (подразд. 2.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды, питательных сред и растворов, мембранных и бумажных фильтров. 3. Приготовление рабочих суспензий тест-культур и определение их биологических концентраций (п. 4.6.1). 4. Приготовление рабочих растворов дезинфектантов (п. 4.6.2). 5. Установление антимикробной активности рабочих растворов дезинфицирующих средств в условиях обычной бионагрузки. 6. Установление антимикробной активности рабочих растворов дезинфицирующих средств в условиях обычной и возрастающей бионагрузки (не менее 3-кратной). 7. Анализ результатов оценки влияния бионагрузки на антимикробную активность рабочих растворов дезинфицирующих средств, вывод о предельной для условий эксперимента бионагрузке.

#### **4.11.1. Установление антимикробной активности рабочих растворов дезинфицирующих средств в условиях обычной бионагрузки**

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C, суховоздушный термостат на температурный режим 20–25°C.

**Питательные среды и реактивы:** агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (альтернативно среда № 1), декстрозный агар Сабуро без добавления антибиотиков (альтернативно среда № 2), раствор для промывки мембраны или физиологический раствор, нейтрализатор (подразд. 2.3).

**Проведение анализа.** В стерильный флакон объемом 250 см<sup>3</sup> с соблюдением условий асептики отбирают 100 см<sup>3</sup> рабочего раствора дезинфицирующего средства. Взвесь тест-микроорганизмов с ориентировочной концентрацией  $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup> вносят в рабочий раствор антимикробного препарата так, чтобы конечная концентрация микроорганизмов в полученной суспензии составила  $1 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup> (рекомендуемый объем 1 см<sup>3</sup>). После экспозиции в течение времени, указанного в инструкции производителя (обычно 2–60 мин), отбирают аликвоту (0,1 см<sup>3</sup>) суспензии клеток в рабочем растворе дезинфицирующего средства и вносят ее в пробирку с 1 см<sup>3</sup> нейтрализатора.

Для проведения качественного теста делают высеv бактериологической петлей на подходящую полноценную агаризованную среду для определения жизнеспособности тест-культуры.

Для проведения количественного теста делают высеv на полноценную агаризованную среду по методу Коха и подсчитывают выросшие колонии. Контролем является суспензия той же культуры тест-микроорганизмов, не подвергшаяся действию антимикробного агента.

Чашки Петри с агризованной средой на основе казеина и соевых бобов (или средой № 1) инкубируют при температуре 30–35°C в течение 1–2 сут. Чашки Петри с агаром Сабуро (или средой № 2) инкубируют при температуре 20–25°C в течение 2–4 сут. Подсчитывают количество колоний, рассчитывают концентрацию клеток тест-микроорганизмов в суспензии.

**Учет результатов.** Антимикробную активность,  $A$ , определяют по формуле

$$A = \lg(N_k) - \lg(N_{on})$$

где  $N_k$  – количество колоний, выросших при посеве контроля;  $N_{on}$  – количество колоний, выросших при посеве суспензии тест-микроорганизмов, обработанной антимикробным агентом.

Антимикробная активность рабочих растворов дезинфектантов должна составлять не менее 3.

#### **4.11.2. Установление антимикробной активности рабочих растворов дезинфицирующих средств в условиях возрастающей бионагрузки**

Для испытания используют те же оборудование, питательные среды и реактивы, суспензию тест-микроорганизмов и однократно контаминированный рабочий раствор дезинфицирующего средства, что и в п. 4.11.1.

**Проведение испытания.** В однократно контаминированный рабочий раствор дезинфектанта по п. 4.11.1 после первой экспозиции и отбора пробы добавляют еще 1 см<sup>3</sup> суспензии микроорганизмов с концентрацией 10<sup>5</sup>–10<sup>7</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> и выдерживают еще один период экспозиции, затем аналогично описанному в п. 4.11.1 делают высеv на плотную среду для определения числа колоний. Те же действия повторяют еще один-три раза.

**Учет результатов.** Рассчитывают антимикробную активность для каждого из экспериментов:  $A_1, A_2, \dots, A_i, \dots, A_n$  (где  $n$  – число экспериментов,  $i$  – порядковый номер эксперимента), используя формулу на с. 125. В расчетах  $N_{k_i}$  принимают равным произведению количества колоний, выросших при посеве контроля, и порядкового номера эксперимента (таким образом, учитывается кратность внесенных аликвот суспензии тест-микроорганизмов). Результаты работы записывают в виде таблицы из двух столбцов, в первом –  $N_{k_i}$ , во втором –  $A_i$ . Строят графическую зависимость по полученным данным, откладывая по оси абсцисс численные значения  $N_{k_i}$ , по оси ординат –  $A_i$ . К серии данных добавляют линию тренда, находят точку пересечения графика с горизонтальной прямой, пересекающей ось ординат при численном значении 3, соответствующем приемлемой для рабочих растворов дезинфектантов антимикробной активности. Делают вывод о предельно допустимой бионагрузке по тест-микроорганизму, использованному в испытании.

#### **4.12. Лабораторная работа**

##### **Установление эффективности работы стерилизующих устройств**

Эффективность стерилизации оценивают на основании результатов бактериологических исследований в сочетании с удовлетворительными результатами контроля физическим и химическим методами. Под контролем стерильности понимают определение наличия микроорганизмов, способных к размножению на предметах, изделиях, поверхностях, подвергнутых стерилизации. Критерием эффективности является полная инактивация микроорганизмов всех видов. Кратность контроля стерильности – не реже 1 раза в полгода, она может быть увеличена до 1 раза в месяц или 1 раза в квартал.

При испытании химических индикаторов первого класса процесса стерилизации используют дозу активного агента, соответствующую рекомендуемой для стерилизационной обработки, при варьировании экспозиции. Например, для паровой стерилизации при температуре 121°C и времени обработки 10 мин в автоклаве индикатор должен изменить цвет, а при времени обработки 3 мин цвет должен остаться неизменным. Дополнительно проводят испытание

в сухом воздухе – выдерживают в сухожаровом шкафу при 140°C в течение 30 мин, чтобы убедиться, что индикаторы процесса для паровой стерилизации достигают конечного состояния только в паре: видимое изменение цвета не должно наблюдаться. Для испытания химических индикаторов первого класса воздушной (сухожаровой) стерилизации их выдерживают при температуре 160°C и времени обработки 20 и 40 мин в сухожаровом шкафу. В первом случае цвет индикатора должен остаться неизменным, во втором – изменить цвет.

Интегрирующие индикаторы пятого класса для контроля и паровой, и воздушной стерилизации разработаны так, чтобы реагировать на критические переменные режима стерилизации аналогично биологическим индикаторам.

Химические индикаторы следует располагать около центра каждой загрузки и ближе к нижней передней части автоклава. В сухожаровую печь индикаторы раскладываются по принципу конверта: четыре по углам, один в середине.

При анализе результатов испытаний оценки эффективности работы стерилизующих устройств рекомендуется устанавливать связь с режимом термической стерилизации (наличием или отсутствием водяного пара, температурой и экспозицией).

**Цель работы:** оценка эффективности работы автоклава и сухожарового шкафа, используемых для стерилизации питательных сред и лабораторной посуды.

**Этапы выполнения работы.** 1. Подготовка химических и биологических индикаторов, изучение порядка их применения (п. 4.12.1–4.12.4). 2. Размещение химических и биологических индикаторов в соответствии с рекомендациями выбора контрольных точек в автоклаве и сухожаровом шкафу. 3. Проведение термической стерилизации двух вариантах: первый – в штатном режиме при рекомендованных параметрах, второй – при соблюдении температуры стерилизации и уменьшенном в 2–3 раза времени экспозиции. Для контроля параметров стерилизации используют физические способы оценки – измерение температуры термопарой или термометром, давления пара в автоклаве манометром, времени стерилизации с использованием часов. 4. Оценка эффективности работы автоклава и сухожарового

шкафа по изменению цвета маркерных меток на химических индикаторах (п. 4.12.1, 4.12.2) и цвету питательной среды, инкубированной обработанными в ходе термической стерилизации эндоспорами бактерий рода *Bacillus* (п. 4.12.3, 4.12.4). 5. Анализ результатов оценки эффективности работы автоклава и сухожарового шкафа, вывод о соответствии выбранного режима обработки условию гарантированной стерилизации.

#### **4.12.1. Порядок применения индикаторов химических одноразовых для контроля паровых стерилизаторов**

Индикаторы представляют собой пластину, на лицевой поверхности которой нанесены маркировка, элемент сравнения и индикаторная метка, обозначение контролируемого режима стерилизации – температуры и времени выдержки, на тыльной стороне липкий слой, закрытый защитной бумагой.

Перед использованием отрывают отдельные индикаторы от листа по линии перфорации, предварительно сгибая по ней. Индикаторы используют, закладывая их как внутрь стерилизуемых упаковок с изделиями, так и вне стерилизуемых упаковок.

**Учет результатов.** При соблюдении условий стерилизации цвет индикаторной метки необратимо меняется и достигает цвета элемента сравнения или становится темнее, при нарушениях условий стерилизации цвет индикаторной метки отличается от цвета элемента сравнения. Изменение исходного цвета индикаторной метки (меток) на конечный происходит постепенно при увеличении времени выдержки в паровом стерилизаторе.

#### **4.12.2. Порядок применения индикаторов воздушной стерилизации химических бумажных одноразовых**

Индикатор представляет собой прямоугольной формы бумажную полоску с нанесенными на лицевой стороне двумя цветовыми метками: индикаторной меткой голубого цвета, элементом сравнения коричневого цвета и маркировки, включающей: товарный знак или наименование предприятия-изготовителя; обозначение «ВОЗД» контролируемого воздушного метода стерилизации; обозначение контролируемого режима стерилизации – температуры и времени выдержки.

На обратной стороне индикатора нанесен липкий слой, закрытый двумя половинками защитной бумаги, служащий для его фиксации в месте контроля и в качестве документа архива. Индикатор не оставляет следов на материалах, с которыми соприкасается до, в процессе и после стерилизации.

Количество индикаторов, закладываемых в стерилизатор, зависит от объема камеры стерилизатора (табл. 16), индикаторы размещают по принципу конверта (четыре по углам прямоугольника, один в центре).

Таблица 16

**Рекомендуемое количество контрольных точек  
при контроле режима стерилизации**

| Объем камеры воздушного стерилизатора, дм <sup>3</sup> | Количество контрольных точек |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|
| До 80 включительно                                     | 5                            |
| Свыше 80 однокамерные                                  | 15                           |
| Свыше 80 двухкамерные                                  | 30 (по 15 в каждой камере)   |

В воздушных стерилизаторах индикаторы следует помещать на расстоянии не менее 5 см от стенок стерилизационной камеры.

От листа с индикаторами по линии перфорации отделяют необходимое количество индикаторов и нумеруют их в соответствии с нумерацией контрольных точек. Индикаторы помещают в камеру стерилизатора с внешней стороны упаковок и контейнеров со стерилизуемыми изделиями, придерживаясь расположения контрольных точек. В каждую точку помещают не менее одного индикатора. Для закрепления индикатора с его обратной стороны удаляют часть защитного бумажного покрытия, закрывающего липкий слой со стороны логотипа по линии надсечки и приклеивают индикатор освободившимся липким слоем к внешней стороне стерилизуемых объектов, по возможности придерживаясь расположения контрольных точек. Закрепление индикаторов производят: при использовании бумажных пакетов – на заклеивающийся клапан пакета; при использовании листовых бумажных оберточных материалов – на оставшийся свободным после заворачивания угол бумаги; при использовании стерилизационных контейнеров – на бирку контейнера.

**Учет результатов.** По окончании цикла стерилизации неприклеенную часть индикатора с цветовыми метками отрывают по линии

перфорации от приклеенной части и оценивают изменение цвета индикаторной метки каждого индикатора. При соблюдении параметров воздушной стерилизации индикаторная метка должна приобретать коричневый цвет, в соответствии с цветом эталона сравнения, или быть светлее либо темнее его. Если индикаторная метка хотя бы одного индикатора сохранила исходный голубой цвет или приобрела зеленый цвет, значит, не были соблюдены требуемые значения критических переменных режима стерилизации в камере стерилизатора и все изделия загрузки считаются нестерильными и подлежат повторной стерилизации после устранения причин неудовлетворительных результатов контроля.

#### **4.12.3. Порядок применения индикаторов биологических одноразовых для контроля паровой стерилизации**

Индикатор является автономным и представляет собой пластиковую пробирку, на дно которой помещены высушенные споры тест-микроорганизмов. Внутри пластиковой пробирки размещена стеклянная ампула, содержащая стерильную индикаторную среду. Пластиковая пробирка закрыта колпачком, имеющим отверстия. Между колпачком и пробиркой размещен бактериальный фильтр, защищающий содержимое индикатора от контаминации, но не препятствующий проникновению стерилизующего агента. На этикетку с маркировкой индикатора нанесен химический индикатор первого класса, позволяющий отличить биологические индикаторы, прошедшие стерилизацию, от индикаторов, не обработанных в стерилизаторе.

Перед закладкой в камеру стерилизатора индикаторы необходимо пронумеровать. Закладку индикаторов в камеру парового стерилизатора производят в соответствии со схемой размещения контрольных точек, не менее одного индикатора в каждой контрольной точке.

После стерилизации каждый индикатор вынимают из стерилизационной камеры и охлаждают до комнатной температуры в течение 10 мин. В качестве контроля используют индикатор, который не подвергают стерилизации. Индикаторы активируют по окончании цикла стерилизации (но не более чем через 3 сут после окончания стерилизации). Для активации индикатора его нижнюю часть помещают в углубление ломателя. Удерживая индикатор в вертикальном положении колпачком вверх, при помощи ломателя раздавливают ампулу с индикаторной средой. Процедуру активации проводят для каждого

индикатора, включая контрольный. Инкубирование активированных индикаторов осуществляют при температуре 55°C в течение 48 ч.

**Учет результатов.** Визуально осматривают индикаторы. Исходная индикаторная среда имеет сине-фиолетовый цвет. Изменение цвета индикаторной среды на желтый хотя бы одного активированного индикатора, обработанного в стерилизаторе, свидетельствует о росте микроорганизмов и показывает, что споры микроорганизмов при паровой стерилизации не погибли, следовательно, стерилизационный цикл не обеспечивает необходимую эффективность стерилизации и результаты контроля считаются отрицательными. Сохранение исходного сине-фиолетового цвета индикаторной среды всех обработанных в стерилизаторе индикаторов указывает на обеспечение необходимой эффективности паровой стерилизации. Результаты контроля индикаторами верны только в случае, если цвет индикаторной среды контрольного индикатора (не обработанного в паровом стерилизаторе) после активации меняется на желтый.

#### **4.12.4. Порядок применения индикаторов биологических одноразовых для контроля воздушной стерилизации ускоренного чтения**

Индикатор биологический представляет собой инокулированный высушенными спорами тест-микроорганизмов носитель в виде стеклянного флакона, закрытого пробкой, закатанной алюминиевым колпачком. На этикетку с маркировкой индикатора нанесен химический индикатор первого класса, позволяющий отличить биологические индикаторы, прошедшие стерилизацию, от индикаторов, не обработанных в стерилизаторе.

Перед использованием необходимо проверить срок годности индикаторов и целостность стерилизационной упаковки. Перед закладкой в камеру стерилизатора индикаторы необходимо пронумеровать, количество индикаторов и их порядковая нумерация соответствуют схеме размещения и номерам контрольных точек.

После стерилизации каждый индикатор вынимают из стерилизационной камеры и охлаждают до комнатной температуры. В качестве контроля используют индикатор, который не подвергают стерилизации. Для контроля среды используют стерильный флакон. Заранее готовят стерильные перчатки, спиртовые ватные тампоны в стерильном лотке. Перед проведением процедуры активации руки моют дезинфицирующим мылом или обрабатывают

дезинфицирующим средством. Надевают стерильные перчатки, открывают шприц со стороны поршня. Пинцетом отгибают среднюю часть алюминиевых крышек на флаконах со средой, индикаторах и флаконе для контроля среды. Поверхность крышек обрабатывают спиртовыми тампонами, затем набирают в шприц индикаторную среду и, прокалывая пробку ближе к центру, вводят 0,5–1,0 см<sup>3</sup> среды в каждый индикатор, включая контрольный, не обработанный в стерилизаторе, и флакон для контроля среды.

Индикаторы активируют по окончании цикла стерилизации (но не более чем через 3 сут после окончания стерилизации). Инкубирование активированных индикаторов проводят при температуре 47°C в течение 8–24 ч.

**Учет результатов.** Визуально осматривают индикаторы. Исходная индикаторная среда имеет красный цвет. Изменение цвета индикаторной среды на желтый хотя бы одного активированного индикатора, обработанного в стерилизаторе, свидетельствует о росте микроорганизмов и показывает, что споры микроорганизмов при стерилизации не погибли, следовательно, стерилизационный цикл не обеспечивает необходимую эффективность стерилизации. Сохранение исходного цвета индикаторной среды всех обработанных в стерилизаторе индикаторов указывает на обеспечение необходимой эффективности стерилизации. Результаты контроля индикаторами верны только в случае, если цвет индикаторной среды контрольного индикатора (не обработанного в стерилизаторе) меняется на желтый, а цвет индикаторной среды в стерильном флаконе остается неизменным.

При прорастании спор тест-микроорганизмов хотя бы одного индикатора, обработанного в стерилизаторе, результаты контроля считаются отрицательными.

#### **4.13. Лабораторная работа**

##### **Испытание на эффективность консервантов в составе лекарственных средств**

Испытание состоит во внесении в готовое лекарственное средство, по возможности находящееся в контейнере, количества подходящих микроорганизмов и хранении инокулированного образца при заданной температуре, извлечении проб из инокулированных

образцов через определенный промежуток времени и определении в нем числа микроорганизмов.

Эффективность консерванта в готовом лекарственном средстве считают удовлетворительной, если в условиях проведения испытаний при хранении инокулированных образцов при заданной температуре в течение указанных промежутков времени наблюдается значительное уменьшение числа микроорганизмов. Критерием оценки антимикробной активности консервантов является разность десятичных логарифмов числа жизнеспособных микроорганизмов в инокуляте с учетом разбавления в результате внесения его в образец лекарственного средства и числа жизнеспособных микроорганизмов в образце лекарственного средства после экспозиции в течение определенных периодов времени.

Требования Государственной фармакопеи Республики Беларусь к консервантам лекарственных средств зависят от необходимой степени защиты готового лекарственного средства (табл. 17).

Таблица 17

**Рекомендуемая эффективность консервантов  
для лекарственных средств**

| Микроорганизмы                                                                                                        | Критерий       | lg уменьшения через |      |       |       |        |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------|------|-------|-------|--------|--------|
|                                                                                                                       |                | 6 ч                 | 24 ч | 2 сут | 7 сут | 14 сут | 28 сут |
| <i>Лекарственные средства для парентерального, офтальмологического, внутриматочного и интраграммарного применения</i> |                |                     |      |       |       |        |        |
| Бактерии                                                                                                              | A              | 2                   | 3    | —     | —     | —      | НВ     |
|                                                                                                                       | B              | —                   | 1    | —     | 3     | —      | НУ     |
| Грибы                                                                                                                 | A              | —                   | —    | —     | 2     | —      | НВ     |
|                                                                                                                       | B              | —                   | —    | —     | —     | 1      | НУ     |
| <i>Лекарственные средства для ушного, назального, местного применения, ингаляционные лекарственные средства</i>       |                |                     |      |       |       |        |        |
| Бактерии                                                                                                              | A              | —                   | —    | 2     | 3     | —      | НУ     |
|                                                                                                                       | B              | —                   | —    | —     | —     | 3      | НУ     |
| Грибы                                                                                                                 | A              | —                   | —    | —     | —     | 2      | НУ     |
|                                                                                                                       | B              | —                   | —    | —     | —     | 1      | НУ     |
| <i>Лекарственные средства для перорального, ректального применения</i>                                                |                |                     |      |       |       |        |        |
| Бактерии                                                                                                              | (без критерия) | —                   | —    | —     | —     | 3      | НУ     |
| Грибы                                                                                                                 |                | —                   | —    | —     | —     | 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.

В качестве тест-микроорганизмов используют *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*.

**Цель работы:** оценка эффективности антимикробных консервантов в составе стерильных и нестерильных лекарственных средств.

**Этапы выполнения работы.** 1. Приготовление питательных сред (подразд. 2.3). 2. Подготовка к стерилизации микробиологической посуды, питательных сред и растворов, бумажных фильтров. 3. Подготовка посевного материала (инокулята) (п. 4.13.1). 4. Приготовление рабочих растворов дезинфектантов (п. 4.6.2). 5. Установление эффективности консервантов в составе стерильных и нестерильных лекарственных средств. 6. Анализ результатов оценки эффективности консервантов в составе стерильных и нестерильных лекарственных средств, вывод о соответствии консерванта в составе лекарственного средства предъявляемым критериям.

#### **4.13.1. Подготовка посевного материала (инокулята)**

**Оборудование:** суховоздушный термостат на температурный режим 30–35°C, суховоздушный термостат на температурный режим 20–25°C.

**Питательные среды и реактивы:** агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов (альтернативно среда № 1), декстрозный агар Сабуро без добавления антибиотиков (альтернативно среда № 2), физиологический раствор (подразд. 2.3).

**Порядок работы.** Для подготовки к испытанию свежевыращенную культуру каждого тест-микроорганизма пересевают на поверхность плотной питательной на основе гидролизата казеина и соевых бобов в случае выращивания бактерий или декстрозного агара Сабуро без добавления антибиотиков в случае выращивания грибов. Культуры бактерий инкубируют при температуре 30–35°C в течение 18–24 ч; культуру *C. albicans* инкубируют при температуре 20–25°C в течение 48 ч и культуру *Asp. brasiliensis* – при температуре 20–25°C в течение 7 сут до получения хорошо развитых спор.

Для приготовления суспензии бактериальных культур и культуры *C. albicans* микробную массу смывают с питательной среды стерильным физиологическим раствором и переносят в подходящий

сосуд. Затем с помощью той же жидкости доводят содержание микроорганизмов до  $10^8$  кл. в  $1\text{ см}^3$ . Для приготовления суспензии споровых форм культуры *A. brasiliensis* используют стерильный физиологический раствор, содержащий дополнительно полисорбат 80 в концентрации  $0,5\text{ г/дм}^3$ , и с его помощью доводят содержание спор до приблизительно  $10^8$  в  $1\text{ см}^3$ .

Из каждой суспензии немедленно отбирают  $1\text{ см}^3$ , делают ряд последовательных разведений в физиологическом растворе и определяют число колониеобразующих единиц в  $1\text{ см}^3$  (КОЕ/  $\text{см}^3$ ) каждой суспензии методом прямого посева на чашки или методом мембранной фильтрации. Полученное значение служит для определения числа жизнеспособных микроорганизмов в инокуляте. Инокулят используют немедленно после приготовления.

Для подсчета жизнеспособных микроорганизмов в инокулированных образцах применяют ту же плотную питательную среду, которая была использована для первоначального выращивания соответствующих микроорганизмов.

#### **4.13.2. Установление эффективности консервантов в составе стерильных и нестерильных лекарственных средств**

Оборудование, питательные среды и реактивы те же, что и в п. 4.13.1.

**Проведение анализа.** В каждый из контейнеров с испытуемым лекарственным средством вносят суспензию одного из тест-микроорганизмов до концентрации  $10^5$ – $10^6$  КОЕ в  $1\text{ см}^3$  (или  $1\text{ г}$ ) лекарственного средства. Объем суспензии должен составлять не более 1% от объема образца. Образец тщательно перемешивают для обеспечения равномерного распределения микроорганизмов.

Образцы лекарственных средств на твердой мазевой основе нагревают до температуры  $40$ – $45^\circ\text{C}$ , смешивают в течение не менее 1 мин до достижения гомогенной эмульсии. Для улучшения смешивания можно добавить определенное количество твина-80, если оно не влияет на жизнеспособность микроорганизмов или на эффективность консерванта.

Инокулированные образцы лекарственного средства выдерживают при температуре  $20$ – $25^\circ\text{C}$  в защищенном от света месте. Из каждого испытуемого образца отбирают пробы объемом  $1\text{ см}^3$

непосредственно после инокуляции и через подходящие интервалы времени 7, 14, 28 сут после инокуляции образцов препаратов 1-й категории и 14, 28 сут препаратов 2-й и 3-й категорий определяют количество жизнеспособных микроорганизмов в 1 см<sup>3</sup> образца методом посева на чашки из подходящего разведения или методом мембранной фильтрации. Антимикробную активность готового лекарственного средства следует устранить путем разведения, фильтрации или с помощью подходящего инактиватора, который вносят в чашки с питательной средой или в соответствующее разведение лекарственного средства перед посевом.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

---

### **Порядок подготовки к работе и эксплуатации ламинарного шкафа**

Убедитесь, что ламинарный шкаф правильно подключен к источнику электрического питания. Правильная работа ламинарного шкафа во многом зависит от его расположения и от рабочих навыков оператора. Ламинарные шкафы должны обеззараживаться перед монтажными работами и проведением тестирования, заменой НЕРА-фильтра, перемещением ламинарного шкафа в другое место, после пролития большого количества биологически опасного материала. Доступ в рабочую камеру обеспечивается через переднее окно, которое может находиться в различных положениях. При эксплуатации используют: рабочее положение с высотой открытия примерно на одну треть от высоты рабочей зоны (для доступа в камеру образцов в процессе работы), максимальную высоту открытия (для загрузки рабочей камеры) и полностью закрытое переднее окно с пониженной частотой вращения вентилятора (при деконтаминации, в том числе – с использованием ультрафиолетовой лампы (УФ-лампы)).

Для деконтаминации шкафа микробиологической защиты используются различные процедуры, выбор которых зависит от потенциального риска применения определенных средств и степени чистоты, необходимой для эксперимента или требуемой для рабочего процесса.

Возможные процедуры деконтаминации включают химическую дезинфекцию (либо стерилизацию) смачиванием и (или) распылением (стандартная процедура дезинфекции для шкафов, предназначенных для микробиологических экспериментов), дезинфекцию с использованием УФ-лампы (подходит в качестве усиливающей дополнительной процедуры после дезинфекции смачиванием и (или) распылением), паровую стерилизацию (может использоваться для обработки съемных частей из нержавеющей стали).

**Химическая стерилизация** (растворами формальдегида, 6%-ной перекисью водорода) выполняется после замены фильтров, перед выключением или утилизацией аппарата. Обработка проводится

парами формальдегида или продуктами разложения перекиси водорода в герметично закрытой рабочей камере. Количество используемого формальдегида зависит от объема рабочей камеры, подлежащего дезинфекции шкафа: на 1 м<sup>3</sup> объема рабочей камеры испаряют не менее 5 г формальдегида в 20 см<sup>3</sup> воды (соответствует 25 см<sup>3</sup> 20%-ного раствора формальдегида). Формальдегид испаряется сразу же при достижении точки кипения. Необходимое время экспозиции – 6 ч. По истечении требуемого времени реакции формальдегид необходимо нейтрализовать путем испарения 25%-ного аммиачного раствора (10 см<sup>3</sup> на 1 м<sup>3</sup> объема рабочей камеры). Для испарения раствора необходимо нагревательное устройство с емкостью. Порядок обработки парами перекиси водорода описан ниже при подготовке изолятора к работе.

**Химическая дезинфекция** (76%-ным этанолом, рабочим раствором подходящего средства для дезинфекции) включает три этапа: предварительную дезинфекцию, очистку, окончательную дезинфекцию.

Для проведения предварительной дезинфекции:

- достаньте образцы из камеры образцов и передайте их на хранение в подходящее место;

- извлеките принадлежности из шкафа микробиологической защиты и продезинфицируйте их методом, рекомендованным производителем. Рабочая поверхность и компоненты из нержавеющей стали могут быть извлечены из рабочей камеры и продезинфицированы отдельно;

- нанесите или распылите дезинфекционное средство на все поверхности рабочей камеры и протрите их. УФ-лампы тщательно протрите влажной салфеткой. Переключите аппарат в рабочий режим, оставьте дезинфектант для воздействия согласно рекомендациям производителя, затем переключите шкаф микробиологической защиты на как минимум 15–20 мин в рабочий режим, чтобы фильтры могли абсорбировать выделившиеся аэрозоли.

Для проведения чистки:

- тщательно удалите остатки грязи и отложения раствором теплой воды и раствором средства для мытья посуды, затем протрите поверхности, используя чистую салфетку и большое количество чистой воды;

- удалите остатки моющего раствора с днища и протрите все поверхности рабочей камеры насухо.

Для проведения окончательной дезинфекции снова нанесите или распылите дезинфекционное средство на все поверхности рабочей камеры, оставьте дезинфекционное средство для воздействия согласно рекомендациям производителя и протрите их начисто.

Для запуска процедуры **дезинфекции с помощью встроенной УФ-лампы** нужно полностью закрыть переднее окно, снизить расход воздуха, включить УФ-лампу, после 15–30 мин работы выключить ее.

Непосредственно перед работой протирают внутреннюю поверхность ламинарного шкафа этиловым спиртом, размещают в нем необходимые инструменты и материалы.

**Прежде чем начинать работу**, снимите украшения, наденьте необходимые средства личной защиты, например, рук, лица, тела. Руки моют с мылом, надевают перчатки, заправляя края халата в перчатки, дезинфицируют руки в перчатках 76%-ным этанолом, очищают и дезинфицируют внутренние поверхности камеры 96%-ным этанолом. Стерильные инструменты и материалы помещают на рабочий стол ламинарного шкафа. Дезинфицируют материалы перед внесением их в бокс. Включают прибор, затем нажимают кнопку вентилятора на дисплее для включения вентилятора. Через несколько минут прибор выйдет на рабочий режим. Для включения УФ-лампы лицевой экран должен быть полностью закрыт для защиты оператора от УФ-излучения. За 30 мин до работы в боксе выключают УФ-лампу и включают продувку.

**В ходе эксплуатации** образцы устанавливайте только на рабочую зону, в рабочей камере образцов не должно быть посторонних предметов. Используйте для рабочего процесса только продезинфицированные и очищенные принадлежности. Не делайте резких движений руками или туловищем в камере образцов и перед рабочим отверстием, которые бы могли вызывать турбулентность воздуха. Не устанавливайте в камеру образцов принадлежности, которые вызывают турбулентность воздуха или выделяют повышенное количество тепла (избыточные принадлежности, источники сжатого воздуха, пара или открытого пламени). Не нарушайте циркуляцию воздуха в вентиляционных щелях рабочей поверхности. При длительной работе с ламинарным боксом используйте регулируемое по высоте рабочее кресло с регулируемой спинкой.

**После завершения работы** достаньте образцы, посуду и материалы из рабочей камеры и передайте их на хранение в подходящее

место, очистите и продезинфицируйте поверхности рабочей камеры. Очистите и продезинфицируйте все принадлежности.

**Меры предосторожности** связаны с обеспечением ламинарного потока воздуха, поддержанием работоспособности НЕРА-фильтра и безопасности жизнедеятельности при проведении деконтаминации.

В ламинарном шкафу должен быть обеспечен ламинарный поток воздуха, поэтому нужно устранять или ограничивать препятствующие этому факторы: не должно использоваться открытое пламя, нужно избегать беспорядка, правильно располагать в рабочей зоне необходимые для работы предметы, хранить крупные предметы дальше от задней части бокса, сдерживать кашель, не совершать резких движений, убирать пакеты и внешнюю упаковку с края рабочей зоны, не помещать важные предметы вне потока стерильного воздуха.

Внутренняя поверхность НЕРА-фильтров хрупкая, может повредиться от прикосновения, поэтому надо избегать даже этого. Не распыляйте и не разбрызгивайте растворы на НЕРА фильтры, не вскрывайте ампулы и не регулируйте автоматические пипетки вблизи фильтров, не используйте вблизи них открытое пламя. НЕРА-фильтры ламинарного шкафа постепенно накапливают частицы из комнатного воздуха и рабочей зоны шкафа. Скорость накопления зависит от чистоты комнатного воздуха, времени работы прибора и типа работы, которая проводилась в приборе. Не допускается проводить ремонт помещения, в котором находится ламинарный шкаф.

При дезинфекции поверхности ламинарного шкафа избегайте попадания дезинфицирующего раствора на кожу или одежду, обеспечьте хорошую вентиляцию, следуйте инструкциям по безопасному использованию дезинфицирующих средств, не допускайте длительного контакта со стальными поверхностями ламинарного шкафа дезинфицирующих средств с высокой концентрацией свободного хлора из-за повышения вероятности коррозии стали. Следует избегать УФ-облучения пластиковых материалов.

## **Устройство изолятора и порядок подготовки его к работе**

Изолятор состоит из рабочей камеры и предкамеры, плотно соединенных с помощью вертикально выдвижного порта. Корпус изготовлен из нержавеющей стали, торцевая панель – из каленого

защитного стекла, уплотнитель стыков – силиконовая резина. Все внутренние изгибы камер изготовлены с закруглением, все сварные швы отшлифованы в ровную поверхность и отполированы, дно камеры выполнено как захватывающий поддон с уклоном до места слива. Перчатки цельные изготовлены из прочного полимерного материала, длина 800 мм, толщина 0,4 мм.

Проход в предкамеру из помещения микробиологической лаборатории осуществляется через пневматический управляемый герметично уплотненный передвижной порт с передней панелью из каленого защитного стекла и перфорированными решетками. В предкамере расположены держатель зонда для счетчика частиц, душ, головка для стерилизации, держатель чашек Петри, датчик скорости потока воздуха, зонд для измерения температуры и влажности, ламинарная рамка с перфорированным листом в верхней части. Ламинарный поток воздуха регулируется в интервале 5–500 объемов камеры в час. В нижней части предкамеры установлена передвижная полка для перемещения материала из предкамеры в рабочую камеру.

Изолятор работает в режиме частичного вакуума и с каскадом давления между рабочей камерой и предкамерой. Воздух в изолятор подается из помещения через общий кассетный фильтр (предфильтр) и НЕРА-фильтр, расположенные внутри камер изолятора, и выходит через самостоятельную вытяжную ветку вентиляции. Система вентиляции обеспечивает отрицательное давление в камере  $-(110-250)$  МПа, есть датчики дифференциального давления и скорости движения воздуха. Влажность и температура воздуха не регулируются. Кратность воздухообмена 5–60 объемов камеры в час, скорость потока воздуха 0,45 м/с. Датчик давления расположен в задней стене камеры.

Внутри изолятора также расположены душ для чистого сжатого воздуха и очищенной воды, предохранитель давления. Душ сжатого воздуха для генератора паров  $H_2O_2$  подключен при помощи быстродействующей муфты вне изолятора.

Первичная функция предкамеры – возможность загрузки материала из помещения и его безопасное перемещение через боковой порт в рабочую камеру без контаминации материала в рабочей камере окружающей средой.

Операционные режимы работы изолятора включают пониженный ход, операционное испытание на герметичность, загрузку материала, промывку, перемещение материала между рабочими камерами, рабочий режим, стерилизацию, мойку, сушку.

Пониженный ход – состояние после запуска оборудования или после окончания стерилизации, когда оборудование переходит в управляемый режим, но не включен контроль потери частичного вакуума. Для долговременного сохранения стерильной среды камера промывается при низком количестве обменов воздуха.

Операционное испытание на герметичность используется для контроля герметичности изолятора и подтверждения безопасной работы, этот режим может быть включен в любое время. Камера герметично закрывается, в ней снижается давление до 300 Па, нельзя двигать перчатками. В течение 15 мин частичный вакуум может понизиться не более чем на 200 Па, в этом случае камера признается герметичной.

Режим загрузки материала применяется для загрузки материала в предкамеру через боковой порт, режим промывки – для достижения требуемого класса чистоты при многократно большем количестве обменов в сравнении с рабочим состоянием.

В режиме перемещения материала между рабочими камерами порт между камерами автоматически открывается, при этом отключается режим исключения контроля нарушения каскада давления между камерами.

Рабочий режим используется для сохранения частичного вакуума (–100, –150, –200, –250 Па) в камере на настроенном значении при заданном расходе для обеспечения возможности выполнять рабочие операции.

Режим стерилизации применяется для подготовки изолятора к работе путем испарения жидкого раствора  $H_2O_2$  в воздухе и последующей подачи паров требуемой концентрации в определенную камеру изолятора.

Режим мойки нужен для ополаскивания камер с помощью ручных пистолетов. После завершения мойки ручные пистолеты переключают на подачу сжатого воздуха и вытесняют капли воды в сливное отверстие, подсушивая поверхности (режим сушки). В этом режиме кратность обмена воздуха повышается, освещение включено.

Режим выключения изолятора доступен из любого режима. Перед выключением нужно промыть обе камеры.

Для чистки и дезинфекции изолятора используют обычные моющие и дезинфицирующие средства без абразивных частиц, осуществляют контроль наружной заправки рабочего места изолятора.

## **Эксплуатация изолятора при проведении испытания на стерильность с использованием системы закрытой фильтрации, системы для растворения и перистальтического насоса**

Изолятор включают в сеть, осматривают на отсутствие повреждений, проверяют ручные порты слива, включают режим пониженного хода, открывают датчики температуры и влажности.

Через боковой порт предкамеры в перфорированных контейнерах загружают испытуемые образцы, питательные среды для испытания на стерильность, промывную жидкость, канистры с мембранными фильтрами и шлангами стерильные (системы закрытой фильтрации), системы для растворения образцов, ножницы, ампуловскрыватель, дезинфицирующее средство, салфетки безворсовые одноразовые, питательные среды для микробиологического мониторинга процедуры испытания на стерильность. Порт закрывают. Сливные краны должны быть закрыты. Для предкамеры и рабочей камеры проводят проверку на герметичность путем создания частичного вакуума (300 Па), который за 15 мин не должен снижаться более чем до 200 Па. Если вакуум снижается, возможно, негерметично закрыты порты, стекло, повреждены перчатки.

Камеры стерилизуют парами  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Для этого подсоединяют генератор паров  $\text{H}_2\text{O}_2$  к изолятору, необходимое количество  $\text{H}_2\text{O}_2$  в емкости на одну обработку – не менее 120 см<sup>3</sup>. В перчатки вставляют держатели, чтобы поверхность перчаток полностью обрабаталась парами перекиси водорода, закрывают датчик частиц. Стерилизация длится 2 ч. Затем камеры продувают, генератор паров  $\text{H}_2\text{O}_2$  выключают, открывают датчик частиц.

Подготавливают к работе систему закрытой фильтрации: вынимают из упаковки; устанавливают синие платформы контейнеров в держатель; вставляют шланги в щель насоса таким образом, чтобы правый контейнер и шланг, вставляемый в зажим насоса ниже, были с полоской; заглушки кладут на панель насоса. Снимают заглушку с иглы на конце системы и вставляют иглу в резиновую пробку флакона с физиологическим раствором, туда же – иглу с воздушным фильтром.

Для смачивания поверхности фильтра переворачивают флакон с физиологическим раствором, включают перистальтический насос,

примерно 20 см<sup>3</sup> физиологического раствора закачивают в контейнер, вставляют красные заглушки, включают насос и прокачивают (фильтруют) 20 см<sup>3</sup> физиологического раствора через мембранный фильтр, выключают перистальтический насос.

Достают иглу из пробки флакона с физиологическим раствором и поочередно после вскрытия ампул с растворами лекарственного средства и периодического включения-выключения насоса переносят содержимое ампул в контейнеры для фильтрования поровну.

Для растворения твердых лекарственных форм (порошков) используют систему. Для сбора системы снимают заглушку с иглы на конце системы и вставляют иглу в резиновую пробку флакона с 400 см<sup>3</sup> физиологического раствора, туда же – иглу с воздушным фильтром. Флакон с физиологическим раствором переворачивают, включают насос, набирают физиологический раствор в бутылочку (ампулу) с порошком, флакон с физиологическим раствором ставят на стол, бутылочку с порошком и физиологическим раствором переворачивают при интенсивном встряхивании, насосом содержимое бутылочки в виде раствора перекачивают в бутылку с физиологическим раствором. Затем бутылочку с лекарственным средством заменяют и операцию повторяют до тех пор, пока содержимое всех бутылочек (ампул) с порошком не будет перенесено во флакон с физраствором.

Полученный раствор твердых лекарственных форм из флакона пропускают через два фильтра системы закрытой фильтрации, на каждую из канистр приходится по 200 см<sup>3</sup> раствора. Затем иглу системы снова вставляют в пробку флакона с физиологическим раствором, сначала – со снятыми заглушками для смыва остатков исследуемой пробы, затем заглушки закрывают и производят окончательную промывку мембраны от остатков лекарственного средства с расходом 100–500 см<sup>3</sup> физиологического раствора. До конца фильтрования иглу из бутылки с физиологическим раствором не вынимают. Затем зажимы на первом силиконовом шланге пережимают, закрывают платформу фильтра зажимами, иглу вставляют в резиновую пробку во флакон со средой № 1, переворачивают флакон и переносят питательную среду в контейнер. Аналогично выполняют перенос питательной среды № 2 во второй контейнер.

В конце испытания зажимы с крышек контейнеров снимают, ножницами срезают шланги чуть ниже линии их соединения, соответствующий получившийся свободный конец присоединяют к трубке с воздушным фильтром того же контейнера. В таком виде контейнеры будут помещены в суховоздушный термостат с подходящими температурными условиями.

Удаление материалов из рабочей камеры изолятора осуществляют через порт в предкамеру, затем из предкамеры изолятора через боковой порт – в помещение микробиологической лаборатории.

Перед мойкой камер закрывают датчики температуры и влажности, частиц защитными колпачками, открывают порты слива в канализацию из изолятора, запускают операцию «Мойка камер», вручную обрабатывают всю камеру водой очищенной. На сенсорной панели выбирают режим сушки, из ручных пистолетов чистым сжатым воздухом обрабатывают камеры изолятора.

## ЛИТЕРАТУРА

---

1. Рымовская, М. В. Основы промышленной асептики [Электронный ресурс]: 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. – URL: <https://elib.belstu.by/handle/123456789/27481> (дата обращения: 05.04.2024).

2. Гигиенический норматив: постановление Совета Министров Респ. Беларусь, 25 янв. 2021 г., № 37 // Национальный правовой Интернет-портал Респ. Беларусь. – 05.03.2021. – 5/48783. – 1255 с. – Показатели безопасности и безвредности атмосферного воздуха. – С. 3–110; Показатели безопасности питьевой воды. – С. 187–225; Гигиенические и санитарно-микробиологические показатели безопасности воздушной среды помещений организаций, занимающихся оказанием медицинской помощи. Показатели безопасности наземных гало- и спелеоклиматических камер. – С. 230–232; Показатели безопасности и безвредности микроорганизмов-продуцентов, микробных препаратов и их компонентов, вредных веществ в воздухе рабочей зоны и на кожных покровах работающих. – С. 326–487.

3. Вода питьевая. Отбор проб: ГОСТ 31862–2012 (ISO 5667-5: 1991). – Введ. 01.01.2014. – М.: Стандартиформ, 2013. – 12 с.

4. Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и энтерококков: ГОСТ 34786–2021. – Введ. 01.01.2022. – М.: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2021. – 36 с.

5. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды МУК Респ. Беларусь № 11-10-1–2002: утв. на территории Респ. Беларусь гл. гос. санитар. врачом Респ. Беларусь 25.02.2002; введ. 25.02.2002 // Сборник санитарных правил и норм по питьевому водоснабжению. – Минск: М-во здравоохранения Респ. Беларусь, 2003. – С. 167–206.

6. Методы микробиологического контроля санитарно-гигиенического состояния помещений в организациях здравоохранения и стерильности изделий медицинского назначения: инструкция

4.2.10-22-1–2006: утв. на территории Респ. Беларусь гл. гос. санитар. врачом Респ. Беларусь 28 января 2006 г. (постановление № 7); введ. 03.04.2006. – Минск, 2006. – 20 с.

7. Сопрунова, О. Б. Санитарная микробиология: учеб. пособие / О. Б. Сопрунова. – Астрахань: АГТУ, 2007 – 204 с.

8. Питательные среды для медицинской микробиологии / М. С. Поляк [и др.]. – СПб., 2002. – 80 с.

9. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*: ГОСТ 31746–2012 (ISO 6888-1:1999, ISO 6888-2:1999, ISO 6888-3:2003). – Введ. 01.07.2013. – М.: Стандартинформ, 2013. – 28 с.

10. Производство лекарственных средств. Микробиологический мониторинг производственной среды: ТКП 441–2012 (02041). Введ. 01.03.2013. – Минск: М-во здравоохранения Респ. Беларусь, 2012. – 28 с.

11. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II): разработана на основе Европейской фармакопеи. В 2 т. Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под. общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно: тип. «Победа», 2012. – 1220 с. – Раздел 2.6: Биологические испытания. – С. 252–324; Раздел 5.1: Общие тексты по микробиологии. – С. 761–795.

12. Мурашкина, И. А. Вспомогательные вещества в фармацевтической технологии: учеб. пособие / И. А. Мурашкина, В. В. Гордеева; ФГБОУ ВО ИГМУ М-ва здравоохранения России. – Иркутск: ИГМУ, 2018. – 64 с.

13. Методы лабораторных исследований и испытаний медико-профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Р 4.2.2643–10. – Введ. 02.06.2010. – М.: Федер. центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 615 с.

14. Горбунов, В. А. Сравнительная активность некоторых дезинфектантов в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в стационарах Респ. Беларусь / В. А. Горбунов // Военная медицина. – 2010. – № 3. – С. 46–50.

15. Стерилизация медицинской продукции. Химические индикаторы. Ч. 1. Общие требования: ГОСТ ISO 11140-1. – Введ. 01.01.2015. – М.: Стандартинформ, 2015. – 32 с.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

---

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ .....                                                                                                           | 3  |
| 1. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ<br>ПРИРОДНЫХ СРЕД .....                                                         | 6  |
| 1.1. Принципы санитарно-микробиологического<br>контроля природных сред.....                                              | 6  |
| 1.2. Характеристика санитарно-показательных микроорганизмов                                                              | 10 |
| 1.2.1. Санитарно-показательные микроорганизмы группы А                                                                   | 11 |
| 1.2.2. Санитарно-показательные микроорганизмы группы В                                                                   | 14 |
| 1.2.3. Санитарно-показательные микроорганизмы группы С                                                                   | 15 |
| 1.3. Питательные среды, используемые в санитарной<br>микробиологии.....                                                  | 16 |
| 1.3.1. Питательные среды для оценки общей<br>обсемененности микроорганизмами.....                                        | 17 |
| 1.3.2. Питательные среды для обнаружения<br>и идентификации энтеробактерий.....                                          | 18 |
| 1.3.3. Питательные среды для обнаружения<br>и идентификации облигатно анаэробных бактерий .....                          | 21 |
| 1.3.4. Питательные среды для обнаружения<br>и идентификации стафилококков.....                                           | 22 |
| 1.3.5. Реактивы для идентификации<br>санитарно-показательных микроорганизмов .....                                       | 23 |
| 1.4. Лабораторная работа. Санитарно-микробиологический<br>контроль питьевой воды .....                                   | 25 |
| 1.4.1. Правила отбора пробы воды.....                                                                                    | 27 |
| 1.4.2. Определение общего микробного числа пробы воды                                                                    | 28 |
| 1.4.3. Определение общих и термотолерантных<br>колиформных бактерий в пробе воды .....                                   | 30 |
| 1.4.3.1. Определение общих и термотолерантных<br>колиформных бактерий в пробе воды методом<br>мембранной фильтрации..... | 31 |
| 1.4.3.2. Определение общих и термотолерантных<br>колиформных бактерий в пробе воды титрационным методом .....            | 35 |
| 1.4.4. Определение спор сульфитредуцирующих<br>клубридий в пробе воды .....                                              | 40 |

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.4.5. Анализ результатов санитарно-микробиологического исследования питьевой водопроводной воды.....                                                           | 41 |
| 1.5. Лабораторная работа. Санитарно-микробиологический контроль воздуха закрытых помещений .....                                                                | 42 |
| 1.5.1. Определение общего микробного числа воздуха учебной лаборатории.....                                                                                     | 47 |
| 1.5.2. Установление количества бактерий <i>S. aureus</i> в воздухе учебной лаборатории.....                                                                     | 47 |
| 2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ОБЪЕКТОВ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЯХ.....                                                          | 51 |
| 2.1. Объекты, точки и частота отбора проб при контроле микробиологической загрязненности производственной среды                                                 | 51 |
| 2.2. Общая схема контроля микробиологической загрязненности производственной среды .....                                                                        | 53 |
| 2.3. Меры предосторожности и контроль соблюдения условий асептики при проведении микробиологического мониторинга и выполнении микробиологического анализа ..... | 54 |
| 2.4. Питательные среды и растворы для оценки микробной обсемененности объектов микробиологического мониторинга, фармацевтического сырья и продукции .....       | 56 |
| 2.5. Лабораторная работа. Микробиологический контроль производственной среды .....                                                                              | 59 |
| 2.5.1. Микробиологический контроль поверхностей рабочего стола и стены учебной лаборатории методом смывов.....                                                  | 62 |
| 2.5.2. Микробиологический контроль одежды и рук персонала методом смывов.....                                                                                   | 64 |
| 2.5.3. Микробиологический контроль воздуха рабочих помещений седиментационным методом.....                                                                      | 65 |
| 3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ .....                                                                                          | 66 |
| 3.1. Принципы нормирования микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств и фармацевтических субстанций для их производства.....                 | 66 |
| 3.2. Перечень и условия культивирования тест-организмов, используемых при микробиологическом контроле лекарственных средств .....                               | 68 |

|                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3. Питательные среды для обнаружения и идентификации специфических микроорганизмов-контаминантов лекарственных средств .....       | 69  |
| 3.4. Контроль стерильности, ростовых и индикаторных свойств питательных сред .....                                                   | 75  |
| 3.5. Лабораторная работа. Контроль общего количества аэробов и грибов в нестерильных лекарственных средствах .....                   | 77  |
| 3.5.1. Подготовка образца лекарственного средства или субстанции к испытанию .....                                                   | 77  |
| 3.5.2. Определение общего количества аэробов и грибов методом глубинного посева.....                                                 | 79  |
| 3.5.3. Определение общего количества аэробов и грибов методом мембранной фильтрации .....                                            | 81  |
| 3.6. Лабораторная работа. Испытание на наличие специфических микроорганизмов в нестерильных лекарственных средствах .....            | 82  |
| 3.6.1. Испытание на наличие грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи.....                                                     | 83  |
| 3.6.2. Испытание на наличие бактерий <i>E. coli</i> .....                                                                            | 85  |
| 3.6.3. Испытание на наличие бактерий рода <i>Salmonella</i> .....                                                                    | 87  |
| 3.6.4. Испытание на наличие бактерий <i>Ps. aeruginosa</i> .....                                                                     | 89  |
| 3.6.5. Испытание на наличие бактерий <i>St. aureus</i> .....                                                                         | 90  |
| 3.6.6. Испытание на наличие специфических микроорганизмов методом мембранной фильтрации .....                                        | 92  |
| 3.6.7. Идентификация микроорганизмов.....                                                                                            | 92  |
| 4. ИНАКТИВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ДЕЗИНФЕКЦИИ И СТЕРИЛИЗАЦИИ.....                                                                   | 94  |
| 4.1. Характеристика промышленно выпускаемых средств для дезинфекции и антисептики.....                                               | 95  |
| 4.2. Консерванты лекарственных средств.....                                                                                          | 99  |
| 4.3. Нейтрализаторы антимикробного действия субстанций дезинфицирующих средств.....                                                  | 100 |
| 4.4. Тест-культуры, применяемые при установлении антимикробной активности дезинфицирующих средств.....                               | 101 |
| 4.5. Оценка эффективности работы стерилизующих устройств                                                                             | 101 |
| 4.6. Лабораторная работа. Установление антимикробной активности дезинфицирующих средств с использованием суспензионного метода ..... | 106 |
| 4.6.1. Приготовление рабочей суспензии тест-культуры.....                                                                            | 107 |

|                                                                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.6.2. Приготовление рабочих растворов дезинфектантов .....                                                                                                      | 108 |
| 4.6.3. Суспензионный метод установления антимикробной активности дезинфицирующих средств .....                                                                   | 109 |
| 4.7. Лабораторная работа. Установление антимикробной активности дезинфицирующих средств с использованием метода батистовых тест-объектов.....                    | 110 |
| 4.7.1. Подготовка батистовых тест-объектов .....                                                                                                                 | 111 |
| 4.7.2. Контаминация батистовых тест-объектов.....                                                                                                                | 111 |
| 4.7.3. Установление антимикробной активности дезинфицирующих средств методом батистовых тест-объектов                                                            | 112 |
| 4.8. Лабораторная работа. Исследование бактерицидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания поверхностей.....                | 113 |
| 4.8.1. Подготовка поверхностей к испытанию .....                                                                                                                 | 114 |
| 4.8.2. Исследование бактерицидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания поверхностей в медицинских учреждениях              | 115 |
| 4.8.3. Исследование бактерицидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания поверхностей на фармацевтическом производстве ..... | 116 |
| 4.9. Лабораторная работа. Установление антимикробной активности антисептиков .....                                                                               | 117 |
| 4.9.1. Изучение эффективности кожных антисептиков в отношении общей микрофлоры кожи рук .....                                                                    | 118 |
| 4.9.2. Изучение эффективности кожных антисептиков в отношении искусственно контаминированной тест-микроорганизмом кожи рук .....                                 | 119 |
| 4.9.3. Изучение пролонгированного антимикробного действия кожных антисептиков .....                                                                              | 119 |
| 4.10. Лабораторная работа. Оценка микробиологической загрязненности антисептиков и дезинфектантов на фармацевтическом производстве .....                         | 120 |
| 4.11. Лабораторная работа. Оценка бионагрузки на антимикробную активность рабочих растворов дезинфицирующих средств на фармацевтическом производстве             | 123 |
| 4.11.1. Установление антимикробной активности рабочих растворов дезинфицирующих средств в условиях обычной бионагрузки .....                                     | 124 |

|                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.11.2. Установление антимикробной активности<br>рабочих растворов дезинфицирующих средств в условиях<br>возрастающей бионагрузки ..... | 125 |
| 4.12. Лабораторная работа. Установление эффективности<br>работы стерилизующих устройств.....                                            | 126 |
| 4.12.1. Порядок применения индикаторов химических<br>одноразовых для контроля паровых стерилизаторов .....                              | 128 |
| 4.12.2. Порядок применения индикаторов воздушной<br>стерилизации химических бумажных одноразовых .....                                  | 128 |
| 4.12.3. Порядок применения индикаторов биологических<br>одноразовых для контроля паровой стерилизации.....                              | 130 |
| 4.12.4. Порядок применения индикаторов биологических<br>одноразовых для контроля воздушной стерилизации<br>ускоренного чтения .....     | 131 |
| 4.13. Лабораторная работа. Испытание на эффективность<br>консервантов в составе лекарственных средств .....                             | 132 |
| 4.13.1. Подготовка посевного материала (инокулята).....                                                                                 | 134 |
| 4.13.2. Установление эффективности консервантов<br>в составе стерильных и нестерильных лекарственных средств                            | 135 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ .....                                                                                                                        | 137 |
| ЛИТЕРАТУРА .....                                                                                                                        | 146 |

Учебное издание

**Рымовская** Мария Васильевна

# **ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ АСЕПТИКИ**

## **Лабораторный практикум**

Учебно-методическое пособие

Редактор *Р. М. Рябая*

Компьютерная верстка *В. А. Маркушевская*

Дизайн обложки *Д. А. Полешова*

Корректор *Р. М. Рябая*

Подписано в печать 02.04.2025. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.

Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать ризографическая.

Усл. печ. л. 8,9. Уч.-изд. л. 9,2.

Тираж 35 экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение:

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.