

© О. В. Гунар, 2011

О. В. Гунар

МИКРОФЛОРА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И РАЗЛИЧНЫЕ АСПЕКТЫ ЕЕ ИЗУЧЕНИЯ (ОБЗОР)

ФГБУ НЦ ЭСМП Росздравсоцразвития России, Москва, Россия

В обзоре представлены материалы по различным аспектам изучения микрофлоры лекарственных средств (ЛС). Обозначены источники загрязнения нестерильных ЛС; рассмотрены проблемы, связанные с изменением органолептических свойств и терапевтической ценности контаминированных препаратов и с опасностью микроорганизмов-контаминантов для здоровья человека. В статье показан качественный и количественный состав микроорганизмов, выделенных из различных лекарственных форм, эффективные методы выделения микроорганизмов-контаминантов ЛС, а также особенности используемых питательных сред и методы современной идентификации бактерий и грибов при анализе качества ЛС.

Ключевые слова: лекарственные средства, микробиологический контроль качества, микроорганизмы-контаминанты.

Микробиологические показатели качества лекарственных средств (ЛС) находятся в тесной связи с безопасностью их применения, поэтому результаты испытаний фармацевтической продукции по показателям “Стерильность” и “Микробиологическая чистота” должны быть максимально точными и надежными. Основными факторами, влияющими на вариабельность результатов микробиологических исследований, являются: специфичность пробы (физико-химические свойства ЛС и биологические особенности выделяемой популяции микроорганизмов), компетентность персонала и условия его работы, отбор образцов и подготовка пробы, условия инкубации выделяемых микроорганизмов, характеристики используемых питательных сред. Последние 3 фактора подлежат обязательной стандартизации и валидации [1], что подтверждается общей тенденцией по совершенствованию фармакопейных микробиологических методов контроля. Дальнейшее расширение номенклатуры ЛС и субстанций, внедрение правил GMP и систем менеджмента качества требуют стандартных подходов в микробиологическом анализе качества ЛС.

История изучения микробной загрязненности нестерильных ЛС началась в середине прошлого века с заболеваний, вызванных наличием в препаратах микроорганизмов. Медицинские журналы конца 60-х годов [2, 3] публиковали информацию о многочисленных случаях так называемой “лекарственной инфекции”. В те годы из ЛС выделяли широкий спектр микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* и др., а также дрожжевые и плесневые грибы.

Огромный фактический материал послужил основанием для установления допустимых пределов количественного содержания микроорганизмов и качественного их состава. Полная схема микробиологического испытания ЛС впервые была представлена в Фармакопее США в 1970 г. [4], хотя требования к уровню микробной загрязненности сначала появились в фармакопее ЧСФР [5]. На сегодняшний день определение микробиологической чистоты ЛС введено в фармакопее всех развитых стран, в том числе в Российской Федерации [6]. Однако для специалистов имеются определенные трудности, связанные с увеличением разнообразия лекарственных форм и расширением задач после перехода фармацевтических предприятий на работу по правилам GMP [6 – 11].

К настоящему времени практически во всех странах, производящих ЛС, приняты либо национальные требования GMP (по данным ВОЗ более чем в 30 странах), либо один из международных документов. С 2002 г. FDA (США) выступила с новой инициативой, получившей название “Фармацевтические cGMP 21-го века, основанные на анализе рисков” [12]. Многие исследователи, в том числе американские, считают, что именно анализ рисков должен быть положен в основу разработки, производства и применения ЛС. Отмечено, что даже крупнейшие фармацевтические компании находятся в условиях хронической нехватки ресурсов для обеспечения качества ЛС [13]. С нехваткой ресурсов столкнулась и сама FDA. Это проявилось в том, что если число зарегистрированных в США за последние 25 лет ЛС увеличилось на 400 %, то число фармацевтических предприятий, проинспектированных FDA за то же время, возросло только на 60 %. Для

изменения этого положения, по мнению чиновников FDA, нет ни финансов, ни инспекторов, ни времени. По этой причине FDA и обратилась к анализу рисков. Во многих развитых странах также обращаются к анализу и управлению рисками, и это лишь дополняет традиционную работу по контролю качества.

В материалах международной конференции по гармонизации — ICH Q10 (2008 г.) вводится новое понятие “фармацевтическая система качества”, по которой на всех этапах производства с помощью мониторинга оценивают вероятность риска получения некачественных ЛС. Особое значение приобретает анализ рисков при эксплуатации чистых помещений [13 – 16].

Источники загрязнения ЛС

При всем многообразии технологических схем получения разных по происхождению ЛС основными источниками попадания в них микроорганизмов являются [17, 18]:

- Технологическое оборудование;
- Сырье и вспомогательные вещества на всех стадиях производства, хранения и транспортировки продукции;
- Вода, используемая в производстве;
- Технологический и вентиляционный воздух;
- Персонал.

В литературе большое внимание уделялось и уделяется компонентам ЛС, которые оказываются преимущественно загрязненными, в частности вспомогательным веществам. Еще в 1965 г. шведские специалисты подвергли бактериологическому анализу многочисленные образцы крахмала картофельного, обнаружив в них присутствие микроорганизмов [3]. Отмечалось загрязнение крахмалов грибами родов *Aspergillus* и *Penicillium*, среди которых обнаружены продуценты микотоксинов [19, 20]. Кроме вспомогательных материалов в качестве источников загрязнения ЛС обнаруживали основное сырье, чаще природного происхождения, и упаковочные материалы [21].

Особо выделяется вода, входящая в состав ЛС или используемая при их производстве. Системы подачи воды в производственные помещения достаточно обширны. Многие виды бактерий способны переживать в воде определенное время. Сроки выживания микроорганизмов в воде зависят главным образом от вида бактерий и концентрации микробной взвеси, температуры и состава воды. В микробиологическом мониторинге фармацевтического производства вода занимает одно из ведущих мест. В различных документах [22 – 26] и литературных источниках [27] обозначены подходы к санитарно-эпидемиологическому анализу воды.

Микроорганизмы могут быть внесены в ЛС с воздухом. Жизнеспособность микроорганизмов в воздухе обеспечивают взвешенные частицы воды [19, 28], слизи, пыли, почвы. Загрязненность воздуха жилых и некоторых производственных помещений всегда выше атмосферного [29, 30]. Работы в области качества воздуха в помещениях, в том числе и производственных, проводятся в России, хотя они не поддерживаются правительственными программами [31]. Зарубежные статистические данные показывают, что на 1000 взвешенных аэрозольных частиц приходится 1 микроорганизм [32].

Причинами попадания микроорганизмов в ЛС через воздух могут быть высокое первичное загрязнение атмосферного воздуха или неэффективная работа систем воздухоподготовки. Поэтому на фармацевтических предприятиях необходим постоянный микробиологический мониторинг [26, 33], демонстрирующий, что заданные значения концентраций микроорганизмов не превышены.

В табл. 1 и 2 приводятся примеры некоторых технологических операций, выполняемых в помещениях или зонах разных классов чистоты, и количество микроорганизмов в воздухе, установленное для каждого класса помещений фармацевтического производства [15].

Т а б л и ц а 1

Возможность проведения технологических операций в помещениях разных классов [15]

Класс чистоты помещений	Примеры некоторых технологических операций
A(100) (“чистые” помещения или зоны ламинарного потока воздуха)	Асептическое приготовление продуктов Наполнение терминально стерилизуемых продуктов при высоком риске загрязнения Внутренняя зона изоляторов для асептического наполнения Выгрузка и загрузка лиофильных сушилок Сборка стерилизующих фильтров и съемных узлов оборудования перед стерилизацией
B(100)	Помещения для размещения зон чистоты А при асептическом производстве Помещения для перемещения и промежуточного хранения в закрытом состоянии полупродуктов или простерилизованных компонентов первичной упаковки
C(10000)	Помещения для размещения зон класса чистоты А при производстве терминально стерилизуемых продуктов Приготовление продуктов, которые подвергаются стерилизующей фильтрации в асептическом производстве Приготовление терминально стерилизуемых продуктов при высоком риске контаминации Наполнение терминально стерилизуемых продуктов
D(100000)	Помещение для размещения изоляторов Приготовление терминально стерилизуемых продуктов Подготовка компонентов первичной упаковки и съемных деталей оборудования

При квалификации чистых помещений показано расположение точек воздухоотбора для различных помещений [34].

Следует обратить внимание на классификацию “чистых помещений” путем разделения требований к классу чистоты помещения в оснащенных и функционирующем состояниях [35]. При этом ограничения по концентрации жизнеспособных микроорганизмов в 1 м³ воздуха введены для функционирующего состояния помещений [36].

Основной целью микробиологического контроля воздуха является определение уровня и спектра микробной загрязненности, чтобы оценить вероятность ее проникновения в производимый продукт [37–39]. Для контроля микробной загрязненности воздуха применяют 2 метода: активный и пассивный [40, 41]. Активный (количественный) — с помощью импакторов и центрифужных пробоотборников. Пассивный (качественный) — экспозиция открытой плотной питательной среды в чашках Петри в течение определенного времени (от 15 мин до 1 ч). Этот метод также называют методом седиментации.

В табл. 3 указаны преимущества и недостатки пассивного метода посева [41].

Для установления причин загрязнения ЛС недостаточно иметь данные по микробной загрязненности только исходных компонентов, воды и воздушной среды. Производственные операции технологической схемы изготовления препаратов могут при определенных условиях также стать фактором риска в получении некачественной продукции. В экспериментах с тест-культурами бактерий и грибов на примере *B. cereus*, *A. niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis* степень микробной загрязненности снижалась при сушке, таблетировании и возрастала при опудривании гранулята. Установлено, что в основе механизма уменьшения жизнеспособности микроорганизмов при таблетировании лежит прямое механическое повреждение [42]. Сохранение жизнеспособности клеток бактерий и грибов при постоянном давлении таблетирования зависит от размера микроорганизмов и их физиологического состояния, а также от соотношения размеров микроорганизмов к размеру частиц сжимаемого вещества и механизма сжатия [43].

Среди источников загрязнения наиболее существенным является персонал [44]. Микроорганизмы мо-

гут давать ложные результаты контроля и попадать в продукт:

– воздушно-капельным путем с выделениями полости рта,

– воздушно-пылевым и контактными путями с участков кожи, не защищенной одеждой, и даже с индивидуальной технологической одежды.

Известно, что из верхних дыхательных путей человека в окружающее пространство выделяется значительное количество микроорганизмов. При чихании на расстоянии 10 м и более распространяется от 100 до 1000 жизнеспособных клеток бактерий и вирусов, со слюной — 10² – 10⁶ КОЕ/мл слюны, с секретом из полости носа — 10¹ – 10⁶ КОЕ/мл. Наиболее обсемененными участками кожи являются кисти рук, лицо, шея. На других участках тела человека количество сапрофитных аэробных бактерий находится в пределах 10⁵ – 10⁶ КОЕ/см². Количество механических и микробных частиц зависит от характера выполняемых движений. В течение 1 мин человек, не двигаясь, выделяет в окружающую среду 10 – 1000 механических и микробных частиц, а при интенсивной работе — до 10⁶ [34]. Связь между числом частиц с размерами > 0,5 мкм и числом микроорганизмов в единице объема воздуха определена в работах Ренмюллер [45]. В типичных условиях чистых помещений это соотношение оценивают как 1500:1. Количество частиц, выделяемых технологической одеждой, зависит от вида ткани, способа обработки швов и края, а также от степени изношенности.

Представленные в табл. 4 данные определяют правила поведения персонала при проведении технологических операций на фармацевтическом производстве и в контрольных службах. Эти правила основаны на соблюдении гигиены, выполнении мероприятий по дезинфекции, а также на постоянном повышении квалификации сотрудников [46].

Изменение органолептических свойств и терапевтической ценности препаратов, загрязненных микроорганизмами

Среди контаминантов ЛС и их субстанций встречаются различные бактерии и грибы. Присутствие контаминантов может существенно повлиять на терапевтическую ценность ЛС, начиная с его стабильности, кончая потенциальной опасностью для здоровья чело-

Таблица 2
Рекомендуемые пределы микробиологического загрязнения [15]

Класс	Образец воздуха, КОЕ/м ³	Седиментация на чашке (90 мм), КОЕ/4 ч	Контактный чашечный тест, КОЕ/чашку	Оттиск перчатки (5 пальцев), КОЕ/перчатку
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	–
D	200	100	50	–

Таблица 3
Преимущества и недостатки метода седиментации

Преимущества	Ограничения
Простота использования	Отбор только быстро оседающих больших частиц
Не требует процесса посева	Влияние температуры на эффективность
Возможность использования различных питательных сред	Сильное влияние скорости и направления воздушного потока к поверхности среды на результаты теста
Экономичность	Неопределенность объема отобранной пробы

века из-за токсигенных, аллергенных, а иногда и канцерогенных свойств некоторых видов бактерий и грибов, а также их метаболитов [28].

Принимая во внимание, что микроорганизмы обладают широким набором ферментов (протеаз, липаз, карбоксилаз, амилаз, уреаз и т.д.), нетрудно предположить наличие широчайших возможностей биохимического разложения компонентов ЛС. При этом могут изменяться количественно или полностью разрушаться биологически активные вещества ЛС. Например, в таблетках преднизолона из-за присутствия *Aspergillus sp.* выявлена трансформация стероида; в глазных каплях с атропином, содержащих *Corynebacterium sp.* обнаружено пониженное содержание атропина сульфата [47].

Микроорганизмы могут разлагать, например, консерванты. Это относится прежде всего к органическим соединениям, которые служат некоторым бактериям и грибам источником углерода. Известны факты, когда метилпарабен разлагался *P. aeruginosa*, а сорбиновая кислота — грибами рода *Penicillium* и др. [48].

В литературе [47] найдены сведения о том, что микроскопические грибы могут вызвать изменение органолептических характеристик различных лекарственных форм и изделий лечебной косметики, часто сопровождающееся весьма нежелательными модификациями внешнего вида (обесцвечивание, газообразование), вкусовых качеств и запаха. Выделенные из эмульсий *A. flavus*, *A. niger*, *T. viride* привели к изменению цвета, разделению фаз, появлению неприятного запаха. Присутствие в таблетках аспирина и кодеина *Penicillium sp.* явилось причиной поверхностного обесцвечивания образцов и возникновения запаха уксусной кислоты. Аналогичную картину наблюдали в таблетках нитрозепама из-за наличия *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*

Опасность микроорганизмов-контаминантов для здоровья человека

Помимо ухудшения качества ЛС под воздействием микроорганизмов, загрязненные препараты могут быть опасны для здоровья пациентов. Основными отрицательными последствиями использования пациентами загрязненных ЛС могут быть снижение или отсутствие терапевтического действия препарата, возникновение заболеваний, неблагоприятных побочных реакций, а также передача и распространение лекарственно устойчивых бактерий и грибов.

Таблица 4
Предполагаемые источники загрязнения [17]

Микроорганизмы	Пример	Источник загрязнения
Грамотрицательные	<i>Pseudomonas</i>	Вода
Грамположительные кокки	<i>Staphylococcus</i>	Люди
Грамположительные палочки	<i>Propionibacterium</i>	Люди, пыль
Грамположительные спорообразующие палочки	<i>Bacillus</i>	Пыль
Плесневые и дрожжевые грибы	<i>Aspergillus</i>	Пыль

По данным литературы лекарственная инфекция чаще всего встречается в офтальмологической практике. Например, в глазных каплях выявляли плесневые грибы, относящиеся к родам *Fusarium*, *Penicillium* и дрожжеподобные *C. albicans* и *C. parapsiloses* [49]. В настоящее время большое внимание продолжает уделяться исследованию микрофлоры глазных контактных линз и растворов для их промывания, так как из-за микробной загрязненности последних резко увеличивается риск возникновения заболеваний глаз [50–53].

Имеются описания кожных заболеваний, вызванных применением медицинского крема, загрязненного *P. aeruginosa* и *C. albicans* [54]. В табл. 5 представлены микроорганизмы-контаминанты, обнаруженные в различных фармацевтических препаратах.

Серьезные заболевания пациентов могут быть обусловлены продуктами биоразрушения или микробными токсинами. Последние могут вызвать токсикоинфекции — острые кишечные заболевания, развивающиеся после приема внутрь ЛС, загрязненных патогенными и условно-патогенными бактериями, выделяющими эндотоксины [55]. Среди них различные микроорганизмы: энтеротоксигенные варианты кишечной палочки, протей, энтерококки, *B. cereus*, *S. aureus*, *Cl. perfringens*, реже — *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* могут вызвать токсикоинфекции. Возникновение, развитие и исход заболевания зависят от уровня микробной загрязненности, биологических особенностей контаминантов (вирулентности), от резистентности пациента и способа введения препарата. Наибольшую опасность представляет их введение в кровотоки, глаза, в полости тела, в норме свободные от микроорганизмов [56, 57]. При местном применении препаратов вероятность развития инфекционного процесса возрастает при обширных повреждениях тканей в результате травмы, ожога, хирургического вмешательства [58].

Наибольшую опасность подобные инфекции представляют для новорожденных, больных пожилого воз-

Таблица 5
Микроорганизмы-контаминанты фармацевтических препаратов [17]

Год	Анализируемый продукт	Обнаруженный микроорганизм
1943	Глазные капли	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1946	Тальк	<i>Clostridium tetani</i>
1966	Глазная мазь с антибиотиком	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1967	Крем для рук	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1969	Укропная вода	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1970	Раствор хлоргексидина цитрата	<i>Burkholderia cepacia</i>
1972	Инъекционный раствор	<i>Erwinia sp.</i>
1972	Порошок поджелудочной железы	<i>Salmonella sp.</i>
1977	Раствор для контактных линз	<i>Serratia sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i>
1981	Хирургическая одежда	<i>Clostridium sp.</i>

раста, ослабленных пациентов особенно в тех случаях, когда препараты вводят в кровоток, глаза, полости тела, в норме свободные от микроорганизмов.

Данные последних лет показали, что ЛС могут влиять на нормальную микрофлору человека, которая принимает прямое или опосредованное участие практически во всех физиологических функциях, биохимических и поведенческих реакциях. К ним относятся участие в водно-солевом балансе, в метаболизме белков, жиров, углеводов, в обеспечении энергией, в продукции биологически активных соединений, в этиопатогенезе заболеваний, в морфокинетических действиях, в поддержании иммунитета и др. [59 – 64]. Влияние ЛС на микрофлору приводит к дисбалансу микрофлоры с макроорганизмом и появляются факторы, предрасполагающие к развитию большого числа самых разнообразных заболеваний человека (ожирение, гипертоническая болезнь, атеросклероз, сахарный диабет, оппортунистические инфекции и др.). В условиях дисбаланса кишечной микрофлоры резко меняется фармакокинетика и эффективность лекарственных средств [65 – 67].

Качественный и количественный состав микроорганизмов, выделенных из различных лекарственных форм

По данным литературы 70 – 80 гг. прошлого века наиболее часто в фармацевтических продуктах обнаруживали спорообразующие бактерии (*Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*), бактерии родов *Salmonella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *P. aeruginosa* и другие виды этого рода, грибы из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida* [68].

На поверхности кремов и мазей наблюдали развитие плесневых и дрожжевых грибов (Negretti 1977), а именно: *A. niger*, *C. albicans*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Verticillium sp.* Обращает на себя внимание факт содержания дрожжей и грибов в глазных каплях, микстурах, настоях, отварах и др. В водно-масляных эмульсиях выявлены *A. flavus*, *Tr. viride*, разрушающие с помощью своей ферментной системы жирорастворимые ЛС [47].

Определенную опасность с точки зрения контаминации бактериями и грибами представляют ЛС на основе животных и растительных субстанций. При этом уровень загрязнения связан с химическим составом и лекарственной формой препаратов. Среди препаратов природного происхождения 39 – 60 % не соответствовали международным нормам по количественному содержанию грибов в 1 г, т.е. содержали более 100 грибов в 1 г (мл) образца [68, 69].

При изучении микробиологической чистоты 18 наименований порошкообразных веществ (вспомогательных веществ, сырья для производства ЛС, детских присыпок), загрязненных микроорганизмами, отмечали различный уровень количественного содержания микрофлоры, связанный с химической природой исследованных объектов. Наибольшее загрязнение зарегистрировано в группе коллоидных порошков неорга-

нической природы (общее число бактерий и грибов более 1000 в 1 г). Вероятно, это объясняется коллоидными свойствами изучаемого порошка, которые способствовали агрегации спор плесневых грибов. Кроме того, магний, составляющий структуру этого порошка, является существенным макроэлементом питания бактерий и грибов.

В то же время испытание детских присыпок фирм Johnson и Chico показало высокое качество этих препаратов благодаря работе производства по правилам GMP [70].

В работе [68] обобщены результаты, освещающие уровень загрязнения грибами ЛС, произведенных в Италии в 1972 – 1977 гг. (табл. 6).

Из табл. 6 видно, что из исследованных 4317 ЛС твердые формы имели более высокий уровень загрязнения: из 1419 серий 2,1 % содержали в 1 г более 1000 грибов, что в 10 раз выше, чем в жидких образцах — 0,2 %.

В настоящее время данные, свидетельствующие о загрязнении микроорганизмами различных лекарственных форм, продолжают поступать [71].

Среди различных факторов, воздействующих на рост и метаболизм микроорганизмов в ЛС, следует отметить температуру, pH, наличие кислорода, микробную конкуренцию и активность воды (A_w) [72 – 76]. В работе [77] рассматривали влияние A_w на содержание *Aspergillus* и *Penicillium* в таблетках.

Эффективные методы выделения микроорганизмов-контаминантов ЛС

Основной задачей микробиологического контроля качества ЛС является создание условий для максимального выявления минимального количества микроорганизмов, загрязняющих ЛС. Степень контаминации микроорганизмами можно оценить различными методами. В табл. 7 совмещены современные методы пищевой [78 – 89] и фармацевтической микробиологии [90 – 94].

В пищевой микробиологии к традиционным чашечным агаровым методам следует отнести глубинный и поверхностный, а также метод спиральных пластин, при котором распределение суспензии исследуемого образца по поверхности твердой питательной среды происходит с помощью автоматического устройства по спирали от центра к периферии чашки с умень-

Таблица 6
Уровень загрязнения грибами различных лекарственных форм

Лекарственная форма	Количество препаратов с содержанием грибов в 1 г		
	< 100	100 – 1000	> 1000
Жидкая: сиропы, суспензии, гели	2664 (94,5 %)	147 (5,2 %)	7 (0,2 %)
Твердая: таблетки, капсулы, гранулы	1419 (88,6 %)	147 (9,2 %)	34 (2,1 %)
Мягкие: мази, свечи, помады	234 (100 %)	–	–

шающейся скоростью. После последующей инкубации число микроорганизмов определяется с помощью специальной счетной техники. В основу расчетов берут чашку или ее сектор. Техника спиральных пластин дает воспроизводимые результаты. К положительным моментам этого метода относится облегченная подготовка пробы перед испытанием, к отрицательным — необходимость иметь устройство для инокуляции и учета результатов.

Кроме традиционных методов в микробиологических исследованиях пищевых продуктов применяются так называемые быстрые методы, результаты которых получаются через несколько часов.

Прямые методы, позволяющие с помощью стереоскопической лупы или микроскопа наблюдать распределение бактерий и грибов в изучаемом объекте, пригодны для предварительной оценки степени загрязнения продукта микроорганизмами. Однако высокий процент ошибки при подсчете не дает возможности эффективно использовать их при количественном определении микроорганизмов.

Кроме того, анализ микробной загрязненности может проводиться методами иммунологическими, химическими или физическими. К ним относятся иммунофлуоресценция, калориметрия или сканирование с помощью электронной микроскопии [95 – 97]. Метод люминесцирующих антител позволяет за 1 – 4 ч получить информацию не только о наличии патогенных микроорганизмов в пробе, но и их видовой принадлежности. Этот метод связан с использованием реакции антиген-антитело, происходящей при соединении антигенов со специфическими антителами, мечеными флуоресцирующими красителями. К серологическим методам относятся и предложенное недавно иммуносорбентное определение, основанное на связи фермента со специфическим субстратом. В данном случае основой является измерение метаболической активности конкретных микроорганизмов. Хотя эти методы не являются новыми в микробиологии, однако их практическое применение ограничено. Отчасти это можно объяснить наличием общих антигенов, например, у плесневых грибов, которые вызывают перекрестные реакции и могут привести к неправильным результатам при идентификации грибов до вида.

Менее субъективными являются химико-биохимические методы, в основе которых лежит определение структурных компонентов клеток, например, грибов в

исследуемом продукте. Такие типичные для плесневых грибов вещества, как хитин и эргостерол, содержатся в клеточных стенках. Тест на наличие этих веществ можно успешно применять для продуктов, в которых имеются жизнеспособные клетки, при этом отпадает необходимость в сложном анализе на микотоксины.

В фармацевтической микробиологии для количественной характеристики микрофлоры ЛС, как правило, используют чашечные агаровые методы, пробирочный метод наиболее вероятных чисел (НВЧ) и метод мембранной фильтрации, рекомендованные фармакопеями [97 – 100]. Пробирочный метод НВЧ позволяет рассчитать число микроорганизмов по статистическим таблицам, он рекомендован для образцов с невысоким уровнем микробной загрязненности. По некоторым данным метод НВЧ был применен для подсчета грибов в пищевых продуктах [101], при этом в жидкую питательную среду вносили антибиотики, препятствующие росту бактерий [102]. В работе [103] предложен чашечный вариант метода НВЧ — с использованием агаризованной среды для подсчета плесневых грибов в естественно и искусственно контаминированных продуктах. В большинстве случаев этот метод давал более высокие значения, чем поверхностный и глубинный методы посева, требовал меньшего количества среды и облегчал анализ большого количества образцов. Однако к недостаткам метода следует отнести необходимость применения специальных чашек, разделенных на сектора, и отсутствие информации о выделяемых видах.

Метод мембранной фильтрации — современный метод посева, рекомендованный для ЛС, обладающих выраженным антимикробным действием или содержащих консерванты. Этот метод анализа качества используется также при испытании парентеральных препаратов, в том числе инфузионных, по показателю “Стерильность”. При испытании на микробиологическую чистоту методом мембранной фильтрации мазей и растворов ЛС в маслах в качестве растворителя используют изопропилмириститат.

В действующих фармакопеях наряду с количественным определением аэробных бактерий и грибов в требованиях к качеству ЛС по показателю “Микробиологическая чистота” включены некоторые виды бактерий, наличие которых либо недопустимо, либо ограничено [97 – 99].

Методы, используемые в пищевой и фармацевтической микробиологии, отличаются, так как в ЛС, в отличие от клинического материала, степень загрязнения сведена к минимуму. Селективное выделение микроорганизмов из ЛС затруднено и требуется использование накопительных сред. Контаминанты ЛС обычно пребывают в неактивном, возможно “стрессовом” состоянии, они в той или иной степени повреждены. В каждой методике селективного определения имеется начальный этап оживления (преинкубации) — неизбежного обогащения исследуемого материала. Цель этого этапа заключается в том, что-

Таблица 7
Методы, используемые в пищевой и фармацевтической микробиологии

Методы пищевой микробиологии	Методы фармацевтической микробиологии
1. Традиционные (чашечные)	1. Традиционные (чашечные)
2. Прямые	2. Метод наиболее вероятных чисел
3. Химико-биологические	3. Мембранная фильтрация
4. Серологические	4. Современные инструментальные, но не фармакопейные методы

бы предоставить микроорганизмам возможность восстановиться от повреждений и довести свою численность до такого уровня, который позволит в дальнейшем применить специфические селективные методы [104 – 107].

В этом, с одной стороны, особенность выделения определенных микроорганизмов из ЛС, а с другой стороны — существенная трудность, для устранения которой предлагаются специальные питательные среды и подбираются условия инкубации (температурный и временной режимы).

В перспективе для микробиологических методов контроля качества ЛС целесообразна разработка и валидация так называемых “быстрых” методов (биотипирование и генетические тесты, биосенсоры, определение патогенов посредством ДНК-микрочипов, геномных микроматриц) и других методов [95, 108].

Таким образом, методы, используемые при испытании ЛС по показателю “Микробиологическая чистота”, имеют широкое разнообразие и в настоящее время развиваются по пути применения как традиционных (чашечных, пробирочных), прямых (подсчета с использованием микроскопа), так и создания более объективных методов, таких как химико-биохимические и иммунологические. Однако большинство из них связано с эксплуатацией специального оборудования и его техническим обслуживанием, что имеет определенные, в том числе и материальные, трудности.

Особенности используемых питательных сред

Повышение эффективности и достоверности микробиологических контрольных исследований достигается за счет использования стандартных питательных сред. Широко известны зарубежные фирмы, выпускающие питательные среды, такие как “Becton Dickinson” (США); “Oxoid” (Великобритания), “Merk” (Германия), “Himedia” (Индия) и др.

В последнее время меняется рынок питательных сред нашей страны. Среди выпускающих организаций выделяются:

- ГНЦ прикладной микробиологии, отделение “Питательные среды” (п. Оболенск, Московской обл.),
- НПО “Питательные среды” (г. Махачкала),
- ОАО “Биомед” (п. Петрово-Дальнее, Московской обл.),
- ОАО “Биотехновация” (г. Москва).

Однако все российские производители питательных сред используют разные основы: аминокептид, гидролизаты рыбной муки и кильки и пр. Таким образом, о стандартности отечественных питательных сред можно говорить лишь условно. В настоящее время большинство производителей ориентируются на питательные среды, в которых в качестве источника азота используют соевые гидролизаты [109, 110].

Пригодность питательных сред для контроля микробной загрязненности ЛС подтверждается контрольными испытаниями [111]. Контроль их качества проводится по физико-химическим (аминный и общий азот, хлориды, влага, рН, цветность, прозрачность, прочность) и биологическим показателям [112, 113].

Биологический контроль зависит от назначения среды и включает исследование таких показателей, как чувствительность, эффективность, скорость роста, показатель ингибиции, дифференцирующие свойства и стабильность основных биологических свойств тест-штаммов [114].

Для целей фармацевтической микробиологии важны не только составы сред, необходимо подавить рост сопутствующей микрофлоры. Разрабатываются и используются различные селективные ингибиторы роста [115]. Например, для угнетения роста грамотрицательных бактерий в состав сред вводят тетрационат натрия и калия, теллурид калия, ацетат таллия, сульфат таллия, селенит натрия, грамположительных — анилиновые красители: бриллиантовый зеленый, кристаллический фиолетовый, этиловый фиолетовый, анилиновый синий.

При количественном определении аэробных бактерий и грибов подбирали вещества, ингибирующие бактериальный рост (при выделении грибов) и, наоборот, влияющие на развитие колоний грибов (при выделении бактерий). Большинство работ в этом направлении посвящено средам для выделения микрофлоры из пищевых продуктов [102].

Проводились исследования и другого рода, а именно внесение в среду ингибиторов роста грибов (с целью уменьшения диаметра быстро распространяющихся колоний, а следовательно облегчение их количественного учета).

Иногда в качестве селективных веществ используют красители. Некоторыми авторами установлено взаимодействие между красителем и другими компонентами среды [112, 116, 117]. Например, бриллиантовый зеленый может показывать различный ингибирующий титр в отношении *E. coli*. С бриллиантовым зеленым взаимодействуют желчные соли, снижая токсичность красителя и, следовательно, уровень токсичности этого красителя устанавливается добавлением в среду солей желчи [111, 112, 117].

Современная идентификация бактерий и грибов при анализе качества ЛС

Серьезной проблемой на сегодняшний день является дифференциальная диагностика отдельных бактерий, содержание которых недопустимо в ЛС, и грибов рода *Candida*.

Для идентификации дрожжеподобных грибов рода *Candida* разработаны специальные среды: с экстрактом кормовых дрожжей, с гидролизатом лактальбумина и 1 % твина-80. Четкую дифференциацию рода *Candida* позволило выявить испытание тест-культуры на среде культивирования и выделения — Кандида-агар, в накопительной среде — Кандида-бульон, в среде для определения хламидоспор — Хламидоспор-агар и в тестах ферментации углеводов. При посеве суточной культуры *C. albicans* на рисовый агар и инкубации при температуре 28 °С в течение 18 – 24 ч образуются хламидоспоры — типичный признак *C. albicans*, позволяющий достоверно идентифицировать грибы этого вида. Существует селективная среда для

роста грибов — Кандиселект, содержащая питательную основу для роста (пептон, дрожжевой экстракт, глюкозу), хромогенный субстрат для определения активности белка N-ацетил бета-D-галактозамидазы *C. albicans*, 2 антибиотика (хлорамфеникол и гентамицин), которые ингибируют рост бактериальной флоры [118]. Для более углубленной характеристики представителей рода *Candida* также используют методы биотипирования, среди которых наибольшее распространение получила система из 9 тестов F. C. Odds и A. V. Abbott. Системы идентификации дрожжеподобных грибов Ауксоколор, Фунгискрин представлены фирмой BIORAD.

С 80-х годов прошлого века действуют и отлично зарекомендовали себя API-системы (Франция) [119]. С их помощью можно идентифицировать до вида различные микроорганизмы, в том числе и дрожжевые грибы (API 20C AUX).

Кроме API-систем существуют тест-системы для идентификации микроорганизмов: Энтеротьюб (Франция), Микро-ла-тест — Энтеротест 24, Энтеротест 16, Энтеро-рапид 24 и др. (Чехия), МТС (Россия), СИБ (Россия). Преимущества перечисленных систем заключаются в высокой стандартизации процесса идентификации, сокращении времени анализов, удобстве.

Для иммуноферментной диагностики бактерий и некоторых видов дрожжей фирмой “Abbott laboratories” была разработана система, основу которой составляет прибор “Abbott quantum II Big”. Особый интерес вызывают возможности современного прибора iEMS-фотометра производства Thermo Labsystems (Финляндия) и др.

Для видовой идентификации плесневых грибов учитывают морфологические характеристики колоний и результаты микрокопирования после инкубации на стандартной среде Чапека в течение 10 – 14 сут [119 – 121].

Особый интерес для выделения и идентификации микроорганизмов представляют сегодня хромогенные питательные среды [104, 122]. Однако на сегодняшний день они не рекомендованы ни одной из фармакопей.

Таким образом, выявление микроорганизмов-контаминантов ЛС во многом зависит от используемых питательных сред.

На протяжении многих лет в нашей стране и за рубежом разрабатывались составы наиболее эффективных питательных сред, в том числе и с селективными и дифференциально-диагностическими свойствами. Подбирались вещества — ингибиторы роста определенных микроорганизмов, красители, а также условия культивирования микроорганизмов. Для стандартизации процесса идентификации, сокращения времени анализов, экономии материальных затрат и удобства в работе все шире используются тест-системы для биохимической идентификации выделенных микроорганизмов. Перспективна иммуноферментная диагностика бактерий и грибов.

Анализ литературных данных позволяет отметить большую работу специалистов-микробиологов многих стран по изучению различных аспектов проблемы микробиологической чистоты ЛС. Однако в нашей стране до последнего времени оставались нерешенными вопросы, связанные с развитием, углублением и совершенствованием методов микробиологического анализа, схем испытания различных ЛС, дифференцированного подхода к установлению норм допустимой микробной загрязненности. Введение в действие Государственной Фармакопеи России XII изд. (2007 г.) во многом продвинули решение указанной проблемы.

ЛИТЕРАТУРА

1. I. R. Berry, R. A. Nash, A. H. Wachter, *Pharmaceutical Progress Validation*, CRC Press, FL, USA (2003).
2. L. O. Kailings, F. Ernerfeldt, L. Silverstolpe, *Reports to the National Board of Health, Microbiological contamination of medicinal preparations*, Stockholm (1966).
3. L. O. Kailings, *Contamination in the manufacture of pharmaceutical products. Secretariat of the European Free Trade Association*, Geneva, Switzerland (1973), pp. 17 – 23.
4. *The United State Pharmacopeia: XVIII rev.*, Bethesda (1970), pp. 848 – 851.
5. *Ceskoslovensky lekopis*, Praha (1954).
6. *Государственная фармакопея РФ, Часть 1, Медицина*, Москва (2007).
7. Директива ЕС 2001/83/ЕС от 06.11.2001 г. “Кодекс Сообщества в отношении лекарственных средств для человека” (2001).
8. ГОСТ Р 52249-2004. Правила производства и контроля качества лекарственных средств (правила GMP ЕС) (2004).
9. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Ремедиум, Москва (2000).
10. В. В. Береговых, А. П. Мешковский, *Нормирование фармацевтического производства. Обеспечение качества продукции*, Ремедиум, Москва (2001).
11. W. Manu-Tawiah, *J. Pharm. Sci. Tech.*, № 55, 171 – 175 (2001).
12. *Pharmaceutical cGMP for the 21 Century-A Risk-Based Approach*, US FDA (2002).
13. К. Брайт, *Чистые помещения и технол. среды*, № 4, 22 – 25 (2004).
14. Ш. Галатович, *Чистые помещения и технол. среды*, № 4, 4 – 8 (2003).
15. В. Уайт, *Технология чистых помещений. Основы проектирования, испытаний и эксплуатации*, Клинтрум, Москва (2002).
16. *Microbiological Best Laboratory Practices*, *Pharm. Forum.*, 30(5), 17 (2004).
17. *Фармацевтическая микробиология*, В. А. Гольинкин, В. И. Кочеровец (ред.), Арбения, Москва (2003).
18. В. А. Гольинкин, Н. А. Заикина, К. А. Каграманова и др., *Санитарно-микробиологический контроль в пищевой и фармацевтической промышленности*, Санкт-Петербург (2004).
19. G. Morris, *Journ. Hosp. Infect.*, № 44, 81 – 92 (2000).
20. А. Д. Дурнев, С. Б. Серединин, *Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий)*, Медицина, Москва (1999).
21. К. Н. Wallhauzer, *Pharm. Ind.*, № 42, 6394 – 6400 (1980).
22. *Методические указания МУ 2.1.4.1057-01. Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды*, МЗ России, Москва (2001).
23. СанПиН 2.1.4.1074-01 от 26.09.2001. *Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных*

- систем питьевого водоснабжения. Контроль качества, Минздрав России, Москва (2001).
24. Методические указания МУК 4.2.671-97. Методы санитарно-микробиологического анализа питьевой воды, Фед. центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, Москва (1997).
 25. МУК 4.2.1018-01. Санитарно-эпидемиологический анализ питьевой воды, МЗ России, Москва (2001).
 26. МУК 4.2.734-99. Микробиологический мониторинг производственной среды, Москва (1999).
 27. G. Temprano, *PDA J. Pharm. Sci. Tech.*, № 58, 215 – 221 (2004).
 28. Й. Ленгелер, Г. Дреус, У. Шлегель, *Современная микробиология: прокариоты*, т. 2, Мир, Москва (2005).
 29. C. S. Abreu, *PDA J. Pharm. Sci. Tech.*, № 58, 45 – 53 (2004).
 30. W. E. Horner, *Air- and Dustborne Mycoflora in Houses Free of Water Damage and Fungal Growth*, Marietta, GA, USA (2004).
 31. *Технология чистоты, Отчет о XIII симпозиуме по контролю микрозагрязнений*, АСИНКОМ, № 1, 10 – 13 (1997).
 32. А. П. Иныхов, *Чистые помещения и технол. среды*, № 4, 10 – 15 (2002).
 33. П. Когер, *Чистые помещения и технол. среды*, № 2, 21 – 23 (2003).
 34. С. Н. Фурсов, *Чистые помещения и технол. среды*, № 2, 30 – 38 (2003).
 35. Методические рекомендации МУ-45-116. Определение класса чистоты производственных помещений и рабочих мест. Приборы и методы, Информ.-изд. центр Минздрава России, Москва (1997).
 36. ГОСТ Р ИСО 14644-5-2005. Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Ч. 5. Эксплуатация (2005).
 37. B. Reinmuller, B. Ljungqvist, *Eur. J. Parenteral Sci.*, **5**(3), 55 – 58 (2000).
 38. R. Williams, *Appl. Envir. Microbiol.*, № 67, 2453 – 2459 (2001).
 39. R. M. Maier, J. L. Peper, Ch. P. Gerba, *Environmental Microbiology*, New York (2002).
 40. Инструкция "Порядок проведения контроля параметров воздушной среды в "чистых" помещениях и методы их измерений при производстве лекарственных средств" РДИ 42-505-00, Минздрав России, Москва (2000).
 41. А. Мюллер, *Чистые помещения и контрол. среды*, № 4, 18 – 26 (2002).
 42. E. Graf, R. Scheer, I. Schollborn, *Pharm. Ind.*, **51**(9), 1041 – 1045 (1989).
 43. E. J. Plumpton, J. T. F. Foil, P. Gilbert, *Microbios Let., Cambridge, Great Britain*, № 27, 7 – 15 (1982).
 44. C. A. Mims, *Medical Microbiology*, Mosby Europe, London (1993).
 45. Б. Рейнмюллер, Б. Люнговист, *Техника чистых помещений и Правила GMP*, Москва (2003), сс. 53 – 68.
 46. А. Ю. Попов, *Чистые помещения и технол. среды*, № 1, 5 – 6 (2003).
 47. E. G. Beveridge, *Microbiol. Aspects Deterior. Mater.*, London (1975), pp. 213 – 235.
 48. Э. Люк, М. Яген, *Консерванты в пищевой промышленности*, Санкт-Петербург (2003).
 49. R. Churner, R. Cunningham, *Ann. Ophthalmol.*, **15**(8), 724 – 729 (1983).
 50. S. Butrus, S. Klotz, *Cur. Eyes*, № 5(10), 745 – 748 (1986).
 51. E. Pitsigavdaki, M. Spiropoulou, *Acta Microbiol. Hellenica*, № 35, 341 – 348 (1990).
 52. A. Pinna, *Ophthalmology*, № 108, 1830 – 1834 (2001).
 53. *Pharmaceutical Micbiology*, S. S. Purohit, A. K. Saluja, H. N. Kakrany, Agrobios Jodpur (2003).
 54. K. A. Bruck, S. Nash, F. D. Fooley, et al., *Arch. Surg.*, № 102, 476 – 482 (1972).
 55. T. Lund, M. L. De Buyser, P. E. Granum, *Mol. Microbiol.*, № 38, 254 – 261 (2000).
 56. K. J. Ryan, *An Introduction to Infection Disease*, Appleton and Lange Connecticut, Norwalk (1994).
 57. М. В. Гусев, Л. А. Минеева, *Микробиология*, Академия, Москва (2006).
 58. M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Brock, *Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, New Jersey (1997).
 59. Т. И Ушакова, *История развития представлений о метаболическом синдроме*, Г. Е. Ройтберг (ред.), МЕДпресс-информ, Москва (2007).
 60. Б. А. Шендеров, *Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома*, ЛеЛи принт, Москва (2008).
 61. Б. А. Шендеров, *Отраслевое питание*, № 1, 24 – 29, (2006).
 62. Б. А. Шендеров, *Медицинская микробная экология и функциональное питание*, Том I: *Микрофлора человека и животных и ее функции*, Изд. ГРАНТЪ, Москва (1998).
 63. Б. А. Шендеров, *Медицинская микробная экология и функциональное питание*, Том II: *Социально-экологические и клинические последствия дисбаланса микробной экологии человека и животных*, Изд. ГРАНТЪ, Москва (1998).
 64. Б. А. Шендеров, *Пробиотики, пребиотики и синбиотики. Общие и избранные разделы проблемы. Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки*, № 2, 23 – 26 (2005).
 65. S. R. Gill, M. Pop, R. T. DeBoy, et al., *Science*, **312**, 1355 – 1359 (2006).
 66. G. I. Novik, A. A. Samartsev, N. L. Astapovich, et al., *Appl. Biochem. Microbiol.*, **42**(2), 166 – 172, (2006).
 67. K. E. Scholz-Ahrens, P. Ade, B. Marten, et al., *J. Nutr.*, **137**, 838 – 846 (2007).
 68. F. Negretti, S. I. M. A. Su Convegno, *Norme di igiene nella produzione alimentare farmaceutica e cosmetica*, Milano (1977), pp. 78 – 98.
 69. Y. Sagath, J. Babik, R. Martincova, *Zbb. Pharm.*, **113**(6), 571 – 576 (1974).
 70. M. Soad, Abu El-Souad, *Indian J. Pharm. Sci.*, **47**(6), 197 – 200 (1985).
 71. J. E. Martinez, *Pharm. Technol.*, feb., 58 – 70 (2002).
 72. A. J. Fontana, *Pharm. Formulation and Quality*, **7**(4), 66 – 68 (2005).
 73. A. J. Fontana, J. Mumford, *Pharm. Formulation and Quality*, **7**(6), 63 – 66 (2005).
 74. A. J. Fontana, *Pharm. Microbiological Forum*, Newsletter, **12**(10), 10 (2006).
 75. W. D. Grunt, *Life at low water activity. Philosophical transactions of the Royal Society*, London (2004), pp. 1249 – 1267.
 76. D. Wenter, *Pharmeuropa*, **12**(3), 373 – 375 (2000).
 77. A. R. Fassihi, M. S. Parker, *Int. Biodeterior. Bul.*, № 13, 75 – 80 (1977).
 78. ГОСТ 26670 – 91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов, Москва (1991).
 79. ГОСТ Р 51446 – 1999 (ISO 7218–96). *Микробиология*, Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований, Издательство стандартов, Москва (1999).
 80. ГОСТ 10444.12 – 94. Продукты пищевые. Методы определения дрожжей и плесневых грибов, Издательство стандартов, Москва (1994).
 81. ГОСТ 10444.15 – 94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, Изд-во стандартов, Москва (1994).
 82. ГОСТ Р 50474 – 93. Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек, Изд-во стандартов, Москва (1993).
 83. ГОСТ 30705 – 2000. Продукты молочные для детского питания. Метод определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, Изд-во стандартов, Москва (2000).
 84. ГОСТ 30706-2000. Продукты молочные для детей. Метод определения дрожжей и плесневых грибов, Изд-во стандартов, Москва (2000).

85. ГОСТ 30726-2001. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *E. coli.*, Изд-во стандартов, Москва (2001).
86. R. L. Merker (ed.), *Media and reagents*, Appendix 3, in: *Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual*, AOAC International, Gaithersburg, MD (1998).
87. Г. Г. Онищенко, В. И. Ефременко, И. С. Тюменцева и др., *Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.*, прил. № 6, 88 (2003).
88. В. В. Карцев, Л. В. Белова, В. П. Иванов, *Санитарная микробиология пищевых продуктов*, ГМА им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург (2000).
89. *Practical Food Microbiology*, D. Roberts, M. Greenwood (eds.), Technology, Bodmin, UK (2003).
90. C. Collins, H. Lyne, M. Patricia, *Microbiological methods*, Butterworths, London, (1985).
91. E. J. Rhodehamel, S. M. Harmon, *Bacillus cereus*, Ch. 14, in: *Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual*, Gaithersburg (1998).
92. G. Bornet, *Microbiologiques analysis dans la securitee systeme*, Rev. med. Vet. (France), 151(8-9), 805-812 (2000).
93. W. Hewitt, *Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: A Rational Approach*, Interpharm / CRC, Boca Raton, FL, USA (2003).
94. M. H. Rubinstein, C. G. Wilson, *Handbook of microbiological Quality control: Pharmaceutical and Medical Devices*, London (2000).
95. *Rapid Microbiological Methods in Pharmaceutical Industry*, M. C. Easter (ed.), Medical, Boca Raton, FL, USA (2003).
96. *Automated Microbial Identification and Quantitation. Tecynologies for the 2000s*, Wayne P. Olson (ed.), Boca Raton, FL, USA (1996).
97. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, M. J. Miller (ed.), Vol. III, DHI Publishing: River Grove, IL (2006).
98. *European Pharmacopoeia*, 5th ed., Strasburg (2005).
99. *The United State Pharmacopoeia*, XXXI rev., Rockville (2008).
100. *Japanese Pharmacopoeia*, JP XIV, Suppl. II, Ch. 47 (2001).
101. D. A. A. Mossel, K. E. Dijkman, *Media and methods for growing yeasts*, Utrecht (1998), pp. 279-288.
102. A. D. Ring, J. I. Pitt, L. R. Beuchat, J. E. L. Corry, *Methods for mycological examination*, Plenum Press NATO Scientific Affairs Division, New York, London (1984).
103. J. W. Hastings, W. Y. J. Tsai, L. B. Bullerman, *J. Agricultural Res. Divis.*, № 16, 47-49 (1987).
104. V. Prigione, *Appl. Environ. Microbiol.*, № 70, 1365-1365 (2004).
105. S. Sutton, *Pharm. Microbiol. Forum Newsletter*, 12, 4-9, (2006).
106. S. Sutton, *Pharm. Microbiol. Forum Newsletter*, 12(4), 2-8 (2006).
107. S. Sutton, *Pharm. Microbiol. Forum Newsletter*, 13(1), 4-14 (2007).
108. D. Y. C. Fung, *Rapid Microbiol. News*, 3, 4-5, (2002).
109. О. Л. Старцева, Е. Б. Смирнова, Л. С. Катунина и др., *Материалы междунар. науч.-практ. конф. "Разработка и производство диагностических сухих питательных сред и микросистем"*, тез. докл., Махачкала (2001), с. 7.
110. З. З. Султанов, А. З. Алиев, Е. А. Какулина и др., *Материалы междунар. науч.-практ. конф. "Разработка и производство диагностических сухих питательных сред и микросистем"*, тез. докл., Махачкала (2002), сс. 40-41.
111. В. А. Голынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, *Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов*, справочник. В. А. Голынкина, В. И. Кочеровец (ред.), Проспект науки, Санкт-Петербург (2006).
112. *Pharmaceutical Micobiological Manual*, HiMedia Laboratories, Pvt. Limited, India (2006).
113. *Handbook of Microbiological Media*, Ronald M. Atlas.(ed.), CRC Press. Boca Raton, London, New York, Washington (2004).
114. М. С. Поляк, В. И. Сухаревич, М. Э. Сухаревич, *Питательные среды для медицинской микробиологии*, Санкт-Петербург (2003).
115. Т. И. Осокина, З. А. Исаева, Л. А. Астарханова и др., *Матер. междунар. науч.-практ. конф. "Разработка и производство диагностических сухих питательных сред и микросистем"*, тез. докл., Махачкала (2003), сс. 9-10.
116. Л. Д. Газиумарова, *Матер. междунар. науч.-практ. конф. "Разработка и производство диагностических сухих питательных сред и микросистем"*, тез. докл., Махачкала (2003), сс. 18-19.
117. Каталог Хаймедиа, *Сухие питательные среды и добавки*, Mumbai, Индия (2003).
118. Каталог Биорад лаборатории, Москва (2002).
119. *Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология*, Книга 1, А. С. Лабинская, Е. Г. Волина (ред.), БИНОМ, Москва (2008), сс. 989-1011.
120. В. И. Билай, Э. З. Коваль, *Аспергиллы: определитель*, Наукова Думка, Киев (1988).
121. Н. М. Пидопличко, *Грибы — паразиты культурных растений: определитель*, Наукова Думка, Киев (1977).
122. М. Manafi, *J. Food Microbiol.*, № 60, 205-218 (2003).

Поступила 28.09.10

MICROFLORA CONTAMINATION OF DRUGS: ASPECTS OF INVESTIGATION (A REVIEW)

O. V. Gunar

State Scientific Center for Drug Expertise and Control, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Various aspects of the investigation of microorganisms present in pharmaceutical preparations are considered. Sources of contamination in nonsterile drugs are indicated. Problems related to changes in perception and therapeutic quality of contaminated drugs and hazard of microorganisms for human health are analyzed. Data on the qualitative and quantitative composition of contaminant microflora isolated from various drugs are presented. Effective methods of contaminant isolation are described. Modern nutrient media and methods for the identification of bacteria and fungi during the microbiological quality control of drugs are presented.

Key words: Pharmaceutical preparations (drugs), contamination with microorganisms, microbiological quality control