**МИКРОФЛОРА РАСТЕНИЙ. ФИТОПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ.**

**МИКРОФЛОРА ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ**

**И ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

1. Микрофлора растений

Микроорганизмы являются постоянными «спутниками» не только человека и животных, но и высших растений. Они встречаются как на поверхности, так и внутри надземных и подземных органов растений (стеблей и листьев, семян, плодов, корней).

***Эпифитная микрофлора*** находитсяна поверхности надземной части растения на протяжении всей его жизни. Она однообразна и не зависит ни от вида растений, ни от их места произрастания. Для микроорганизмов эпифитной микрофлоры растение –основное место обитания. Эпифитная микрофлора сохраняется на семенах и при их прорастании переходит на поверхность растений. Чаще всего встречаются *Bacterium herbicola* *aureum* и *Pseudomonas fluorescens*, реже – *Bacteria mesentericus, Bacteria vulgaris*, грибы, *Escherichia coli*. Исследования показали, что, выделяя антимикробные вещества, эпифитные бактерии тем самым действуют губительно на возбудителей заболеваний растений. Наряду с этим высказываются предположения, что возбудители заболеваний растений – фитопатогенные бактерии произошли в процессе эволюции от эпифитных бактерий.

***Микрофлора ризосферы*.** Зона почвы, находящаяся в контакте с корневой системой растений, называется ризосферой, а микроорганизмы, развивающиеся в ней – ризосферными. Выделяют два типа ризосферы: *ближнюю (ризоплану)* и *отдаленную*.

Ризоплана располагается непосредственно на поверхности корней, отдаленная ризосфера – в радиусе 50 см от них. Количество микроорганизмов в ризосфере в 100 раз больше, чем в почве, где растения не произрастают. Скопление микробов вокруг корней связано с выделением последними различных питательных веществ. Кроме корневых выделений, микроорганизмы ризосферы используют для питания отмершие корневые волоски эпидермиса.

Основная масса прикорневой ризосферы представлена различными неспорообразующими бактериями. Качественный состав микрофлоры ризосферы зависит от вида растений. Так, ведущее место в ризосфере крестоцветных занимают флуоресцирующие бактерии, клевера – азотобактер и т.д.. Численность видов, населяющих ризосферу, находится в зависимости от возраста и физиологического состояния растений.

Максимальное количество микроорганизмов наблюдается в период кущения, цветения, плодоношения. Бактерии ризосферы благоприятно воздействуют на растения:

* стимулируют его развитие за счет увеличения в ризосфере минеральных элементов питания (минерализация органических веществ, остатков растений, трупов животных), образования витаминов, ростовых веществ;
* улучшают структуру почвы;
* проявляют антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным микроорганизмам.

Наряду с пользой, приносимой растениям эпифитными и ризосферными бактериями, они способны вызывать и заболевания. Например, *Pseudomonas fluorescens* при проникновении через поврежденные ткани может вызвать загнивание растения.

***Микориза* –** единое морфологическое образование, состоящее из грибов и корней растений. При этом гриб и растение находятся в симбиотических взаимоотношениях. В настоящее время известно около 2000 видов растений, способных к образованию микоризы. Различают экзотрофные и эндотрофные микоризы. *Экзотрофная микориза* – это ассоциация, при которой гриб не проникает вглубь корней, а поселяется на его поверхности, образуя чехол из мицелия. При *эндотрофных микоризах* мицелий гриба располагается в клетках коры корней растений. *Перитрофная микориза*, когда грибница не связана с корнями растений, не оказывает влияние на развитие растения.

Значение микоризы:

* микориза увеличивает поглощающую поверхность корней растений за счет разветвления гиф гриба, создавая тем самым благоприятные условия для питания растений;
* растения в свою очередь выделяют ряд ростовых веществ, стимулирующих развитие гриба.

## 2. Фитопатогенные микроорганизмы

Бактерии, вызывающие заболевания растений, называются ***фитопатогенными***. Они обладают различной степенью патогенности и относятся к различным родам: *Erwinia, Pseudomonas, Xanthomonas, Agrobacterium, Pectobacterium, Rhizobium* и др. (таблица 1).

Заболевания растений, вызываемые бактериями, называются бактериозами, которые подразделяются на 3 группы:

* общие или сосудистые
* местные паренхиматозные
* опухоли.

При общем поражении возбудитель проникает в сосудистую систему корней, болезнь сопровождается увяданием листьев, стеблей и приводит к гибели растения. Типичный пример сосудистого бактериоза – *кольцевая гниль картофеля*.

При паренхиматозных поражениях бактерии проникают в ткани, где с помощью особых ферментов приводят к мацерации и отслаиванию тканей растения.

Опухолевые образования на растениях бывают раковые и туберкулезные. При раковых опухолях наблюдается разрастание ткани, при туберкулезных – в разрастающейся ткани образуются полости, заполненные бактериальной слизью.

Таблица 1. Основные фитопатогенные бактерии

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| РОД БАКТЕРИЙ | ВИД | ВЫЗЫВАЕМЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ |
| *Erwinia* | *E. amylovora* | Ожог, увядание |
| *Pseudomonas* | *P. syringae* | Пятнистость |
| *Xanthomonas* | *X. heterocea* | Пятнистость , увядание |
| *Corynebacterium* | *C. insidiosum,*  *C. fasciens* | Увядание |
| *Pectobacterium* | *P. phetophtorum,*  *P. aroidae* | Гнили |
| *Rhisobium* | *R. legyminosorum* | Язвы |
| *Agrobacterium* | *A. tumefaciens* | Опухоли |

Наблюдаются и смешанные типы поражения растений. В пораженных растениях нарушается нормальный ход физиологических процессов и, прежде всего, фотосинтез и дыхание. Нарушаются также углеводный и белковый обмены. Все это в конечном итоге приводит к снижению продуктивности растений и их гибели. Изменение химического состава тканей растений и снижение содержания активных веществ приводит к невозможности использования их в качестве сырья для приготовления лекарственных средств.

Растения могут поражаться не только бактериями, но и грибами, и вирусами.

К *микофитозам* относятся гнили, фузариозы, аскохитозы и другие болезни (таблица 2).

Таблица 2Фитопатогенные грибы

|  |  |
| --- | --- |
| КЛАСС ГРИБОВ | ВЫЗЫВАЕМОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ |
| Оомицеты | черная гниль яблок  фитофтороз картофеля |
| Аскомицеты | Мучнистая роса  рак каштана  Увядание (вилт) хлопчатника, томатов, картофеля, капусты |
| Базидиомицеты | Головня и ржавчина зерновых культур |
| Несовершенные грибы | Некоторые поражения стеблей и листьев |

К вирусным инфекциям относятся мозаичная болезнь, карликовость, желтуха, увядание. Они могут быть локальными и системными.

*Фитопатогенные вирусы* вызывают более 20% болезней растений. Основные – представители семейства *Reoviridae*, родов *Phytoreovirus* и *Fujivirus*.

По способу внедрения в организм вирусные заболевания относятся к раневым инфекциям, крайним проявлением которых является некроз. Исключение – инфицирование растений-паразитов, в ткани которых вирус проникает при объединении его проводящих путей и инфицированного хозяина.

Распространение в организме происходит от клетки к клетке по плазмодесмам при участии элементов цитоскелета со скоростью 1 мм в день или медленнее. При попадании в проводящие ткани распространяются со скоростью 2,5 см в минуту. Степень генерализации процесса зависит от свойств вируса и самого растения-хозяина.

***Проявления болезней растений***

По совокупности анатомических и физиологических изменений определяют тип болезни растений:

Камеде-, смоло-, слизетечения. Чаще вызывают бактерии рода *Erwinia* и грибы (*Ascomycetes*), наблюдают у лиственных и хвойных деревьев.

Сухая и мокрая гниль. Размягчаются и разрушаются отдельные участи тканей растения за счет деятельности бактерий (род *Pectobacterium*) и грибов (*Ascomycetes* и несовершенные грибы).

Мучнистая роса. На листьях и побегах возникает белый налет, который является следствием размножения грибов (*Ascomycetes*).

Пожелтение, увядание, засыхание. Чаще всего вызывают грибы (*Fungi imperfecti*), реже бактерии (род *Corynebacterium*), может носить неинфекционный характер.

Чернь. На листьях и побегах появляется черная пленка вследствие развития грибов, бактерий рода *Erwinia.*

Ожог. Листья, молодые побеги, цветы, плоды буреют, чернеют. Возбудителями ожога являются бактерии рода *Erwinia*.

Пятнистость. Некоторые бактерии (род *Pseudomonas*), грибы (класс *Ascomycetes* и несовершенные грибы), вызывают образование разного цвета, формы, размеров пятен на листьях, плодах, семенах.

Опухоли. Местное увеличение ствола, ветвей, корней, корневищ в виде наростов, вздутий, утолщений за счет гиперплазии клеток. Эти заболевания вызывают бактерии (род *Agrobacterium*), грибы.

Язвы. Проявляются в виде углублений, часто окруженных наплывом. Вызываются бактериями (род *Erwinia*), грибами, механическими повреждениями.

Мозаика листьев. На листьях появляются бледно окрашенные пятна, чередующиеся с нормально окрашенными участками. Вызывается вирусами (вирус мозаичной болезни табака).

«Ведьмины метлы». Образование побегов из спящих почек вызывают бактерии (род *Rhisobium*), грибы (класс *Ascomycetes*) и вирусы.

Деформации. Проявляются в изменении формы органов (искривление побегов, курчавость листьев, карликовость) вследствие поражения грибами (*Ascomycetes* и несовершенные грибы), вирусами (семейство *Reoviridae*).

***Источники заражения растений*** – вода, почва, воздух, насекомые, семена. Особенно большую опасность представляют последние, а также посадочный материал и оставшиеся в почве пораженные растения. Все это составляет основной резервуар фитопатогенных бактерий, которые служат не только местом хранения возбудителя, но и средством его распространения. Заражение семян происходит либо при уборке урожая, либо во время роста растения, когда бактерии проникают в семена с больных органов растений. С семян и клубней бактерии переходят на растения различными путями: по сосудам, могут выноситься на поверхность почвы с оболочкой семян и поражать листья. Большую роль в распространении фитопатогенных бактерий играют насекомые. Они инфицируют растения при поедании, через экскременты или при кладке яиц. Однако следует отметить, что в почве фитопатогенные микроорганизмы не могут длительно существовать из-за антагонизма эпифитных бактерий, грибов, актиномицетов.

В растения бактерии проникают через естественные (устьица, нектарники, чечевички) или искусственные ходы (ранки, царапины).

***Факторами вирулентности*** фитопатогенных бактерий являются токсины и ферменты. Токсины взаимодействуют с клеточными ферментами растений, инактивируют их, в результате чего клетки отмирают. Под действием целого ряда ферментов (пектолитических, протеолитических, целлюлолитических) происходит расщепление веществ клеточной стенки растений, в результате этого возбудители свободно проникают в клетки и разрушают их.

Однако растения обладают защитными механизмами от поражения фитопатогенными бактериями:

* образуют биологически активные вещества – фитонциды, разрушающие токсины бактерий;
* имеют высокую кислотность растительного сока, что подавляет развитие возбудителей;
* антагонизм эпифитных микроорганизмов;
* наличие микоризы.

***Меры борьбы с бактериозами***

* дезинфекция (протравливание) семян и посадочного материала (черенков, саженцев), дезинфекция почвы,
* смена культур в севообороте,
* своевременный сбор урожая и уничтожение растительных остатков после него, выведение иммунных сортов растений.

***Дезинфекция*** проводится различными способами: химическим, физическим и биологическим. При химическом способе используют водный раствор формалина 1:90, слабый раствор сулемы 1:1000, гранозан и др. Физический способ включает прогревание семян при температуре до 60°С в течение 10-20 мин. При биологическом проводится их обработка бактериофагами, фитонцидами, антибиотиками.

# 3. Микрофлора лекарственного сырья и готовых

# лекарственных препаратов

Растительное лекарственное сырье может загрязняться микроорганизмами на всех стадиях его заготовки (сбор, сушка, измельчение, упаковка, хранение). Преобладают на сырье представители микрофлоры воздуха, часто встречаются споровые и неспоровые палочки, кокки, пигментные бактерии, плесневые грибки, дрожжи. Находясь на растительном лекарственном сырье, микробы не только механически загрязняют его, но и при неправильном хранении (повышенная влажность, запыленность помещения, наличие насекомых, грызунов и т.д.) размножаются на нем, используя его для жизнедеятельности. При этом под действием микробных ферментов разрушаются фармакологически важные активные вещества, что приводит к снижению его лечебной ценности. Признаками порчи являются изменение консистенции, цвета, запаха. Особенно быстро портится свежее сырье.

***Источники контаминации готовых препаратов* –** нестерильный воздух аптек, оборудование, сырье, посуда, пробки, вода, руки персонала. Существенное значение приобретает также возможность распространения микробов, особенно патогенных, через рецепты.

*Микробной порче подвергаются:*

* порошки (особенно тальк, крахмал), сборы
* растворы, микстуры, настои, отвары, капли
* мази, пасты, шарики, свечи
* стерильные инъекционные препараты

Наибольшее количество микробов может быть в водных настоях, отварах, наименьшее – в настойках. Поэтому хранение настоев и отваров в холодильнике не должно превышать 2-е суток.

Находясь в готовых лекарственных препаратах, микроорганизмы размножаются в них, разрушая при этом активные компоненты препарата. Наиболее частыми признаками порчи настоев и отваров являются появление мути, изменение цвета, образование пленки, осадка, кислого запаха и т.д. Особенно ярко эти признаки порчи выражены при добавлении сахарного сиропа и при хранении в теплом помещении. Микробная загрязненность готовых препаратов во многом зависит от соблюдения в аптеках санитарно-гигиенического режима.

***Для предупреждения микробной загрязненности*** лекарственных средств необходимо соблюдать следующие правила:

* обеззараживать воздух с помощью бактерицидных ламп,
* соблюдать правила личной гигиены,
* соблюдать технологию приготовления лекарственных препаратов,
* правильно хранить лекарственное сырье и готовые лекарственные формы,
* при необходимости применять консерванты.

# 3.1. Определение микробной контаминации

# лекарственных средств

Согласно требованиям ВОЗ и Государственной Фармакопеи Республики Беларусь существуют определенные нормативы, ограничивающие микробную контаминацию лекарственных препаратов. Для выявления микроорганизмов в лекарственных препаратах используют методы микробиологического анализа. Обычно определяют количество микроорганизмов в 1 г сухого препарата или в 1 мл раствора. Методики микробиологического анализа конкретной лекарственной формы индивидуальны. Это связано с бактерицидным и бактериостатическим действием самих препаратов, а также с чувствительностью или резистентностью микроорганизмов к данному лекарственному средству.

Микробиологическая чистота лекарственных средств, субстанций и вспомогательных материалов для производства лекарственных средств должна соответствовать требованиям, изложенным в статье 5.1. Государственной Фармакопеи Республики Беларусь «Общие тексты по стерилизации» (таблицы 3-4).

Таблица 3 – Микробиологическая чистота лекарственных средств

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Категория | Применение | Рекомендуемые нормы ГФ РБ |
| 1 | - Для парентерального введения   - Глазные лекарственные средства   - Для нанесения на открытые раны и ожоги   - Другие лекарственные средства, к которым предъявляется требование «стерильность» | Стерильность |
| 2 | - Для применения местно, трансдермально   - Для применения интравагинально   - Для ведения в полости yxa,ноca   - Для введения в дыхательные пути (за исключением тех лекарственных средств, которые должны быть стерильными) | - Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно)  - не более 102 в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие бактерий семейств *Enterobacteriaceae* в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие *P. аеruginosa* в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие *S. aurеus* в l г или в 1 мл |
| 3 | Для приема внутрь или введения ректально  *А. Лекарственные средства uз субстанций синтетического происхождения*  *Б. Лекарственные* *средства* *из субстанций природного происхождения (растительного, животного, минерального),* *за* *исключением средств, включенных в Категорию 4* | * Общее число аэробных бактерий не более 103 в 1 г или в 1 мл    - Общее число грибов не более 102 в 1 г или 1 мл   - Отсутствие *E. соli* в 1 г или 1 мл   - Общее число аэробных бактерий не более 104 в 1 г или в 1 мл   - Общее число грибов не более 102 в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие *E. соli* в1 г или в1 мл   - Отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 10 г или в 10 мл   - Отсутствие *P. aeruginosa* в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие *S. aureus* 1 г или в1 мл   - Энтеробактерий  - не более 102 в 1 г или в 1 мл |
| 4 | *В.* *Детские лекарственные средства* | - Общее число аэробных бактерий не более 500 в 1 г или в 1 мл   - Общее число грибов  - не более 50 в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие *P. aeruginosa* в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие *S. aureus* в 1 г или в 1 мл |
| 5 | Лекарственные средства, состоящие из одного вида сырья (фасованная продукция) или нескольких (сборы), также растительное сырье «ангро»  *А. Лекарственные растительные средства или лекарственное сырье «ангро», применяемые в виде настоев и отваров, приготовленные с использованием термической обработки*  *В. Лекарственные растительные средства или лекарственное сырье «ангро», применяемые без термической обработки* | - Общее число аэробные бактерий не более 107 в 1 г или в 1 мл   - Общее число грибов не более 105 в 1 г или 1 мл   * *E. соli*  - не более 102 в 1 г    - Общее число аэробных бактерий не более 10 в 1 г или в1 мл   - Общее число грибов не более 104 в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие *E. соli* в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 10 г или в 10мл   - Энтеробактерий  - не более 102 в 1 г или в 1 мл |

Таблица 4 – Микробиологическая чистота субстанций и вспомогательных материалов для производства лекарственных средств

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Категория** | **Применение** | **Рекомендуемые нормы ГФ РБ** |
| 1.2 | Субстанции  для производства:  *Стерильных*  *лекарственных средств*  *Нестерильных лекарственных средств, относящихся к Категории 2* | - Общее число аэробных бактерий и грибов  (суммарно) не более 102 в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие бактерий семейства *Enterobacteriaсеае* в 1 г или в 1 мл |
| 2.2 | *Нестерильных лекарственных средств, относящихся к Категории 3В* | - Отсутствие *P. aeruginosa* в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие *S. aureus* 1 г или в 1 мл |
| 3.2. | *Субстанции синтетического*  *происхождения для производства нестерильных лекарственных средств* | - Общее число аэробных бактерий не более 102 в 1 г или в1 мл   - Общее число грибов не более 102 1 г или в 1 мл   - Отсутствие *E. соli* в 1 г или в 1 мл |
| 4.2. | *Субстанции природного*  *происхождения (растительного, животного или минерального)*  *Вспомогательные материалы (мука пшеничная, крахмал, тальк и т.д.)* | - Общее число аэробных бактерий не более 102 в 1 г или в 1 мл   - Общее число грибов не более 10 в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие *E. соli* в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 10 г или в 10 мл   - Отсутствие *P. aeruginosa* в 1 г или в 1 мл   - Отсутствие *S. aureus* в 1 г или в 1 мл   - Энтеробактерий не более 102 1 г или в 1 мл |

Как видно из таблиц, ***стерильными*** должны быть инъекционные препараты, мази, пленки, глазные капли и все лекарственные формы для новорожденных, для местного лечения гнойных ран, язв, ожогов.

Лекарственные формы для приема *per os* не должны содержать патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Допускается не более 100 микробных клеток в 1 г (мл) препарата для лекарственных форм местного, интравагинального применения, а также для применения в полости уха и носа.

В состав некоторых нестерильных лекарственных препаратов входят компоненты и консерванты, обладающие антимикробным действием. Чтобы избежать неправильной оценки результатов испытания на микробиологическую чистоту предварительно определяют действие лекарственного средства в отношении следующих тест-культур: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis (cereus), Candida albicans*. Для культивирования тест-культур применяют соответствующие среды (таблица 5).

Таблица 5. Среды для культивирования тест-культур

|  |  |
| --- | --- |
| Тест-культура | **Питательная среда** |
| *Bacillus subtilis (cereus)* | МПА с 0,1% глюкозы |
| *Staphylococcus aureus* | МПБ с 2,5% глюкозы |
| *Pseudomonas aeruginosa* | МПА с глицерином |
| *Escherichia coli* | Среда обогащения с 10% глюкозой, малахитовым зеленым и феноловым красным |
| *Candida albicans* | Среда Сабуро |

**3.1.1. Постановка опыта с тест-культурами *Bacillus subtilis (cereus) и***

***Candida albicans*.**

Бульонную культуру тест-микроорганизма разводят 1:1000 бульоном и по 0,1 мл вносят в пробирки с расплавленной и остуженной до 45°С соответствующей (см. таблицу 5) средой (по 4 пробирки).

В контрольные пробирки (половина пробирок с каждой средой) добавляют по 1 мл стерильного фосфатного буфера рН 7,0.

В опытные пробирки вносят по 1 мл исследуемого препарата, разведенного 1:10 в этом же буфере. Содержимое быстро перемешивают и выливают в чашки Петри на слой предварительно разлитой по 15-20 мл той же питательной среды.

Равномерно распределяют верхний слой агара, оставляют до застывания. Инкубируют 5 суток при 370С.

**3.1.2. Постановка опыта с тест-культурами *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus.***

Готовят разведения суточной бульонной тест-культуры, вносят по 0,1 мл в пробирки с 10 мл соответствующей среды (по 4 пробирки с каждой средой). В контрольные пробирки вносят по 1 мл стерильной воды, в опытные – по 1 г (мл) исследуемого препарата. Проводят дифференцировку бактерий, применяя соответствующие дифференциально-диагностические среды.

**3.1.3. Методы устранения антимикробного действия лекарственных средств.**

Для устранения антимикробного действия лекарственных средств применяют различные методы:

1. увеличивают разведения препарата;
2. добавляют специфические инактиваторы, которые нейтрализуют антимикробное действие препарата, но не угнетают рост микроорганизмов (например, пенициллиназу – для β-лактамных антибиотиков, пара-аминобензойную кислоту – для сульфаниламидов);
3. комбинируют 1 и 2 методы;
4. в питательные среды вводят неспецифические инактиваторы (4% твин-80, 0,5% яичный лецитин);
5. при неэффективности вышеперечисленных методов для растворимых лекарственных средств используют метод мембранной фильтрации.

#### 3.1.4. Инактивация некоторых антибиотиков.

#### Для инактивации пенициллинов и цефалоспоринов применяют пенициллиназу. Перед внесением пенициллиназы питательный агар расплавляют и охлаждают до 500С. Пенициллиназу вносят асептически для пенициллинов из расчета 1000 ЕД на 1 мл среды, для цефалоспоринов – 50 000-100 000 ЕД на 1 мл среды. Кроме этого, пенициллиназу вносят в буферный раствор, используемый для растворения и суспензирования образца.

Для инактивации тетрациклинов во время приготовления питательных сред, используемых для посева лекарственного препарата, вносят 10% сульфата магния MgSO4 •7H2O.

Для инактивации сульфаниламидов во время приготовления в питательные среды и в буферный раствор вносят парааминобензойную кислоту из расчета 0,05 г на 1 л среды.

Консерванты, входящие в состав мягких лекарственных форм, инактивируют при помощи 3% твина-80 или 0,2% лецитина. Эти неспецифические инактиваторы также вносят в буферный раствор или в питательные среды во время их приготовления.

При наличии в препарате двух консервантов с различной химической структурой для их инактивации используют смесь, состоящую из 3% твин-80, 0,3% летицина, 0,1% гистидина и 0,5% тиосульфата натрия.

**3.2. Определение микробной загрязненности**

**лекарственных средств, не обладающих антимикробным действием**

**3.2.1. Отбор проб и приготовление образца для анализа.**

Из каждой серии препарата, независимо от объема, не менее чем из 10 разных упаковок, отбирают 10 равных проб, общим объемом не менее 50 г или 50 мл. При анализе препарата используют 30 г образца, который делят на 3 части по 10 г.

Разводят 10 г или 10 мл препарата стерильным 0,1 М фосфатным буфером рН 7,0 или соответствующей питательной средой до конечного объема 100 мл.

Для разведения мягких лекарственных форм готовят эмульсию препарата. С этой целью в колбу со стеклянными бусами вносят 10 г препарата, 10 г твина-80, 80 мл 0,1М фосфатного буфера рН 7,0 (разведение 1:10). Предварительно твин-80 и буферный раствор нагревают до 40-450С. Для получения гомогенной эмульсии колбу встряхивают на водяной бане при 40-450С в течение 5 минут.

**3.2.2. Питательные среды, используемые для определения микробной загрязненности лекарственных средств, не обладающих антимикробным действием:**

1. МПА с 0,1% глюкозы
2. среда Сабуро с антибиотиками (100 мл бензилпенициллина или 50 г левомицетина на 100 мл среды)
3. среды обогащения для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*
4. висмут-сульфитный агар
5. среда с феноловым красным для идентификации бактерий семейства *Enterobacteriaceae*
6. среда с нитратом калия
7. среда обогащения для *S. аureus и P. аeruginosa*
8. среда для выявления пигмента *P. аeruginosa*
9. солевой агар с маннитом для идентификации *S. аureus*.

**3.3. Показатели микробной загрязненности лекарственных средств**

1. Общее количество бактерий
2. Количество дрожжевых и плесневых грибов
3. Наличие бактерий семейства *Enterobacteriaceae*
4. Наличие *S. аureus*
5. Наличие *P. аeruginosa*.

**3.3.1. Определение общего количества бактерий**

В две пробирки с 4 мл расплавленного и охлажденного до 45-500С МПА с 0,1% глюкозой вносят 1 мл препарата, предварительно разведенного 1:10 буфером, быстро перемешивают и выливают в две чашки Петри с 15-20 мл застывшей этой же среды. Равномерно распределяют верхний слой быстрым покачиванием чашки. После застывания агара чашки инкубируют при 370С в течение 5 суток. Затем подсчитывают количество колоний, выросших на двух чашках, определяют среднее арифметическое и высчитывают количество бактерий в 1 г (мл) образца. Причем, чтобы получить достоверные результаты, учитывают только те чашки, на которых выросло не более 300 колоний. Если число колоний более 300, делают ряд разведений (1:100, 1:1000, 1:2000 и т.д.) и засевают наиболее подходящее разведение.

3.3.2. Определение общего количества грибов.

Посевы, как и описанные выше, делают двухслойным агаровым методом. Используют среду Сабуро с антибиотиками. Инкубируют чашки с посевами в течение 5 суток при 240С.

**3.3.3.** **Определение бактерий из семейства *Enterobacteriaceae***

Делают посев 10 г (мл) образца в 90 мл среды обогащения, перемешивают, инкубируют при 370С 24-48 ч.

При наличии роста пересевают колонии на среду Эндо и висмут-сульфитный агар, инкубируют при 370С 24-48 ч.

Представители семейства *Enterobacteriaceae* образуют на среде Эндо крупные колонии малинового цвета, с металлическим блеском или без блеска, могут быть розовые или бесцветные, выпуклые, блестящие колонии 2-4 мм в диаметре.

На висмут-сульфитном агаре колонии могут быть черными с металлическим блеском или коричневые, зеленовато-бурые, светло-зеленые и т.п.

Во всех случаях при микроскопировании обнаруживают грамотрицательные палочки без спор. Из отдельных колоний выделяют чистую культуру на скошенном МПА с 0,1% глюкозы, инкубируют при 370С 24 ч.

Идентификацию представителей семейства *Enterobacteriaceae* проводят по следующим свойствам:

1. При посеве на среду с глюкозой и феноловым красным выявляют ферментацию глюкозы, среда при этом из красной становится желтой.
2. При посеве на среду с нитратом калия и реактивом Грисса обнаруживают восстановление нитратов в нитриты по покраснению среды.
3. Проводят тест на цитохромоксидазу, который у энтеробактерий должен быть отрицательным.

*Примечание:* Если выделенная культура содержит грамотрицательные палочки, которые ферментируют глюкозу, восстанавливают нитраты в нитриты, не образуют цитохромоксидазу, делают вывод о наличии в исследуемом образце представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

**3.3.4. Определение видов *Staphylococcus аureus и Pseudomonas аeruginosa*.**

В 90 мл среды для накопления вносят 10 г (мл) препарата, инкубируют при 370С 24-48 ч. При наличии роста пересевают культуры на чашки Петри с маннитсодержащим солевым агаром для выделения *S. аureus* и на ЦПХ-агар – для идентификации *P. аeruginosa*.

После инкубации при 370С в течение 24-48 ч на солевом агаре с маннитом S. аureus образует золотисто-желтые колонии с зоной помутнения вокруг за счет выделения лецитиназы. При микроскопии мазков из этих колоний обнаруживают грамположительные кокки. С выделенной чистой культурой проводят тест на наличие плазмокоагулазы. Для этого делают посев колоний в пробирки со стерильной цитратной плазмой кролика. S. аureus через 1-24 ч коагулирует плазму.

На ЦПХ-агаре *P. аeruginosa* образуют зеленоватые флюоресцирующие колонии, которые выделяют в среду растворимый пигмент сине-зеленого цвета, дают положительную пробу на цитохромоксидазу. При микроскопии – грамотрицательные неспоровые палочки.

**3.4. Определение микробной загрязненности антибиотиков и других лекарственных средств, обладающих**

**бактерицидным действием**

**3.4.1.** **Предварительные условия**

Перед проведением опыта готовят растворы для анализа и питательные среды. Критериями для выбора растворителя являются скорость растворения препарата и отсутствие у самого растворителя антимикробных свойств.

1. Готовят 1 л 0,5% раствора антибиотика или 10% суспензию таблеток с антибиотиком. Таблетки для приготовления суспензии растирают в стерильных фарфоровых ступках.

2. В качестве растворителя для некоторых антибиотиков (феноксиметилпенициллина, ампициллина, тетрациклина) применяют 1/15 М фосфатный буфер рН 7,8-8,0; для оксациллина – 0,9% раствор NaCl.

3. Питательные среды МПА, Сабуро, Эндо, кровяной агар разливают в чашки Петри.

**3.4.2. Постановка опыта.**

Приготовленный раствор антибиотика немедленно фильтруют по 250 мл через каждый из 4 мембранных фильтров. Фильтры 5 раз отмывают от антибиотика, используя по 100 мл растворителя. Затем фильтры кладут в чашки Петри на следующие среды:

* на МПА с инактиватором – для определения общего количества микроорганизмов. Инкубируют посевы при 370С в течение 3 суток.
* на среду Сабуро – для определения общего количества дрожжевых и плесневых грибов. Инкубируют посевы при 240С в течение 5 суток.
* на среду Эндо с инактиватором для определения бактерий из семейства *Enterobacteriaceae*. Инкубируют посевы при 370С в течение 3 суток.
* на кровяной агар с инактиватором – для обнаружения *S. аureus*. Инкубируют посевы при 370С в течение 3 суток, обнаруживают зоны гемолиза вокруг колоний.

Приготовленные из таблеток суспензии по 0,2 мл засевают при помощи шпателя сплошным газоном на поверхность питательных сред параллельно в 3 чашки Петри. Подсчитывают количество выросших колоний. Результаты записывают в протокол и делают заключение (таблица 6).

Таблица 6 – Форма протокола для определения микробной

загрязненности лекарственных средств

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Лекарственное средство | Количество микроорганизмов в 1 г препарата | | | | | |
| бактерии | плесневые грибы | дрожжевые грибы | патогенные стафилококки | бактерии рода  *Enterobacteriacea* | грамотрицательные палочки, не ферментирующие лактозу на среде Эндо |
|  |  |  |  |  |  |  |
| Заключение |  | | | | | |

4. Определение стерильности лекарственных средств.

Пирогены.

Для достижения стерильности лекарственных средств (препаратов для инъекций, глазных капель, средств для новорожденных, мазей, пленок) необходимо строго соблюдать режимы стерилизации и санитарные правила изготовления, установленные Государственной фармакопеей или соответствующими техническими условиями.

Стерильные препараты могут содержать продукты деградации микробных клеток, которые вызывают в организме пирогенную реакцию.

***Пирогены*** – это, прежде всего липополисахариды (ЛПС) бактерий, которые освобождаются при их разрушении. При попадании в организм ЛПС взаимодействует с ЛПС-связывающим белком, а затем этот комплекс присоединяется к рецепторам макрофагов. В результате активации макрофага происходит выделение интерлейкина 1, который обладает пирогенным действием и приводит к повышению температуры тела. Содержание в препарате большого количества ЛПС может привести к выделению огромного количества различных медиаторов (ИЛ1, ФНОα и других цитокинов), которые вызывают расширение сосудов, резкое падение артериального давления с развитием шокового состояния.

Предназначенные для инъекций растворы не должны содержать пирогенов. Пирогены термостабильны, проходят через антибактериальные фильтры, в связи с чем не всегда возможно освободить от них готовые лекарственные средства. Поэтому существуют специальные требования к растворам до стерилизации. Так, растворы для инъекций перед стерилизацией не должны содержать более 30 микробных клеток в 1 мл, а время от их изготовления до стерилизации не должно превышать 1,5 часа.

Дистиллированная вода, которая предназначена для изготовления стерильных лекарственных форм, не должна содержать *E. coli*, а общее микробное число не должно превышать 10 клеток в 1 мл.

Испытания стерильности лекарственных средств проводят в боксах со строгим соблюдением правил асептики. В боксах работают в стерильных халатах, в специальной стерильной обуви. Боксы обрабатывают несколькими дезинфицирующими растворами, не менее чем за 2 часа до начала работы включают бактерицидные лампы. Регулярно воздух в боксе проверяют на микробную обсемененность методом седиментации. Для этого открывают на 15 минут чашки Петри с МПА и средой Сабуро, затем инкубируют их в термостате при 370С 48 ч. На чашке с МПА допустимым считается рост не более 5 колоний; на среде Сабуро роста плесневых и дрожжевых грибов не должно быть.

При производстве, упаковке, хранении и продвижении готовых лекарственных средств должны быть предприняты меры для обеспечения их микробиологической чистоты.

**5. Лекарственные растения и растительные средства, обладающие антимикробным эффектом**

В настоящее время интенсивно формируется резистентность к антибиотикам и антисептикам у основных возбудителей внутрибольничных инфекций (госпитальных штаммов стафилококков, энтеробактерий и псевдомонад), увеличивается число антисептических препаратов, к которым обнаруживаются устойчивые варианты микроорганизмов.

Применение растительных средств в течение многих десятилетий позволило установить эффективность их использования, выявить широкий спектр действия. На современном фармацевтическом рынке доля отечественных антимикробных препаратов составляет 24% в общей номенклатуре лекарственных средств, при этом фитопрепаратам в анализируемой группе отводится более 20%.

На данный момент все антибиотические вещества природного происхождения могут быть классифицированы следующим образом:

*I. Антимикробные вещества из бактерий*

1. вырабатываемые неспорообразующими бактериями
2. вырабатываемые спорообразующими бактериями

*II. Антимикробные вещества из водорослей*

*III. Антимикробные вещества из грибов*

1. вырабатываемые сумчатыми грибами
2. вырабатываемые базидиальными грибами
3. вырабатываемые несовершенными грибами
4. вырабатываемые лучистыми грибами

*IV. Антимикробные вещества из лишайников*

*V. Антимикробные вещества высших растений*

1) антимикробные вещества мхов

2) антимикробные вещества плаунов

3) антимикробные вещества семенных растений.

Экспериментальные исследования подтверждают, что устойчивость патогенных возбудителей к растительным противомикробным средствам не развивается так быстро, как к синтетическим антибактериальным препаратам. К тому же сочетанием нескольких растений с разными биологически активными веществами и введением переменных противомикробных компонентов возможно повысить эффективность средства.

Среди широкого спектра всех биологических антисептиков, образующихся в организмах бактерий, плесневых грибков, высших растений и в тканях животных, значительная роль принадлежит открытым Б.П. Токиным в 1928-1930 гг. бактерицидам растений – фитонцидам. Фитонцидные свойства присущи как низшим (водоросли, слизевики, грибы, лишайники и бактерии), так и высшим (мхам, папоротникам, хвойным, цветковым) растениям, которые с успехом используются при лечении и профилактике многих воспалительных заболеваний.

Установлена способность выделяемых летучих фракций действовать на бактерии на расстоянии от источника фитонцидов, проявляющих выраженное бактерицидное, бактериостатическое и фунгицидное свойства. Самыми эффективными фитонцидными растениями признаны чеснок, лук, хвойные.

Фитонциды хвойных растений стимулируют фагоцитоз, проявляют бактерицидные свойства плазмы крови, повышают уровень титра лизоцима в сыворотке крови. Изучение препаратов из хвои пихты сибирской показало, что при их длительном ингаляционном применении происходит накопление аскорбиновой кислоты в органах и усиливаются восстановительные процессы в тканях. В настоящее время на основе пихты имеется широкий арсенал препаратов для местного лечения гнойных ран (эфирное масло, мази).

Фитонциды обладают санирующим действием на окружающий воздух, обильно загрязненный, например, гемолитическим стрептококком и коклюшной палочкой.

Высокую активность в отношении патогенных микроорганизмов проявляют эфирные масла. При концентрации в питательной среде 0,1-0,6% эфирных масел полыни Лерха происходит полное подавление роста *S. aureus*. Эфирные масла душицы обыкновенной проявляют широкий спектр антибиотической активности в отношении микрофлоры, вызывающей внутрибольничные инфекции, экспериментальные препараты из тимьяна Маршалла, ромашки, тысячелистника обыкновенного, подорожника большого, душицы обыкновенной, зверобоя продырявленного, бадана толстолистного высоко эффективны в отношении *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *Salmonella sp.*, *P. vulgaris*, изолированных из ран животных.

Методами диффузии в агар и серийных разведений в жидкой питательной среде выявлена антибактериальная активность дитерпенов из шалфея в отношении *Staphylococcus, Streptococcus, E. coli,* *B. cereus* и *Micrococcus luteus*.

Растительное сырье, содержащее флавоноиды и фенилпропаноиды (родиола розовая, сирень обыкновенная, эхинацея пурпурная, мелисса лекарственная, анхуза лекарственная, воробейник краснокорневой, табак, расторопша пятнистая, полынь эстрагон (тархун), тополь черный), служит источником для разработки препаратов с антимикробным действием.

Бактерицидные свойства проявляют многие пищевые растения: хрен, горчица, редька, томаты, картофель, морковь, кукуруза, красный перец, сахарная свекла, сельдерей, петрушка, лавр благородный, злаки. Лечебная активность растений обусловлена содержанием в них большого комплекса разнообразных и сложных по своему химическому составу и фармакологическому действию биологически активных веществ, в частности, алкалоидов, гликозидов, полисахаридов, эфирных и жирных масел, органических кислот, витаминов, дубильных веществ, пигментов, аминокислот, флавонов, ферментов. Так, свежий сок листьев алоэ богат ферментами, витаминами, обладает бактерицидным действием на различные группы бактерий, и поэтому находит применение для лечения инфицированных ран. Капуста огородная содержит сахара, гемицеллюлозу, различные витамины (С, Р, В1, В2, В6, К, D), каротин, ферменты, минеральные соли, органически связанную серу, фермент лизоцим, что обеспечивает ей антимикробный эффект.

В настоящее время в Республике Беларусь и за рубежом ведется активная работа по изучению лекарственных растений и разработке на их основе препаратов, эффективных в отношении различных возбудителей.

Растения семейства Маковых богаты алкалоидами, обусловливающими антимикробный, антифунгальный эффект. Разработанный в 70-е годы XX века сотрудниками ВИЛАР (Россия) антимикробный препарат «Сангвиритрин» подтвердил свою высокую эффективность в хирургической практике, и в настоящее время широко применяется в Российской Федерации для лечения заболеваний бактериального и грибкового генеза. В основе механизма антимикробного эффекта суммы алкалоидов лежит блокирование бактериальных нуклеаз, нарушение процессов проницаемости клеточной стенки, перегородки деления, структуры нуклеоида.

При определении антимикробной активности фитоэкстракта «Диабефит», состоящего из травы горца птичьего, травы девясила высокого, коры ивы, побегов черники и травы крапивы в отношении музейных штаммов микроорганизмов былопоказано, что полиэкстракт обладает бактериостатическим действием по отношению к *E. сoli, S. faecalis, S. aureus, P. aeruginosa.* Противобактериальное действие препарата обусловлено наличием эфирных масел, дубильных веществ, кумаринов, фурокумаринов, полисахаридов.

Методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде показана высокая антимикробная активность препарата «Тантон», содержащего 17 компонентов, в отношении *S. aureus*, *E. сoli, S. faecalis*, *P. vulgaris, P. aeruginosa*. Благодаря растениям, таким как календула, солодка, астрагал, крапива, бадан, аир, девясил, родиола, левзея, облепиха, шиповник, имбирь, кардамон, перец, петрушка «Тантон» проявлял бактерицидное действие по отношению к *E. сoli, S. faecalis*, *P. vulgaris* в разведении 1:2, в то время как бактериостатическое по отношению к *P. aeruginosa* – вразведении 1:4, к *S. aureus, E. coli, S. faecalis* – в разведении 1:8, к *P. vulgaris* – в разведении 1:16.

Бразильскими исследователями установлена фунгицидная, антибактериальная и противовоспалительная активность небольшого декоративного тропического древесного растения *Cassia fistula L.* Лекарственное растение *Clinopodium vulgare L.* используется в болгарской народной медицине как средство с высоким антибактериальным действием по отношению к грамположительной и грамотрицательной микрофлоре, проявляющей множественную лекарственную резистентность.

При исследовании спиртовых экстрактов из высушенных размолотых образцов разных видов растений рода *Eupatorium* (сем. *Asteraceae*), используемых в народной медицине в провинции Энтре Риос (Аргентина), установлена их антимикробная активность в отношении *B. subtilis*, *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, Candida albicans, Mucor sp., Asperillus niger.*

Ароматические соединения природного происхождения широко используются в медицине Айюрведа. При исследовании трав *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum zeylanium* и *Cuminum cyminum* установлена их высокая антимикробная активность в отношении *S. aureus, B. subtilis, E. coli, P. vulgaris, P. aeruginosa* и *S. enterica serovar typhi*.

Ряд растительных объектов, успешно применявшихся в традиционной тибетской медицине для лечения тяжелых инфекций (трава остролодочника, корни софоры желтоватой, слоевище цетрарии исландской) исследован учеными Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии. Ими разработана рациональная технология экстракционных препаратов «Оксофил», «Софлавин», «Ислацет», обладающих широким спектром антимикробной активности.

На сегодняшний день весьма актуальным является изучение следующих представителей флоры Беларуси как перспективных источников сырья для разработки фитопрепаратов с антимикробным эффектом:

***Ольха серая (Alnus incana) и ольха черная (A. glutinous)сем. Betulaceae***

Соплодия и листья ольхи серой и ольхи черной – официнальное сырье для получения лекарственных средств, в том числе репаратора раневых поверхностей – «Альтан».

В народной медицине отвар используется местно для примочек при лечении ожогов, для полоскания ротовой полости при воспалительных процессах и кровоточивости десен, а также для остановки носовых кровотечений.

***Рябина обыкновенная (Sorbus aucuparia) сем. Rosaceae***

В народной медицине отвар из плодов рябины применяется наружно в качестве эффективного средства для лечения ран, обладающего антимикробным, ранозаживляющим, кровоостанавливающим, протистоцидным, фунгицидным эффектом.

***Берёза (Betula verrucosa), сем. Betulaceae***

Примочки с настоем из березовых листьев и отвар из березовых почек ускоряют заживление свежих ран. Березовый деготь входит в состав мазей для лечения гнойных ран и ожогов.

В настоящее время выпускается промышленный препарат – эфирное масло «Деготь».

***Чистотел большой (Chelidonium majus), сем. Papaveraceae***

Используется консервированный сок чистотела для лечения гнойных ран, панариция, послеоперационных осложнений, вызванных обсеменением ран *S. aureus*.

***Тысячелистник обыкновенный (Achillea millefolium), сем. Asteraceae***

Мазь, содержащая действующие вещества тысячелистника, проявляет противовоспалительный эффект, обладает антимикробной активностью в отношении *S. aureus* и *S. epidermidis*. Применяется при термических и химических ожогах, вялой грануляции ран травматического происхождения, у пациентов с пролежнями, трофическими язвами.

В настоящее время в Республике Беларусь происходит значительное расширение площадей для культивирования лекарственных растений. Белорусские фармацевтические предприятия (РУП «Борисовский завод медпрепаратов», УП «Диалек», РУП «Белмедпрепараты», РУП «Экзон», РУП «Изотрон») в рамках Республиканской программы «Фитопрепататы» проводят активную работу по переработке лекарственного растительного сырья и производству препаратов из него.