**Методика микробиологического исследования аптек**

 **1. Объекты бактериологического контроля**

1. Объектами бактериологического контроля являются:

1) Вода очищенная.

2) Растворы для инъекций до и после стерилизации.

3) Глазные капли после стерилизации и приготовленные в асептических условиях на стерильных основах.

4) Сухие лекарственные вещества, используемые для приготовления растворов для инъекций и глазных капель.

5) Аптечная посуда, пробки, прокладки, прочие вспомогательные материалы.

6) Инвентарь, оборудование, руки и санитарная одежда персонала.

7) Воздух.

**2. Отбор проб**

Для отбора проб используется стерильная посуда бактериологической лаборатории, режим стерилизации которой регулярно контролируется (от двух до пяти единиц из каждой партии проверяется на стерильность).

Кратность обследований с отбором проб составляет не менее двух раз в квартал.

Вода очищенная, используемая для приготовления лекарственных средств (кроме лекарственных форм для инъекций и глазных капель) отбирается в количестве не менее 500 мл (см3) в стерильную посуду.

При наличии в аптеке трубопровода для воды очищенной, отбор проб осуществляют из бюретки над столом ассистента и провизора-технолога. При этом конец бюретки предварительно обжигают ватой (факелом), смоченной спиртом. При отсутствии трубопровода для воды очищенной, а также при неудовлетворительных результатах отбор проб воды очищенной проводят из приемника.

Для оценки санитарного состояния трубопровода отбор проб воды очищенной можно производить непосредственно из трубопровода (в любом участке трубопровода).

Вода очищенная, используемая для приготовления растворов для инъекций и глазных капель, отбирается в количестве 15-20 см3 в стерильную посуду непосредственно из емкостей, в которые осуществлялась дистилляция.

 Растворы для инъекций отбираются во время их приготовления или не позднее полутора часов изготовления в той же посуде, в которой они будут подвергнуты стерилизации и доставляются в лабораторию для бактериологического контроля.

 Стерильные растворы для инъекций и глазные капли, а также глазные капли приготовленные асептическим способом, доставляют в аптечной упаковке.

Глазные капли из торгового зала аптек доставляют непосредственно в аптечной упаковке, отпускаемой в медицинские организации и населению. Целесообразно отбирать глазные капли трех-четырех наименований, как со стола ассистента, так и с витрины.

Отбор сухих лекарственных веществ (по показаниям) проводят стерильными ложками в стерильную посуду в количестве 30-50 граммов; если вещество в таблетках - отбор производят пинцетом также в количестве 30-50 граммов.

 Аптечную посуду, приготовленную для розлива растворов для инъекций и глазных капель, отбирают в момент их приготовления, в количестве трех штук одинаковой емкости. Флаконы доставляют в лабораторию в укупоренном виде, используя при этом аптечные пробки и прокладки (для отпуска лекарственных средств).

Пробки (корковые, полиэтиленовые, резиновые) и прокладки отбирают в момент приготовления растворов для инъекций и глазных капель пинцетом и помещают по пять штук в широкогорлую стерильную посуду (колбы, банки) с последующим закрытием стерильными ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками.

Фильтровальные воронки, мерные колбы, цилиндры, используемые для приготовления растворов для инъекций, контролируют путем ополаскивания их 10 см3 стерильной водопроводной воды, пробирки со смывной жидкостью доставляют в лабораторию для исследования.

Используемые в аптеках пипетки прополаскивают несколько раз в пробирке, содержащей 10 см3 стерильной водопроводной воды, пробирки со смывной жидкостью доставляют в лабораторию для исследований.

Смывы с инвентаря, оборудования, рук и санитарной одежды персонала аптеки производят стерильным ватным тампоном на палочках, вмонтированных в пробирки с 5 мг стерильной однопроцентной пептонной водой. Тампон увлажняют питательной средой, делают смыв с объекта и помещают в ту же пробирку, погружая в пептонную воду.

Ориентировочный перечень объектов, подлежащих контролю методом смывов:

1. рабочее место провизора-технолога;

2. стол для приготовления растворов для инъекций;

3. стол для приготовления глазных капель;

4. весы для взвешивания сухих веществ у провизора-технолога;

5. тара для хранения прокладок и пробок, используемых для укупорки растворов для инъекций и глазных капель, ступки, бюретки, пластинки пластмассовые;

6. весы;

7. кран водопроводный в ассистентской;

8. руки персонала, в том числе во время приготовления лекарственных форм;

9. полотенце для рук персонала;

10. санитарная одежда персонала.

 *Пробы воздуха отбирают в следующих помещениях:*

 1) асептический блок;

 2) стерилизационная лекарственных форм и аптечной посуды;

 3) ассистентская;

 4) фасовочная;

 5) дефектарская;

 6) помещения хранения лекарственных средств;

 7) моечная;

 8) зал обслуживания.

 *Отбор проб воздуха производят при соблюдении следующих условий:*

1) при соответствии уровня высоты отбора проб уровню высоты рабочего стола;

2) при закрытых форточках и дверях;

3) не ранее, чем через тридцать минут после влажной уборки помещения;

4) в чистом подготовленном к работе помещении или сразу после работы.

Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с помощью приборов для бактериологического анализа воздуха (аппарат Кротова и другие). Скорость протягивания воздуха должна составлять двадцать пять литров в минуту, количество пропущенного воздуха сто литров для определения общего количества бактерий, двести пятьдесят литров для определения золотистого стафилококка и двести пятьдесят литров для определения плесневых и дрожжевых грибов.

Для определения общего количества бактерий, отбор проб производят на 2% питательный агар, для определения золотистого стафилококка - на желточно-солевой агар, для определения плесневых и дрожжевых грибов на среду Сабуро; питательные среды для отбора проб воздуха аспирационным методом разливают в чашки по 12-15 мл.

В исключительных случаях допускается отбор проб воздуха производственных помещений аптеки седиментационным методом. При этом чашки Петри с мясопептонным агаром устанавливают в открытом виде на десять минут, желточно-солевым агаром, средой Сабуро - на двадцать пять минут.

**3. Методики исследования**

1. Исследования воды очищенной, используемой для изготовления лекарственных форм (кроме лекарственных форм для инъекций и глазных капель.

1.1 *Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 см3 воды очищенной* проводят следующим образом: исследуемую воду вносят по 1 см3 в две чашки Петри, которые затем заливают расплавленным и остуженным питательным агаром (450 С) и выдерживают двадцать четыре часа при температуре 370 С и двадцать четыре часа при комнатной температуре. После чего подсчитывают число выросших колоний как на поверхности, так и внутри питательного агара, подсчет проводится обязательно с помощью лупы. При вычислении результатов анализа выводят среднее арифметическое из числа колоний, выросших на обеих чашках. Для выявления плесневых и дрожжевых грибов засевают по 0,5 см3 исследуемой воды на поверхность двух чашек Петри со средой Сабуро и инкубируют при температуре 20-220 С в течение 3-4 суток. Затем подсчитывают число колоний плесневых и дрожжевых грибов на обеих чашках.

Количество мезофильных аэробных и факультативно - анаэробных микроорганизмов в 1 см3 исследуемой воды получают в результате суммирования числа бактерий, выросших на чашках с питательным агаром и на среде Сабуро.

1.2 *Определение титра бактерий группы кишечных палочек:* исследование проводится согласно действующей нормативной документации по воде.

2. Исследование воды очищенной для приготовления растворов для инъекций и глазных капель, растворов для инъекций до стерилизации и глазных капель, приготовленных в асептических условиях на стерильных основах.

2.1 *Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 см3 воды очищенной* проводят следующим образом: исследуемую воду вносят по 1 см3 в две чашки Петри, которые затем заливают расплавленным и остуженным питательным агаром (450 С) и выдерживают двадцать четыре часа при температуре 370 С и двадцать четыре часа при комнатной температуре. После чего подсчитывают число выросших колоний как на поверхности, так и внутри питательного агара, подсчет проводится обязательно с помощью лупы. При вычислении результатов анализа выводят среднее арифметическое из числа колоний, выросших на обеих чашках. Для выявления плесневых и дрожжевых грибов засевают по 0,5 см3 исследуемой воды на поверхность двух чашек Петри со средой Сабуро и инкубируют при температуре 20-220 С в течение 3-4 суток. Затем подсчитывают число колоний плесневых и дрожжевых грибов на обеих чашках.

Количество мезофильных аэробных и факультативно - анаэробных микроорганизмов в 1 см3 исследуемой воды получают в результате суммирования числа бактерий, выросших на чашках с питательным агаром и на среде Сабуро.

2.2 *Определение наличия бактерий группы кишечных палочек в 1см3* проводится следующим образом: лекарственные средства засевают в количестве 1 грамма (см3) на 9 см3 разведенной глюкозо-пептонной среды, среды Кесслер или Кода. Посевы выращивают при температуре 370 С в течение 18-24 часов с дальнейшим высевом секторами на среду Эндо, последнюю инкубируют при температуре 370 С в течение 18-24 часов и проводят просмотр посевов. При наличии роста из подозрительных колоний делают мазки, красят по Граму и микроскопируют. При наличии грамотрицательных палочек, оставшуюся часть колоний пересеивают на глюкозо-пептонную среду с поплавками или полужидкую глюкозу, инкубируют при 370С в течение восемнадцати - двадцати четырех часов. Наличие кислоты и газа на глюкозо-пептонной среде или в полужидкой глюкозе свидетельствует о содержании бактерий группы кишечных палочек.

 2.3 *Количественное определение бактерий группы кишечных палочек:* 1 грамм (см3) лекарственных средств засевают на чашку и заливают средой Эндо (глубинный метод посева). После инкубации посева при температуре 370С в течение 18-24 часов учитывают колонии типичные для группы кишечных палочек.

3. Исследование сухих лекарственных веществ, используемых для приготовления растворов для инъекций и глазных капель.

3.1 Исследование проводят в случае неоднократных неудовлетворительных бактериологических анализов и превышения норм предельно-допустимого содержания непатогенных микроорганизмов одновременно, при удовлетворительных результатах анализов воды очищенной, используемой для их приготовления, и при удовлетворительных данных бактериологического контроля посуды, флаконов, пробок, прокладок.

3.2 Сухие лекарственные вещества разводят стерильной водой очищенной с целью создания соответствующих концентраций растворов для инъекций и глазных капель, изготовляемых в аптеке. Объем и методика исследования приготовленных растворов - согласно пункта 17 данной Методики.

4. Исследование стерильных растворов для инъекций и глазных капель.

Для контроля стерильности лекарственных средств, применяют тиогликолевую среду и жидкую среду Сабуро, при этом объем питательной среды должен быть в десять раз больше объема образца для посева. Каждый образец засевают в две пробирки или в два флакона. Посевы в тиогликолевой среде инкубируют при температуре от 300С до 350С, а в среде Сабуро от 200С до 250С. Посевы просматривают ежедневно в течении восьми суток. При наличии роста (помутнения среды, образования пленки, осадка) готовят мазки для бактериоскопического подтверждения роста микробов.

5. Исследования аптечной посуды, пробок, прокладок, воронок, цилиндров и так далее.

5.1 Подготовка к исследованию:

Три одноименных флакона, доставленных в лабораторию, последовательно ополаскивают в 10 см3 стерильной водопроводной воды. Воду из флакона во флакон переливают над пламенем горелки, тщательно споласкивая каждый флакон.

 В посуду с доставленными пробками и прокладками наливают 10 см3 стерильной водопроводной воды и тщательно ополаскивают.

5.2 Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в смывной жидкости проводят согласно подпункта 1.1 данной Методики. Число колоний, установленное в 1 см3 смывной жидкости умножают на 10, что соответствует содержанию бактерий на всей смывной поверхности трех одноименных флаконов или на поверхности отобранных пробок и прокладок, или на поверхности другой аптечной посуды (цилиндры, воронки, пипетки).

5.3 Определение наличия бактерий группы кишечных палочек проводится следующим образом: оставшиеся 8 см3 смывной жидкости засевают в 1 см3 концентрированной глюкозо-пептонной среды и инкубируют при температуре 370 С в термостате в течение 18-24 часов. Дальнейший ход исследования проводят в соответствии подпункта 2.2 данной Методики.

6. Методика исследования воздуха.

6.1 Доставленные чашки с посевами на питательном агаре и желточно-солевом агаре инкубируют в термостате при 370 С в течение 18-24 часов, посевы на желточно-солевом агаре дополнительно выдерживают еще 24 часа при комнатной температуре. Посевы на среде Сабуро инкубируют при температуре 22-280 С - 4 суток.

Для определения общей бактериальной обсемененности через сорок восемь часов посевы просматривают, подсчитывают количество выросших колоний и производят пересчет на 1 м3 воздуха

6.2 Для определения количественного содержания золотистого стафилококка просматривают посевы на желточно-солевом агаре после 48 часов инкубации, колонии подозрительные на стафилококк подсчитывают и проводят идентификацию по классической схеме. После идентификации производят пересчет полученных результатов на 1 м3 воздуха.

6.3 Для количественного определения плесневых и дрожжевых грибов, после девяносто шести часовой инкубации, подсчитывают количество выросших колоний плесневых и дрожжевых грибов и производят пересчет на 1 м3 воздуха.

Пересчет количества выросших колоний на 1 м3 воздуха при седиментационном методе производят по Омелянскому (предполагается, что на поверхность 100 см3 агара за пять минут оседает такое количество бактерий, которое содержится в десяти литрах воздуха). Поэтому, при десятиминутной экспозиции стандартных чашек Петри (диаметром 9 см) с агаром, множитель для перерасчета берется равным 80.

7. Методика исследования смывов.

7.1 При исследовании смывов на наличие бактерий группы кишечных палочек посев производят из пробирок с 1% пептонной водой после инкубации при 37 0С в течении 24 часов на среду Эндо. Посевы на среде Эндо выдерживают при 370 С 18-24 часов. Чашки с посевами просматривают. При наличии на среде Эндо колоний, характерных для энтеробактерий - красных с металлическим блеском или без него, розовых с темным центром, слизистых, бледно-розовых, готовят мазки, окрашивают по Граму.

Дальнейший ход исследования проводят в соответствии подпункта 2.2.

7.2 При исследовании смывов на наличие патогенного стафилококка, в качестве среды накопления используют бульон с 6,5% раствором натрия хлорида или однопроцентной глюкозы, разлитый в пробирки по 5 мл, в который засевают по 0,5 мл смывной жидкости. Засеянные пробирки инкубируют при 370 С в течение 20-24 часов, после чего производят посев на желточно-солевой , молочно-солевой или молочно-желточно-солевой агар.

Дальнейший ход исследования проводят согласно классической схеме исследования на стафилококк.

 **4. Другие исследования**

Исследования на синегнойную палочку.

Специального посева воды очищенной, лекарственных средств и смывов для выделения синегнойной палочки производить не следует. Эти бактерии имеют характерный рост на среде Эндо и других средах. Основные дифференциальные признаки - грамотрицательные палочки, продуцируют пигмент, имеют характерный запах, оксидазоположительные, утилизируют цитрат на среде Симонса и Козера, разжижают желатину, растут на бульоне при температуре 420 С, не растут на среде с содержанием хлорида натрия 6,5 процентов.

Исследование на бактерии Протеус.

Специального посева воды очищенной, лекарственных средств и смывов для выделения бактерий рода Протеус, можно не проводить, так как они имеют характерный рост на среде Эндо. При необходимости проводится их видовая идентификация.

**5. Критерии оценки результатов проведенных исследований**

*Вода очищенная, используемая для приготовления лекарственных средств* (кроме лекарств для инъекций и глазных капель) должна соответствовать действующей нормативной документации по питьевой воде.

*Вода очищенная для приготовления растворов для инъекций и глазных капель, растворы для инъекций до стерилизации и глазные капли, приготовленные в асептических условиях на стерильных основах.* Предельно-допустимое количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов приведено в таблице 2.

Бактерии группы кишечных палочек не допускаются в 1 см3, приготовленных растворов.

*Сухие лекарственные вещества, используемые для приготовления растворов для инъекций и глазных капель.*

Предельно-допустимое количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов приведено в таблице 2.

Бактерии группы кишечных палочек не допускаются в 1 см3 приготовленных растворов.

*Аптечная посуда, пробки, прокладки, воронки, цилиндры и так далее.* Предельно-допустимое количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – сто пятьдесят (на поверхности трех флаконов, пяти прокладок, пяти пробок, другой аптечной посуды).

Бактерии группы кишечных палочек не допускается в 8 см3 смывной жидкости.

**6. Смывы**

 В смывах не допускаются бактерии группы кишечных палочек, золотистый стафилококк, синегнойная палочка.

 Во всех исследуемых пробах из аптеки не допускается наличие синегнойной палочки.

Бактерии рода Протеус не допускаются в исследуемых объемах анализируемых проб.

Таблица 1

 **Критерии оценки микробной обсемененности воздуха**

 **помещений аптечных организаций**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование помещения | Условия работы | Общее кол-во колоний микро- организмовв 1м3 воздуха | Количество золотистого стафилококка в 1м3 воздуха | Количество плесневых дрожжевых грибов в 1м3 воздуха |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Асептическая | до работы после работы | Не выше 500Не выше 1000 | не допускается | не допускается |
| Ассистентская, фасовочная, дефекторская, помещения хранения лекарственных средств | до работы после работы | Не выше 750 не выше 1000 | не допускается | не допускается |
| Моечная | во время работы | Не выше1000 | не более 3 | до 12 |
| Зал обслуживания | во время работы | Не выше1500 | до 10 |  до 20 |

Таблица 2

**Нормативы предельно допустимого содержания**

 **непатогенных микроорганизмов в лекарственных формах,**

 **изготовляемых в аптеках**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **№№** | **Наименование** | **Предельно допустимое содержание микроорганизмов в 1 куб. см** | **Примечание** |
|  | 2 | 3 | 4 |
| 1. |  **Растворы для инъекций до стерилизации, не позднее 1-1,5 часов после изготовления:**1) Глюкозы 5%-40% | 20-30 |  |
|  | 2) Натрия хлорида 0,9% | 20-30 |  |
|  | 3) Новокаина 0,25% и 2% | 20-30 |  |
|  | 4) Натрия хлорида 5,0  Калия хлорида 0,07 Кальция хлорида 0,12 Новокаина 2,5 Воды для инъекций – 1л  | в виде исключения до50 |  |
|  | 5) Рингера – Локка | 20-30 |  |
|   | 6) Сергозина 40% | 20-30 |  |
| 2. | **Глазные капли:**1) Раствор сульфацила растворимого ( альбуцида натрия) 20% и 30% | 5-7 |  |
|  | 2) Раствор атропина сульфата 1% | 5-7 |  |
|  | 3) Раствор дикаина 1%  | 5-7 |  |
|  | 1) Раствор этилморфина гидрохлорида ( дионина) 1%  | 5-7 |  |
|  | 5) Раствор калия йодида 2% | 5-7 |  |
|  | 6) Раствор синтомицина 0,25% | 5-7 |  |
|  | 7) Цинка сульфата 0,025Раствор борной кислоты 2% - 10,0 | 5-7 |  |
|  | 8) Раствор цинка сульфата 0,25% - 10,0 | 5-7 |  |
|  | 9) Раствор пилокарпина гидрохлорида 1%, 2%, 4% | 10-15 |  |
|  | 10) Раствор прозерина 0,25% | 5-7 |  |
|  | 11) Рибофлавина 0,001 (0,002); Аскорбиновой кислоты 0,05 (0,03) Глюкозы 0,2 Воды очищенной – 10,0  | 5-7 |  |
|  | 12) Рибофлавина 0,002; Калия иодида 0,3 Аскорбиновой кислоты 0, 05 Воды очищенной –10,0 | 5-7 |  |
| 3 |  **Вода очищенная:**  1) используемая для изготовления  стерильных растворов сразу же  после перегонки   | 10-15 | При получениии хранениивводыочищенной в усло-виях максимальноограничивающихвозможностьзагрязнениямикробами |