

# PROCEDEU DE DETERMINARE RAPIDĂ A BACTERIILOR GRAM-NEGATIVE TOLERANTE LA BILĂ ÎN MEDICAMENTE

CZU: 579.63:616-93/-98

DOI: <https://doi.org/10.52673/18570461.24.1-72.06>

Asistent universitar Nicolae PUȘCAȘ

E-mail: nicolae.puscas@usmf.md

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0005-4634-7231>

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

## PROCEDURE FOR RAPID DETERMINATION OF BILE-TOLERANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN DRUGS

**Summary.** The European Pharmacopoeia is a single reference study for the quality control of drugs. The official standards published within it provide a legal and scientific basis for quality control in the processes of drugs development, production and marketing. However, the long experience and the multitude of studies have demonstrated that medicinal forms represent unstable dispersed systems and can undergo various manifest or non-manifest changes, leading to drug incompatibilities. Along with the physico-chemical transformations, microbiological transformations can occur with the contamination of the final product with pathogenic, conditionally pathogenic or even saprophytic germs, especially medicines that do not undergo final sterilization or are not aseptically prepared. Microbial contamination of the drug can be an indicator of the production conditions; it can cause the instability of the product through the microbial decomposition of auxiliary substances, the alteration or definitive cancellation of the therapeutic effect of the active substances, the appearance of metabolites with toxic properties, especially those fractions of endotoxins on the wall cell of gram-negative bacteria with the development of allergenic, pyrogenic substances and the induction of the danger of local or general infections. An important role is attributed to the group of bile-tolerant gram-negative bacteria as representatives of microorganisms that are inadmissible in one g/ml for the absence test and for the quantitative test  $<10$  NCP/g/ml (probable number of bacteria), inadmissible in non-sterile medicinal products, herbal medicinal products for oral use and extracts used in their preparation. Due to the diversity of medicinal forms in terms of content, method of application, and therapeutic action, these preparations fulfil the indispensable conditions for the growth of microorganisms, therefore a primary concern is to avoid microbial contamination from the technological phase to the administration phase in order to prevent complications associated with bacterial infections. The given study reveals the testing of the procedure for the rapid determination of inadmissible microorganisms in non-sterile medicinal products and herbal drugs for oral use and the extracts used in their preparation, especially microorganisms of the group *Enterobacteriaceae spp.*

**Keywords:** *Escherichia coli*, procedure, rapid determination, drugs.

**Rezumat.** Farmacopeea Europeană este singurul studiu de referință pentru controlul calității medicamentelor. Standardele oficiale publicate în cadrul acesteia oferă o bază legală și științifică pentru controlul calității în procesele de dezvoltare, producție și comercializare a medicamentelor. Experiența îndelungată și multitudinea de studii au demonstrat însă că formele medicamentoase reprezintă sisteme disperse instabile și pot urma diverse modificări manifeste ori nemanifeste, cu apariția incompatibilităților medicamentoase. Odată cu transformările fizico-chimice pot surveni transformări microbiologice, însoțite de contaminarea produsului final cu germeni patogeni, condiționat patogeni sau chiar saprofiti, îndeosebi a medicamentelor care nu se supun sterilizării finale sau nu sunt preparate aseptice. Contaminarea microbiană a medicamentului poate constitui un indicator al condițiilor de producere, poate determina instabilitatea produsului prin descompunerea microbiană a substanțelor auxiliare, modificarea sau anularea definitivă a efectului terapeutic al substanțelor active, apariția de metaboliți cu proprietăți toxice, în special a fracțiunilor de endotoxine de pe peretele celular al bacteriilor gram-negative cu dezvoltarea substanțelor alergene, pirogene și inducerea pericolului de infecții locale ori generale. Un rol important i se atribuie grupului de bacterii gram-negative tolerante la bilă ca reprezentanți ai microorganismelor care nu sunt admise într-un g/ml pentru testul de absență și pentru testul cantitativ  $<10$  NCP/g/ml (numărul probabil de bacterii), inadmisibile în produsele medicamentoase nesterile, în medicamente pe bază de plante de uz oral și în extractele utilizate la prepararea acestora. Datorită diversității formelor medicamentoase sub aspect de conținut, mod de aplicare și acțiune terapeutică, aceste preparate îndeplinesc condițiile indispensabile dezvoltării microorganismelor, de aceea o primă preocupare este evitarea poluării microbiene din faza tehnologică până în faza administrării, pentru a preveni complicațiile asociate infecțiilor bacteriene. Prezentul studiu relevă testarea procedurii de determinare rapidă a microorganismelor inadmisibile în produsele medicamentoase nesterile, în medicamentele pe bază de plante de uz oral și în extractele utilizate la prepararea acestora, îndeosebi a microorganismelor din grupul *Enterobacteriaceae spp.*

**Cuvinte-cheie:** *Escherichia coli*, procedeu, determinare rapidă, medicamente.

## INTRODUCERE

Controlul microbiologic al medicamentului este una dintre misiunile esențiale în realizarea supravegherii calității medicamentelor de uz uman, în limitele prevăzute de normele oficiale și specificațiile Farmacopeelor naționale și internaționale. La momentul actual, practica medicală și observațiile din domeniul farmaceutic demonstrează faptul că numeroase forme medicamentoase, care adesea trec neobservate, pot conține bacterii și/sau fungi în proporții deosebit de variate și specii foarte diverse, în majoritate saprofite. Contaminarea lor cu germeni patogeni, condiționat patogeni sau chiar saprofiti ridică tot mai multe probleme de sănătate colectivă sau individuală. Aceste medicamente prezintă risc major în cazul tratării arsurilor, plăgilor și ulcerațiilor grave pe mari suprafețe epidermice denudate. La incidente fatale pot duce și medicamentele indigene intravenoase preparate în spitale, care au un risc ridicat de contaminare microbială având un termen de valabilitate scurt [1; 2].

Retragerea în ultimii ani a unui număr din ce în ce mai mare de produse farmaceutice ne-a făcut să conștientizăm cât de importantă este calitatea microbiologică a medicamentelor. Diseminarea microorganismelor în medicamente poate deveni o sursă de răspândire a patologiei infecțioase prin intermediul acestora, în cazul când produsele contaminate sunt procesate la nivel industrial în loturi apreciabile [3].

Stabilitatea unui medicament reprezintă, alături de eficacitate, puritate și inocuitate, un factor important în asigurarea calității acestuia. Medicamentul considerat stabil își menține caracteristicile de calitate, conferite la preparare, în limitele prevăzute de norme oficiale pentru o anumită perioadă de timp. Medicamentul trebuie să prezinte stabilitate fizică, chimică și microbiologică. Orice modificare a medicamentului, manifestă sau nemanifestă, atâta timp cât este în afara specificațiilor prevăzute de producător, poate determina instabilitatea eficacității și siguranței acestuia, poate genera incompatibilități medicamentoase și prezența microorganismelor inadmisibile, poate reprezenta surse de contaminare [1; 4]. La rândul său, activitatea metabolică a microorganismelor poate induce instabilități fizico-chimice, cu apariția metaboliților pirogeni, diminuarea proprietăților farmacocinetice și anularea efectului terapeutic, generând neîncrederea pacientului în beneficiile medicamentului.

În tratamentul diferitor maladii se utilizează diverse forme medicamentoase după conținut, modul de aplicare și acțiune terapeutică, ce pot fi expuse acțiunii factorilor nefavorabili indicați mai sus. Aceste

preparate îndeplinesc condițiile indispensabile dezvoltării microorganismelor, de aceea o primă preocupare este evitarea poluării microbiene a preparatului din faza tehnologică de preparare până în faza administrării [2; 4].

Controlul și prevenirea contaminării cu bacterii gram-negative tolerante la bilă necesită o abordare cuprinzătoare și proactivă. Aceasta implică măsuri manageriale stricte de monitorizare a calității și angajamente de îmbunătățire continuă a proceselor tehnologice, evitarea practicilor inadecvate de manipulare și condițiilor precare de depozitare și prelucrare a materiei prime brute, evitarea influenței factorilor de mediu în timpul perioadelor pre- și post-tehnologice din cauza naturii diverse a substanțelor active din componența medicamentului ce predispune la deteriorarea treptată a constituenților bioactivi, produsul rezultat având o calitate inferioară și eficacitate terapeutică modificată.

Scopul studiului rezidă în elaborarea procedurii pentru indicarea și identificarea rapidă a microorganismelor din grupul de bacterii gram-negative tolerante la bilă inadmisibile în medicamente. Procedul include mediul de cultură pentru multiplicarea și indicarea rapidă și setul minim de teste pentru identificarea rapidă.

## MATERIALE ȘI METODE

**Tulpini bacteriene.** În acest studiu au fost utilizate nouă tulpini bacteriene de referință din colecția americană care aparțin unui număr de patru specii: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Proteus vulgaris* ATCC 25933, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. În prealabil, tulpinile au fost precultivate în bulion tripticăză de soia. Toate tulpinile microbiene au fost cultivate pe medii specifice pentru fiecare specie, și anume: agar Tryptic Soy, agar Mannitol Salt, agar MacConkey, agar sânge, agar peptonat (BioMérieux, Franța) și mediul MCS-Ent. În studiu au fost utilizate, de asemenea, medicamente etichetate „steril”, preparate de uz oral și local, componente ale recepturilor de preparare a mediilor micropeliculare, reagenți și compuși chimici pentru obținerea selectivității, factori de favorizare a multiplicării și factori de inhibiție de la distribuitorii oficiali.

A fost utilizată metoda clasică microbiologică comparativă, metodele de indicare și identificare a enterobacteriilor și procedul propus de determinare

rapidă, studiul selectivității mediului micropelicular concentrat, studiul specificității procedurii rapid, studiul comparativ al mijloacelor de identificare cunoscute cu cel elaborat, controlul microbiologic al medicamentului reglementat de Farmacopeea Europeană cu controlul medicamentului după procedeu și algoritmul propus [5].

**Dezvoltarea mediului de cultură.** Procedeu propus constă din mediul de cultură micropelicular care include în componența sa hidrolizat de cazeină, gelatină, malonat de sodiu, cetyltrimethylammonium bromide, clorură de sodiu, albastru de bromtimol hidrosolubil, fosfat monopotasic, fosfat disodic. Cercetările au fost efectuate utilizând materiale și reactivi de puritate înaltă „SigmaAldrich”.

Pentru prepararea mediului MSD-Ent în prealabil se pregătesc soluții stoc de fosfați pentru obținerea soluției tampon fosfatic pH 7,2, de gelatină 10%, de bulion peptonat de 20% și roșu de fenol 1,0%.

Prepararea soluțiilor stoc de fosfați are loc după următoarea metodă: fosfat monopotasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) – 9,078 g se dizolvă în 1000 ml de apă distilată; fosfat disodic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) – 11,876 g în 1000 ml de apă distilată până la dizolvarea completă.

Soluția de gelatină 10% se pregătește într-un tub steril, în care se introduc 1,0 g de gelatină cristalizată și 9,0 ml de apă distilată. Se lasă timp de 45-50 de minute pentru a se umfla, apoi se încălzește în baia de vapori la temperatura de 85-90 °C, amestecându-se cu o bașchetă din sticlă până la dizolvarea completă.

Pentru pregătirea soluției de roșu de fenol de 1,0%, într-un tub steril se toarnă 10,0 ml de apă distilată sterilă, la care se adaugă 0,1g roșu de fenol. Tubul se încălzește timp de 45 de minute în baia de vapori la temperatura de 85-90 °C.

Prepararea mediului: într-o retortă chimic curată și sterilă se introduce soluție de hidrogenofosfat de sodiu – 49,0 ml, soluție de dihidrogenat de potasiu – 21,0 ml, hidrolizat de cazeină – 1000,0 mg, glucoză – 1000,0 mg, nitrat de sodiu – 250,0 mg, clorură de sodiu – 500,0 mg, bulion peptonat de 20% – 10,0 ml, cristal violet – 1,0 mg. Amestecul se agită, apoi se adaugă soluție de gelatină de 10% – 10,0 ml și soluție de roșu de fenol de 1% – 10,0 ml. Conținutul se agită, obținându-se un mediu de cultură lichid, care se toarnă cu pipeta dozată, câte 0,2 ml, în flacoane sterile. Se usucă la temperatura de +37 °C timp de 24-48 de ore și se sterilizează sub acțiunea razelor ultraviolete timp de 90-120 min. Tuburile se închid cu dopuri de cauciuc sterile, apoi cu capace metalice. Astfel, mediul elaborat prezintă o micropeliculă sterilă fixată la fundul unui flacon cu un volum de 10,0 ml.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru determinarea enterobacteriilor în flaconul cu mediu se aplică 2,0 ml de apă distilată sterilă și tulpina de *E. coli* în concentrația  $10^1$ - $10^9$ . Timp de 2-3 min. mediul se dizolvă, apoi se incubează în termostat la temperatura de 37 °C până la 9 ore. În cazul prezenței enterobacteriilor, culoarea roșie trece în galbenă ca rezultat al scindării glucozei și virării pH-ului spre acid, pe când în flaconul-martor culoarea nu se schimbă (rămâne roșie).

Timpul indicării enterobacteriilor depinde de concentrația inițială a germenilor într-un mililitru de material de examinat. Indicarea celulelor unice de bacterii *P. aeruginosa* este posibilă peste 9-24 de ore de incubare, iar a concentrației  $10^4$ - $10^5$  UFC/ml timp de 5-6 ore de incubare la temperatura de 37 °C (tabelul 1).

A fost determinată sensibilitatea și selectivitatea mediului propus. Pentru stabilirea selectivității mediului s-au efectuat experimente în serie cu patru loturi de microorganisme în asociație, în 30 de repetiții. La formarea asociațiilor au fost selectate microorganismele inadmisibile în majoritatea medicamentelor.

Lotul I. *E. coli* ATCC 25922 ( $10^2$ ) + *S. aureus* ATCC 25923 ( $10^6$ ); *E. coli* ATCC 25922 ( $10^2$ ) + *P. aeruginosa* ATCC 27853 ( $10^6$ ); *P. vulgaris* ATCC 25933 ( $10^2$ ) + *S. epidermidis* ATCC 149990 ( $10^6$ ); *K. pneumoniae* ATCC 700603 ( $10^2$ ) + *S. epidermidis* ATCC 149990 ( $10^6$ ).

Lotul II. *E. coli* ATCC 25922 ( $10^3$ ) + *S. aureus* ATCC 25923 ( $10^6$ ); *E. coli* ATCC 25922 ( $10^3$ ) + *P. aeruginosa* ATCC 27853 ( $10^6$ ); *P. vulgaris* ATCC 25933 ( $10^3$ ) + *S. epidermidis* ATCC 149990 ( $10^6$ ); *K. pneumoniae* ATCC 700603 ( $10^3$ ) + *S. epidermidis* ATCC 149990 ( $10^6$ ).

Lotul III. *E. coli* ATCC 25922 ( $10^4$ ) + *S. aureus* ATCC 25923 ( $10^6$ ); *E. coli* ATCC 25922 ( $10^4$ ) + *P. aeruginosa* ATCC 27853 ( $10^6$ ); *P. vulgaris* ATCC 25933 ( $10^4$ ) + *S. epidermidis* ATCC 149990 ( $10^6$ ); *K. pneumoniae* ATCC 700603 ( $10^4$ ) + *S. epidermidis* ATCC 149990 ( $10^6$ ).

Lotul IV. *E. coli* ATCC 25922 ( $10^5$ ) + *S. aureus* ATCC 25923 ( $10^6$ ); *E. coli* ATCC 25922 ( $10^5$ ) + *P. aeruginosa* ATCC 27853 ( $10^6$ ); *P. vulgaris* ATCC 25933 ( $10^5$ ) + *S. epidermidis* ATCC 149990 ( $10^6$ ); *K. pneumoniae* ATCC 700603 ( $10^5$ ) + *S. epidermidis* ATCC 149990 ( $10^6$ ) (tabelul 2).

În baza rezultatelor obținute s-a stabilit că mediul dispune de selectivitate față de enterobacterii, în funcție de concentrația inițială a acestora și a microorganismelor din asociație.

Pentru determinarea sensibilității mediului au fost efectuate experimente în serie cu șase tulpini de

Tabelul 1

Timpul indicării enterobacteriilor în funcție de concentrația lor inițială

Concentrația microorganismelor (UFC/ml)	Timpul indicării, ore									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++
10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++
10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++
10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
10 <sup>7</sup>	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++
10 <sup>8</sup>	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
10 <sup>9</sup>	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
>2 mld.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Notă: „++” – reacție pozitivă pronunțată; „+” – reacție pozitivă; „-” – reacție negativă.

referință în două concentrații, de 10<sup>4</sup> și 10<sup>5</sup> UFC/ml. În paralel s-a efectuat cultivarea bacteriilor pe mediile agar-sânge și Endo (tabelul 3).

Experimental s-a stabilit că mediul propus este mult mai sensibil comparativ cu mediile agar-sânge și agar-peptonat și permite determinarea enterobacteriilor timp de 6 ore. Compoziția și raportul optim ale ingredientelor creează un mediu în formă de micro-peliculă fixată la fundul unui flacon ce servește ca vas pentru păstrarea mediului și, totodată, pentru efectu-

area testării. Termenul de păstrare a mediului este de doi ani (termen de observare).

În contextul celor relatate trebuie făcute un șir de precizări. Așadar, controlul „purității microbiologice” efectuat în sprijinul producției farmaceutice și biofarmaceutice se încadrează în trei categorii principale: indicare (calitativă), enumerare (cantitativă) și caracterizare/identificare. Metodele microbiologice tradiționale sunt enumerate în compendii și discutate prin utilizarea tehnicilor convenționale bazate pe creștere

Tabelul 2

Selectivitatea mediului de cultură

Specia microbiană	Numărul de experimente	Indicarea, ore			P	
		6	9	24	6,9	9,24
<i>E. coli</i> (10 <sup>2</sup> ) <i>S. aureus</i> (10 <sup>6</sup> )	30	0	90,3±2,1	100±0,0	-	<0,05
<i>E. coli</i> (10 <sup>2</sup> ) <i>P. aeruginosa</i> (10 <sup>6</sup> )	30	0	96,6±2,0	96,6±2,0	-	<0,05
<i>P. vulgaris</i> (10 <sup>2</sup> ) <i>S. epidermidis</i> (10 <sup>6</sup> )	30	0	90,3±1,7	100±0,0	-	<0,05
<i>K. pneumoniae</i> (10 <sup>2</sup> ) <i>S. epidermidis</i> (10 <sup>6</sup> )	30	0	93,3±2,1	100±0,0	-	<0,05
<i>E. coli</i> (10 <sup>3</sup> ) <i>S. aureus</i> (10 <sup>6</sup> )	30	0	96,6±2,0	96,6±2,0	-	<0,05
<i>E. coli</i> (10 <sup>3</sup> ) <i>P. aeruginosa</i> (10 <sup>6</sup> )	30	0	93,3±2,1	100±0,0	-	<0,05
<i>P. vulgaris</i> (10 <sup>3</sup> ) <i>S. epidermidis</i> (10 <sup>6</sup> )	30	0	100±0,0	100±0,0	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (10 <sup>3</sup> ) <i>S. epidermidis</i> (10 <sup>6</sup> )	30	0	96,6±2,0	100±0,0	-	<0,05
<i>E. coli</i> (10 <sup>4</sup> ) <i>S. aureus</i> (10 <sup>6</sup> )	30	6,7±0,1	93,3±2,1	100±0,0	<0,001	<0,05

<i>E. coli</i> (10 <sup>4</sup> ) <i>P. aeruginosa</i> (10 <sup>6</sup> )	30	10,0±0,7	100±0,0	100±0,0	<0,001	-
<i>P. vulgaris</i> (10 <sup>4</sup> ) <i>S. epidermidis</i> (10 <sup>6</sup> )	30	13,3±0,8	100±0,0	100±0,0	<0,001	-
<i>K. pneumoniae</i> (10 <sup>4</sup> ) <i>S. epidermidis</i> (10 <sup>6</sup> )	30	3,3±1,1	96,6±2,0	96,6±2,0	<0,001	<0,05
<i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> ) <i>S. aureus</i> (10 <sup>6</sup> )	30	23,3±0,9	100±0,0	100±0,0	<0,001	-
<i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> ) <i>P. aeruginosa</i> (10 <sup>6</sup> )	30	20,0±0,8	93,3±2,1	100±0,0	<0,001	<0,05
<i>P. vulgaris</i> (10 <sup>5</sup> ) <i>S. epidermidis</i> (10 <sup>6</sup> )	30	26,6±1,0	100±0,0		<0,001	-
<i>K. pneumoniae</i> (10 <sup>5</sup> ) <i>S. epidermidis</i> (10 <sup>6</sup> )	30	23,3±0,9	96,6±2,0		<0,001	<0,05

și multiplicare, care sunt voluminoase și reclamă timp îndelungat. În general, astfel de teste necesită câteva zile de incubare pentru a determina contaminarea microbiană și, prin urmare, gestionarea lor poate să ducă la măsuri corective proactive. În plus, creșterea microbiană este limitată de mediul de cultură utilizat și de condițiile de incubare, ceea ce influențează sensibilitatea, specificitatea și reproductibilitatea testării [1].

Cele mai discutate subiecte se referă la dezvoltarea diferitor platforme tehnologice pentru metode rapide microbiologice, multe fiind ușor adoptate de laboratoarele de microbiologie și industria farmaceutică. Utilizarea lor ar oferi companiilor de medicamente posibilitatea de a se adapta la termene limită pentru procesele de fabricație și eliberare a produselor. Unele metode rapide oferă, de asemenea, posibilitatea controlului microbiologic în timp real, permițând managementului să răspundă evenimentelor de

contaminare microbiană într-un timp mai îndelungat și generând economii de costuri și eficiență sporită în laboratoarele de testare a controlului calității. În ciuda numeroaselor avantaje dovedite de managementul calității și a inițiativelor asociațiilor internaționale de a promova utilizarea tehnologiei analitice de proces ce include metode microbiologice rapide, industria farmaceutică și biofarmaceutică a tergiversat îmbrățișarea metodologiei alternative de control microbiologic ca urmare a rezultatelor divergente raportate [1; 6; 7].

Utilizarea metodelor rapide este un domeniu dinamic al microbiologiei aplicate, care și-a câștigat în timp o atenție sporită la nivel național și internațional. Acest subiect a fost dezbătut pe scară largă la conferințe și în documentele publicate în întreaga lume. Recent, utilizarea de metode alternative pentru controlul calității microbiologice a produselor farmaceutice și a

Tabelul 3  
Sensibilitatea indicării bacteriilor *P. aeruginosa*

Specia microbiană	Numărul de experimente	Concentrația microorganismelor UFC/ml și indicarea lor peste 6 ore de incubare la 37 °C					
		MSD-Ent		Endo		Agar-sânge	
		10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	16	81,2±1,8	100±0,0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 35218	12	83,3±1,4	100±0,0	0	0	0	0
<i>P. vulgaris</i> ATCC 25933	12	75,0±1,4	100±0,0	0	0	0	0
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	14	78,6±1,6	100±0,0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	12	83,3±1,2	100±0,0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	12	75,0±1,4	100±0,0	0	0	0	0

materialelor utilizate în producția farmaceutică a fost abordată în diverse ghiduri și compendii, în încercarea de a facilita implementarea tehnologiilor respective de către companiile farmaceutice [1; 8].

Pornind de la cele expuse, putem afirma că problema elaborării procedeelelor și mijloacelor pentru indicarea și identificarea rapidă a bacteriilor grupului *Enterobacteriaceae*, ca microorganisme inadmisibile în medicamente, este actuală și corespunde scopului studiului propus. Procedeele se referă la mediile de cultură pentru indicarea *Enterobacteriaceae spp.* în diverse prelevate, obiecte de mediu, inclusiv în medicamente de uz uman. După esența tehnică, mai potrivit este reagentul pentru indicarea bacteriilor *E. coli* care conține toate ingredientele optime, și anume substratul specific de citrat de sodiu utilizat pentru indicarea rapidă timp de 9 ore de incubare la temperatura de 37 °C. Dezavantajul reagentului cunoscut constă în specificitatea sa mai redusă, deoarece permite indicarea și altor specii de microorganisme citratate pozitive.

Problema pe care o rezolvă procedeul propus rezidă în elaborarea unui mediu de cultură ce permite ridicarea esențială a specificității de indicare a bacteriilor *E. coli*. Astfel, se propune un nou mediu de cultură care include toate ingredientele optime pentru indicarea bacteriilor *E. coli*, în calitate de substrat specific fiind folosit malonatul de sodiu, ca indicator – albastru de bromtimol hidrosolubil, hidrogenofosfat de sodiu, dihidrogenofosfat de potasiu. Rezultatele studiilor efectuate au arătat majorarea specificității mediului prin includerea malonatului de sodiu în calitate de substrat specific, care este utilizat de *E. coli* drept unica sursă de carbon pentru multiplicare. Celelalte ingrediente sunt incluse cu scopul favorizării și multiplicării *E. coli*. Indicarea are loc în condițiile pH-ului format de hidrogenofosfatul de sodiu, dehidrogenofosfatul de potasiu și substanțele scindării malonatului de sodiu și se realizează cu ajutorul albastrului de bromtimol.

## CONCLUZII

Prezența bacteriilor gram-negative tolerante la bilă în preparatele medicamentoase nesterile au potențialul de a reduce sau inactiva acțiunea terapeutică a produsului afectând în consecință sănătatea pacientului.

Utilizarea procedeei elaborate permite izolarea rapidă a grupului de bacterii gram-negative și ajută la

monitorizarea în timp util a preparatelor medicamentoase pentru a limita contaminarea pe tot parcursul tehnologic al medicamentului.

Studiile efectuate arată o creștere evidentă a sensibilității și vitezei de indicare a enterobacteriilor în cultura pură, mixtă sau în alt material de cercetare.

Procedeul descris este simplu în aplicare, rentabil și poate fi utilizat în laboratoarele microbiologice de diferite niveluri ca metodă alternativă de determinare a grupului de bacterii gram-negative.

## BIBLIOGRAFIE

1. European Pharmacopoeia (11<sup>th</sup> Edn.), Microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration tests and Examination of non-sterile products: test for specified microorganisms, [online] <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia> (consultat: 06.09.2023).
2. Salem, N., Elbarrawy, M., Azzam, N. Microbiological quality of non-sterile pharmaceuticals in Egypt. In: Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci., 2021, 10:38, doi: 10.1186/s43088-021-00127-6
3. Kumari, B., Kumar, S., Thota, P., Pandey, M.K., Raghuvanshi, R.S., Teotia, A.K. Prevalence of Microbial Contaminants in Non-sterile Pharmaceutical Antacids. In: Biomed J Sci & Tech Res., 2023, 50(3) 41696-41700, doi: 10.26717/BJSTR.2023.50.007959
4. Rauf, A., Erum, A., Noreen, S., Shujaat J., Ashraf, M.U., Afreen, S. Microbiological quality control of some non-sterile preparations commonly used in Pakistan. In: Pak J Pharm Sci., 2018, 31:1237-1242, [online] <https://www.researchgate.net/profile/Alia-Erum/publication/326413775> (consultat: 23.12.2023).
5. Miller, M.J. Rapid Microbiological Methods. In: Pharmaceutical Microbiological Quality Assurance and Control, 2019, 429-458, doi: 10.1002/9781119356196.ch13
6. Nemati, M., Hamidi, A., Maleki Dizaj, S., Javaherzadeh, V., Lotfipour, F. An Overview on Novel Microbial Determination Methods in Pharmaceutical and Food Quality Control. In: Adv Pharm Bull., 2016, 6(3):301-308, doi: 10.15171/apb.2016.042
7. Moldenhauer, J. Overview of Rapid Microbiological Methods. In: Zourob, M., Elwary, S., Turner, A. (eds) Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer, 2008, New York, NY, doi: 10.1007/978-0-387-75113-9\_4
8. Pușcaș, N., Balan, G., Burduniuc, O. Micro-test system for rapid isolation and identification of *Candida* species in urinary tract infections. In: Anthropological Researches And Studies, 2017, 7:64-70, doi: 10.26758/7.1.7