

Министерство здравоохранения Российской Федерации

"СОГЛАСОВАНО"

Начальник Управления
Государственного конт-
роля лекарственных
средств и медицинской
техники Минздрава
России


Р. У. Хабриев

"21" января 1997г.

"СОГЛАСОВАНО"

Начальник Управления
научных и образователь-
ных медицинских учреж-
дений Минздрава России


В. И. Сергиенко

"1" января 1997г.

"УТВЕРЖДАЮ"

Зам.министра здра-
воохранения Российс-
кой Федерации


А. Е. Вилькен

"17" января 1997г.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ В ИНЪЕКЦИОННЫХ
РАСТВОРАХ ДО СТЕРИЛИЗАЦИИ

Москва 1997

Министерство здравоохранения Российской Федерации

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ В ИНЪЕКЦИОННЫХ
РАСТВОРАХ ДО СТЕРИЛИЗАЦИИ

(Методические указания)

№ 97/120

ВВЕДЕНИЕ. Причиной пирогенности дистиллированной воды, предназначенной для изготовления инъекционных растворов, а также самих инъекционных растворов является контаминация их микроорганизмами и продуктами распада. Стерилизация освобождает растворы от наличия жизнеспособных микроорганизмов, но в растворах остаются мертвые клетки и продукты их распада, обладающие пирогенными свойствами. Попадая с различными лекарственными веществами, вводимыми в организм больного человека, пирогены могут вызывать осложнения в виде пирогенных реакций.

У человека различают три степени пирогенной реакции: легкую, среднюю и тяжелую, каждая из которых характеризуется определенными симптомами. Тяжелой степени пирогенной реакции соответствует сильный озноб, рвота, одышка, температура при этом достигает 40°C . Симптомы реакции носят затяжной характер и прекращаются лишь через сутки. Возможен летальный исход после введения пирогенных лекарственных средств, вызвавших тяжелую реакцию у больных.

При внутривенном введении бактериальные пирогены обладают значительно большей активностью, чем при подкожном или внутримышечном введении. В связи с этим особенно опасны инфузионные растворы, загрязненные бактериальными пирогенами, так как они вводятся больному человеку внутривенно в больших объемах.

В нашей стране подавляющее большинство (в настоящее время около 96% от общего количества) инфузионных растворов изготавливается в аптеках лечебно-профилактических учреждений. Испытание на пирогенность, предусмотренное ГФ-ХІ, эти растворы не проходят. Поэтому в методические указания в первую очередь вводится методика обнаружения и нормы содержания пирогенообразующих микроорганизмов до стерилизации для инфузионных растворов аптечного изготовления.

ОПИСАНИЕ МЕТОДА:

ФОРМУЛА МЕТОДА. Впервые предлагается проводить оценку пирогенности ряда растворов для инъекций и дистиллированной воды, предназначенной для их изготовления, по количеству присутствующих в них до стерилизации живых грамотрицательных (пирогенообразующих) микроорганизмов. Идентификацию пирогенообразующих микроорганизмов проводят по реакции образования геля при их взаимодействии с 3% раствором гидроксида калия.

МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕТОДА. Испытание лекарственных препаратов на наличие в них микроорганизмов проводят в асептических условиях согласно требованиям ГФ-ХІ. Отбор проб исследуемых растворов для испытаний, применяемая питательная среда для выращивания микроорганизмов, условия инкубирования посевов (температура и сроки выдерживания в термостате) также соответствуют требованиям ГФ-ХІ.

Методика обнаружения и нормы содержания общего количества и пирогенообразующих микроорганизмов вводится на растворы для инъекций аптечного изготовления, на которые имеется нормативно-техническая документация в виде методических указаний.

ОПИСАНИЕ МЕТОДА. Бактериологический контроль лекарственных растворов для инъекций (выборочно) и дистиллированной воды, используемой для их изготовления, проводят не реже двух раз в квартал.

Отбор и приготовление проб. От каждой серии исследуемого раствора отбирают среднюю пробу не менее 50 мл, состоящую из равных разовых проб, взятых минимум из 10 разных флаконов.

Методика обнаружения пирогенообразующих микроорганизмов в растворах для инъекций и дистиллированной воде, предназначенной для их изготовления

1 мл исследуемого образца, взятого перед стерилизацией, засевают по 0,5 мл на поверхность двух чашек Петри с питательной средой № I (ГФ XI) и термостатируют в течение 5 суток при температуре 30–35°C. На предметное стекло пипеткой наносят капли 3% раствора гидроксида калия, одна капля служит контролем, а в другие петлей вносят каждый вид выросших колоний микроорганизмов и тщательно перемешивают. Если в течение 60 секунд происходит образование желеобразной массы, суспензия тянется за петлей, образуя нити, то исследуемый раствор содержит пирогенообразующие микроорганизмы. Если образования геля не происходит, раствор остается гомогенным, то в исследуемом растворе отсутствуют пирогенообразующие микроорганизмы.

Разъяснение к методике.

Пирогенную реакцию в подавляющем большинстве случаев вызывают грамотрицательные микроорганизмы, в составе клеточной оболочке которых имеются липополисахариды. Грамположительные микроорганизмы, как правило, не вызывают пирогенную реакцию — их пирогенная активность в 10000 – 100000 раз слабее, чем у грамотрицательных микроорганизмов.

При установлении нормативов предельного содержания микроорганизмов в дистиллированной воде, предназначенной для изготовления инъекционных растворов и растворах для инъекций до стерилизации, была учтена избирательная идентификация пирогенообразующих микроорганизмов.

Нормативы предельно допустимого содержания
непатогенных микроорганизмов в дистиллиро-
ванной воде и растворах для инъекций

№/пп!	Наименование	Предельно допустимое содержание микроорга- низмов в I мл
1.	Дистиллированная вода, используе- мая для изготовления инъекционных общее количество 10-15 растворов	пирогенобразующих-5
2.	Растворы для инъекций до стерили- зации не позднее 3 часов после из- готовления:	
2.1.	глюкозы 5%, 10%, 25% и 40%	пирогенобразующих-10
2.2.	натрия хлорида 0,9%	общее количество-50
2.3.	натрия гидрокарбоната 4%	
2.4.	солевой раствор с глюкозой состава: калия хлорида 2,0 кальция хлорида 0,4 глюкозы 100,0 воды для инъекций до 1 л	
2.5.	Рингера	
2.6.	Рингера-Локка	
2.7.	Квартасоль	
2.8.	Новокаина 0,25%, 0,5%, 1% и 2%	пирогенобразующих 30-40 общее количество - 100

Примечание: при внутривенном введении взрослым раствором
глюкозы, 0,9% раствора натрия хлорида, 4% раствора натрия гид-
рокарбоната, солевого раствора с глюкозой, растворов Рингера,
Рингера-Локка и Квартасоль в объеме не превышающем 100 мл до-
пустимым является содержание не более 30-40 пирогенобразующих
микроорганизмов в I мл, общее количество не должно превышать
100 в I мл.

При разработке методики оценки пирогенности растворов по количеству присутствующих в них живых грамотрицательных микроорганизмов до стерилизации учитывались следующие факторы:

1. Ряд лекарственных препаратов влияет на пирогенную активность микроорганизмов. Одни лекарственные вещества способны активизировать действие бактериальных пирогенов, другие, наоборот, значительно ослабляют, поэтому в каждом конкретном случае проводились исследования по изучению пирогенности исследуемых растворов, содержащих грамотрицательные микроорганизмы.

2. Кроме живых микроорганизмов, пирогенную реакцию вызывают мертвые микроорганизмы и продукты их распада, содержащие термостабильный липополисахарид. В виду чего изучалось влияние выживаемости микроорганизмов и возможного накопления липополисахаридов на пирогенность исследуемых растворов.

3. Способность пирогенов утрачивать активность при хранении зависит от среды, в которой они присутствуют, поэтому важное значение имеет изучение изменения пирогенности исследуемых растворов, содержащих мертвые микроорганизмы.

4. При установлении предельно допустимого количества пирогенообразующих микроорганизмов в инфузионных растворах до стерилизации учитывалось, что официальное биологическое испытание на кроликах не гарантирует надежность результатов при контроле на пирогенность инфузионных растворов. Это связано с тем, что положение о том, что при испытании на пирогенность доза препарата на 1 кг массы кролика должна составлять $1/10 - 1/20$ максимальной, применяемой в клинике, не соблюдается. Доза препарата при испытании его на пирогенность на кроликах, считая на 1 кг массы животного, может быть меньше суточной дозы для человека не более чем в 10-20 раз. На практике для инфузионных растворов, которые

обычно вводятся людям в больших количествах, дозы для кролика и человека различаются в 200 - 300 раз. При таких больших различиях между дозами для кролика и человека проведение испытания на пирогенность с использованием указанных доз представляется в значительной степени лишены смысла. Вышеуказанное было учтено при установлении предельно допустимого содержания пирогенообразующих микроорганизмов в инъекционных растворах до стерилизации. При сравнении предлагаемой методики с результатами биологического испытания на кроликах необходимо иметь в виду, что при наличии в указанных объектах до стерилизации живых пирогенообразующих микроорганизмов в количестве до 50 в 1 мл пирогенная реакция не наблюдается. При содержании 50 - 100 микроорганизмов в 1 мл пирогенная реакция у кроликов наблюдается не всегда, однако это содержание уже опасно. При наличии пирогенообразующих микроорганизмов более 100 в 1 мл наблюдается выраженная пирогенная реакция.

Пирогены теряют активность при хранении, поэтому при сравнении двух методов желательно проводить анализ с интервалом 2 - 3 дня.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА. На протяжении многих лет растворы для инъекций аптечного изготовления не испытываются на пирогенность из-за недоступности для контрольно-аналитических лабораторий дорогостоящего официального биологического испытания на кроликах. Предлагаемая методика проста в исполнении, доступна, применение ее на практике позволит значительно повысить качество инъекционных растворов изготавливаемых в аптеках.

Директор НИИФ
доктор фармац. наук, профессор

Л. В. Мошкова
Л. В. Мошкова

Зав. лабораторией биологических и физико-химических методов контроля качества лекарственных средств, доктор фармац. наук

Н. Н. Дементьева
Н. Н. Дементьева

Ст. научн. сотр.

Л. Е. Шедрина

Л. Е. Шедрина