УТВЕРЖДАЮ
Зам. начальника Главного
технического управления
Минздрава СССР

О.Б. Архангельский
1.03.91.

М Е Т О Д И К А
КОНТРОЛЯ ТОКСИЧНОСТИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ ОДНОКРАТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, СТЕРИЛИЗОВАННЫХ РАДИАЦИОННЫМ ИЛИ ГАЗОВЫМ МЕТОДОМ.

(Взамен "Методики контроля токсичности медицинских изделий, стерилизованных радиационным или газовым методом, утвержденной заместителем начальника ГТУ Минздрава СССР О.Б. Архангельским 21.06.90г., методика адаптирована и предназначена для контроля медицинских изделий БДЗМИ)

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1. Настоящая методика распространяется на изделия медицинского назначения, к которым предъявляются требования по токсичности (устройства для переливания и взятия крови ПК 11, ПК 23, ВК 10, шприцы инъекционные, катетеры детские пупочные и желудочные, катетеры внутривенные нерентгеноконтрастные, эндобронхотрахеальные, рентгеноконтрастные спинальные, рентгеноконтрастные висцеральные, рентгеноконтрастные церебральные, диализаторы "искусственной почки" ДИП-02, магистрали кровопроводящие входные МК-03, выходные МК-04).

1.2. При проведении контроля партией считают количество изделий, определенное НТД на конкретное изделие.

1.3. Периодичность контроля.

1.3.1. В течение первого года выпуска изделий испытаниям подвергается каждая партия готовых изделий.

1.3.2. По истечении первого года выпуска, при отсутствии случаев выбраковки конкретного изделия по токсичности в течение года, испытания по этому изделию проводятся 1 раз в квартал.

gost.e-ecolog.ru

1.3.3. В случае выявления токсичности образцов серийной продукции проводятся испытания трех партий подряд, далее - согласно п. 1.3.2.

1.4. Этапы испытаний и их последовательность. 1.4.1. Приготовление вытяжек.

1.4.2. Санитарно-химические испытания:

1) определение остаточных количеств глицерина (для диализаторов ДИП-02, стерилизованных радиационным или газовым методом);

2) определение остаточных количеств окиси этилена (для диализаторов ДИП-02 и шприцев инъекционных, стерилизованных газовым методом).

1.4.3. Гемолитический тест (для изделий, контактирующих с кровью).

1.4.4. Токсикологические испытания с использованием тест-объекта.

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВЫТЯЖЕК

2.1. Общие положения.

2.1.1. Все работы по приготовлению вытяжек и растворов выполняются с соблюдением требований асептики.

2.1.2. Для проведения контроля токсичности отбираются образцы из разных мест партии в количестве, достаточном для проведения испытаний.

2.1.3. Модельной средой для получения вытяжек и контрольным раствором является дистиллированная вода.

2.1.4. После окончания экстрагирования вытяжки охлаждаются до комнатной температуры и сливаются в стеклянную емкость с притертой пробкой.

2.1.5. Полученные вытяжки должны быть испытаны в течение 24 часов. Неиспользованная часть вытяжки хранится в холодильнике при температуре (4±1)°С до проведения оценки результатов испытаний. При необходимости повторных испытаний используют эти же вытяжки. Контрольные растворы хранятся в тех же условиях.

2.2. Устройства для переливания и взятия крови ПК 11, ПК 23, ВК 10.

2.2.1. Для проведения испытаний необходимо 3 устройства для переливания крови и 15 устройств для взятия крови от партии.

2.2.2. Для получения вытяжки устройства полностью заполняют дистиллированной водой, закрывают плотно колпачками и помещают в термостат на 24 часа при температуре (40±2)° С.

2.2.3. Полученные вытяжки из отобранных изделий одного вида сливают в одну емкость.

2.3. Шприцы инъекционные.

2.3.1. Для проведения испытаний необходимо такое количество шприцев от партии, чтобы суммарная вытяжка из них составляла не менее 100 мл.

2.3.2. Для получения вытяжек шприцы заполняют дистиллированной водой, закрывают колпачками и помещают в термостат на 24 часа при температуре (40±2)° С.

2.3.3. Полученные из отобранных шприцев вытяжки сливают в одну емкость.

2.4. Катетеры детские пупочные и желудочные, катетеры внутривенные нерентгеноконтрастные, эндобронхотрахеальные, рентгеноконтрастные спинальные, рентгеноконтрастные висцеральные, рентгеноконтрастные церебральные.

2.4.1. Для проведения испытаний необходимо такое количество катетеров от партии, чтобы их суммарная поверхность (наружная и внутренняя) была не менее 100 $см^2$.

2.4.2. Для получения вытяжки необходимо отобранные катетеры разрезать на две половины вдоль длины, поместить в сосуд с притертой пробкой, залить дистиллированной водой в соотношении 1 $см^2$ поверхности образца на 1 $см^3$ дистиллированной воды. Затем сосуд закрывают пробкой и помещают в термостат на 24 часа при температуре (40±2)° С.

2.5. Магистрали "искуственной почки" кровопроводящие входные МК-03 и выходные МК-04.

2.5.1. Испытаниям подвергаются три магистрали одного типа

от партии, последовательно соединенные между собой.

2.5.2. Приготовлению вытяжки должна предшествовать промывка магистралей тремя литрами дистиллированной воды со скоростью (200±20) мл/мин в режиме слива.

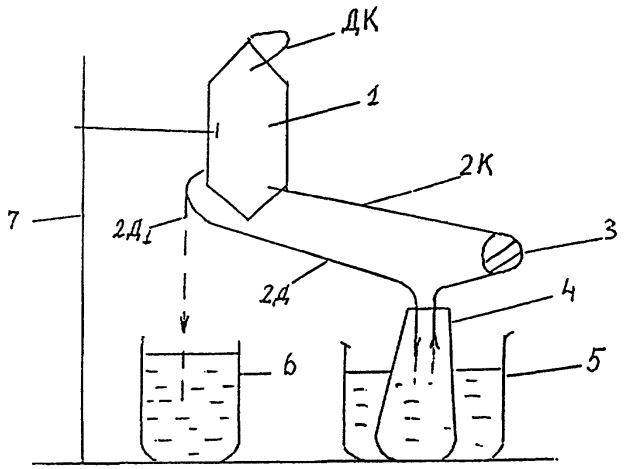
2.5.3. Для получения вытяжки свободные концы магистралей помещают в резервуар с тремя литрами дистиллированной воды, которая с помощью насоса в режиме рециркуляции перемещается через магистрали со скоростью (200±20) мл/мин. Продолжительность экстракции 3 часа при комнатной температуре.

2.5.4. Для испытаний отбирают 1 литр вытяжки.

2.6. Диализаторы "искуственной почки" ДИП-02.

2.6.1. Для проведения испытаний отбирают два диализатора от партии.

2.6.2. Для получения вытяжек из диализаторов, необходимо собрать установку, изображенную на рисунке.



ДК, 2К, 2Д - соединительные силиконовые трубки;
1 -диализатор; 3 - роликовый насос; 4 - колба;
5 - емкость для термостатирования; 6 - емкость для слива; 7 - держатель.

Диализатор 1 закрепляют в вертикальном положении в держателе 7. Верхние отверстия полостей крови и диализатора соединяют между собой трубкой ДК. Конец трубки 2К от нижней полости крови через роликовый насос 3 опускают в колбу 4 с двумя литрами дистиллированной воды. Конец трубки 2Д от нижней полости диализатора опускают в емкость для слива 6 (положение $2Д_1$). Включают роликовый насос 3 и сливают два литра воды в емкость для слива 6.

Затем нижний конец трубки 2Д подсоединяют к герметично закрытой колбе 4, в которую наливают 1 л дистиллированной воды, и помещают ее в емкость для термостатирования 5. В емкости 5 поддерживается температура (37±2) °С. Включают роликовый насос 3, и вода циркулирует через замкнутую систему со скоростью (200±20) мл/мин в течение 3-х часов. В конце рециркуляции система опустошается, и вытяжка сливается в колбу 4.

Примечание: Соединительные трубки должны быть возможно малой длины.

2.6.3. Вытяжку получают от каждого диализатора отдельно.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИЦЕРИНА

3.1. Содержание глицерина в вытяжке из диализаторов контролируется на рефрактометре типа ИРФ-22 по изменению показателя преломления.

Концентрация глицерина определяется по калибровочному графику, построенному на основе измерений показателя преломления растворов глицерина известной концентрации.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКИСИ ЭТИЛЕНА

4.1. Определение окиси этилена в вытяжке из диализаторов и шприцев проводится с помощью метода газовой хроматографии. 1-2 мкл вытяжки вводится в хроматограф с детектором пламенной ионизации. Каждая вытяжка анализируется не менее трех раз.

4.2. Условия проведения хроматографического анализа:

1) хроматографическая фаза - поропак Q(80-100);

2) размеры колонки: длина - 0,5-1,2 м, диаметр -2-3 мм;

3) температуры: колонки - (120±5)° С, инжекции - (160±5)° С, детектора - (180±10)° С;

4) расходы: воздуха - (300±10) мл/мин, водорода - (30±1) мл/мин, гелия - (30±1) мл/мин.

4.3. Обработка результатов.

Измерив линейкой высоты хроматографических пиков h_j^*, соответствующих окиси этилена, вычислить среднюю величину высоты $h_{ср}$ по формуле:

$$h_{ср} = \frac{\sum_{j=1}^{n} h_j}{n}$$

где : h_j - высота пика j пробы;

n - число проб;

Рассчитать приведенную высоту $\bar{H} = h_{ср} \cdot A \cdot R$,

где $h_{ср}$ - средняя высота;

A·R - индексы переключателя чувствительности записи хроматограммы.

Количество окиси этилена (М, мг), введенное в хроматограф с вытяжкой, определяют по калибровочному графику IqH = f(IqM).

Концентрацию окиси этилена в вытяжке ($C_{в}$, мг/л) определяют по формуле:

$$C_{в} = \frac{M}{V} \cdot 10^{6},$$

где: М - количество окиси этилена, найденное по калибровочному графику, мг;

V - объем вводимой в хроматограф пробы, мкл.

---

* При расхождении высоты хроматографических пиков окиси этилена более чем на 20% операцию по заколу проб в хроматограф повторяют.

5. ГЕМОЛИТИЧЕСКИЙ ТЕСТ

5.1. Принцип метода определения гемолитического действия вытяжки по 100% гемолизу.

5.2. Применяемое оборудование:

1) центрифуга типа ОПн;

2) термостат, обеспечивающий температуру (37+2)° С;

3) фотоэлектроколориметр типа ФЭК;

4) весы лабораторные с точностью взвешивания не менее 0,01г;

5) химическое оборудование из стекла по ГОСТ 1770-74 или ГОСТ 23932-90.

5.3. Приготовление 10% взвеси эритроцитов.

Для приготовления взвеси эритроцитов может быть использована эритроцитарная масса или цитратная кровь, заготовленная на 3,9% растворе цитрата натрия в соотношении 1:9. Срок хранения цитратной крови (эритроцитарной массы) 72 ч при температуре (4+1)° С. Кровь (эритроцитарную массу) 5 мл центрифугировать 10 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость отделить. К осадку добавить 8 мл стерильного 0,9% раствора хлористого натрия. Содержимое взболтать и центрифугировать 10 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость отделить.

Эта операция (отмывания клеток) повторяется два раза. После отмывания надосадочная жидкость должна быть прозрачной, бесцветной и не иметь следов гемолиза. Если надосадочная жидкость не отвечает указанным требованиям, эритроциты не могут быть использованы для приготовления взвеси эритроцитов.

Для получения 10% взвеси эритроцитов 1 мл осадка клеток смешивают с 9 мл 0,9% раствора хлористого натрия. Полученную взвесь эритроцитов можно хранить не более 24 часов в холодильнике при температуре (4+1)° С.

5.4. Приготовление проб: контрольной и со 100% гемолизом.

5.4.1. Контрольная проба: 0,5 мл 10% взвеси эритроцитов и 5 мл 0,9% раствора хлористого натрия.

5.4.2. Проба со 100% гемолизом: 0,5 мл 10% взвеси эритроцитов и 5 мл дистиллированной воды. Происходит полное разрушение

5.5. Ход определения.

До определения гемолитического действия к вытяжке (приготовленной на дистиллированной воде) необходимо добавить хлористый натрий из расчета 9 мг на 1 мл вытяжки для превращения дистиллированной воды в изотонический раствор для крови.

В три пробирки разлить по 0,5 мл 10% взвеси эритроцитов К 0,5 мл 10% взвеси эритроцитов в каждую пробирку добавить по 5 мл вытяжки, в которую предварительно добавлен хлористый натрий до 0,9 % раствора. Смесь поставить в термостат на 1 час при температуре (37±1) °С, затем центрифугировать в течение 20 мин при 2000 об/мин.

Все манипуляции по отношению к контрольной пробе и пробе со 100% гемолизом проводятся параллельно с испытуемыми пробами, как описано выше. Надосадочную жидкость отделить для проведения измерения оптической плотности.

5.6. Оптические измерения.

Испытуемую, контрольную пробы и пробу со 100% гемолизом измеряют на фотоэлектроколориметре (ФЭК-60, КФК) при длине волны 540 нм против "холостой" пробы (вода). Толщина кюветы 1 см. Результаты регистрируются по оптической плотности.

5.7. Расчет процента гемолиза проводится по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{E_{оп} - E_к}{E_{100}} \cdot 100$$

где: $E_{оп}$ - оптическая плотность испытуемой пробы;
$E_к$ - оптическая плотность контрольной пробы;
E_{100} - оптическая плотность воды со взвесью эритроцитов 100% гемолиз.

Например; $E_{оп}$ =0,015
$E_к$ =0,01
E_{100}=1,0

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{0,015 - 0,01}{1,0} \cdot 100 = 0,5$$

Примечания:

1. Если оптическая плотность контрольной пробы (10% взвесь эритроцитов с 0,9% раствором хлористого натрия) составляет 0,03 и более, результаты всего опыта недостоверны и не учитываются.

2. Оптическая плотность раствора со 100% гемолизом должна быть не менее 0,8 и не более 1. В случае отклонения от указанных пределов опыт следует повторить с вновь приготовленной эритроцитарной взвесью.

3. Если шкала фотоэлектроколориметра от 0 до 1,0, а оптическая плотность более 1, то необходимо раствор развести в 2 раза, затем определить оптическую плотность и увеличить ее в два раза.

4. При проведении научных исследований для обеспечения статистической достоверности результатов необходимо опыты ставить не менее, чем на 5 образцах крови.

6. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНОГО ТЕСТ-ОБЪЕКТА

6.1. Тест-объект. В качестве тест-объекта используется замороженная в парах жидкого азота гранулированная сперма быка. Замороженную сперму быка получают на станциях искусственного осеменения. В токсикологической лаборатории хранят сперму неограниченно долго в сосудах Дьюара, заполненных жидким азотом. В сосуд Дьюара жидкий азот доливают каждые 3-4 дня.

6.2. Принцип метода. Принцип метода основан на анализе зависимости показателя подвижности суспензии сперматозоидов от времени: $m=f(t)$. Показатель подвижности определен, как:

$$m = d \cdot C_n \cdot \bar{V}$$

где: d - постоянный коэффициент;

C_n - концентрация подвижных клеток;

$\bar{V}$ - средний модуль скорости клеток.

Оценка показателя подвижности осуществляется путем подсчета числа флуктуации интенсивности рассеянного излучения, вызванных прохождением клеток через оптический зонд.

6.3. Оборудование:

1) прибор для определения индекса токсичности;

2) комплект полистироловых кювет;

3) химическое оборудование из стекла (из расчета на проведение одного эксперимента):

- пробирки химические объемом 3-5 мл для оттаивания замороженной спермы -10 шт.;

- пробирки с притертыми пробками объемом 3-5 мл для рабочих растворов - 10 шт.;

- покровные стекла одинаковой толщины для накрывания кювет - 10 шт.;

- пипетки объемом 1 мл - 3 шт.;

- мерные колбы с притертыми пробками объемом 100 мл для приготовления изотонических растворов - 2 шт.;

- глазные пипетки для заполнения кювет рабочими растворами -2 шт.

4) весы аналитические;

5) пинцет анатомический;

6) сосуд Дьюара вместимостью 26,5 л (марка СДП-25)-2 шт.

7) микрокалькулятор типа МК-52, персональный компьютер типа IBM PC XT.

6.4. Температурный режим эксперимента. Все растворы в течение эксперимента должны быть постоянно нагреты до температуры $(40\pm3)^{\circ}$ С. Температура поддерживается автоматическим устройством для термостатирования.

6.5. Приготовление опытного и контрольного растворов. Для определения индекса токсичности опытных растворов необходимо сравнить их с контрольной средой. В качестве контрольного раствора выбрана глюкозо цитратная среда (состав среды: глюкоза -4,0 г, цитрат натрия -1,0 г, вода дистиллированная - до 100 мл). Контрольная среда одновременно является разбавителем для оттаивания замороженной спермы. Опытным раствором является водная вытяжка из полимерного материала. Изотонию вытяжки достигают путем до-

бавления сухих реактивов глюкозы и цитрата натрия. На 100 мл вытяжки добавляют 4 г глюкозы и 1 г цитрата натрия. Затем дозируют по 1 мл контрольного и испытуемого раствора в пробирки и ставят их в водяную баню при температуре (40±3)° С. Контрольный и испытуемый растворы приготавливаются заранее за час до начала эксперимента.

6.6. Оттаивание замороженной спермы. Отмеряют пипеткой в пробирки по 0,25 или 0,5 мл разбавителя и ставят их в водяную баню при температуре (40±3)° С. Охлажденным до температуры жидкого азота длинным анатомическим пинцетом извлекают из сосуда Дьюара гранулу спермы и быстро опускают в нагретый раствор. Каждую гранулу размораживают в отдельной пробирке. Нельзя оттаивать несколько гранул в одной пробирке. Сразу после размораживания содержимое пробирок с целью приготовления маточного раствора спермы сливают в пробирку и тщательно перемешивают.

6.7. Приготовление рабочих образцов. Общий объем рабочего образца выбран равным 1,2 мл. В каждую пробирку контрольной и опытной серий помещают по 0,2 мл суспензии сперматозоидов.

6.8. Подготовка проб к исследованию на приборе. Каждый рабочий образец переносится в кювету, которая накрывается покровным стеклом. Излишки рабочего раствора снимаются с кюветы фильтровальной бумагой. Затем кювета устанавливается в кюветодержатель прибора.

6.9. Накопление экспериментальных данных. Нажатием кнопки "Пуск" включается процесс накопления данных. Каждое оцененное значение показателя подвижности выдается на встроенный десятичный индикатор и печатающее устройство. При достижении нулевых значений показателя подвижности на всех десяти кюветах нажатием кнопки "Останов" производится остановка процесса накопления данных.

6.10. Обработка экспериментальных данных. Для каждого образца вычисляется среднее время подвижности $t_{ср}$:

$$t_{ср} = \frac{\Sigma(m_i \cdot i)}{\Sigma m_i},$$

где m_i - i-ое значение показателя подвижности;

i - текущий номер оценки показателя подвижности.

Для контрольной и опытной выборок образцов вычисляют среднее арифметическое значение и среднее квадратическое отклонение, по которым в свою очередь вычисляют для каждой выборки коэффициент вариации С, %:

$$C,\% = \frac{\sigma}{\bar{X}} \cdot 100 \quad ,$$

где σ - среднее квадратическое отклонение;
$\bar{X}$ - среднее арифметическое значение.

В случае получения значения коэффициента вариации больше 15% хотя бы для одной из выборок, эксперимент повторяют, начиная с п. 6.5. Если значения коэффициентов вариации для каждой из выборок меньше или равно 15%, то результаты считаются статистически значимыми.

Затем вычисляют величину индекса токсичности T_T, % :

$$T_T = \frac{t^{o}_{ср}}{t^{к}_{ср}} \cdot 100 \quad ,$$

где: $t^{o}_{ср}$ и $t^{к}_{ср}$ - средние арифметические значения среднего времени подвижности, соответственно, для опытной и контрольной выборок образцов.

Описанные выше вычисления рекомендуется выполнять с помощью программируемого калькулятора или персонального компьютера.

7. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЙ

7.1. По остаточному количеству глицерина.

Диализаторы подлежат дальнейшим токсикологическим испытаниям, если содержание остаточных количеств глицерина в каждой вытяжке не более 0,6 г/л.

При получении отрицательных результатов испытания следует повторить на удвоенном количестве изделий.

7.2. По остаточному количеству окиси этилена.

Изделия, стерилизуемые газовым методом, подлежат дальнейшим

токсикологическим испытаниям, если концентрация окиси этилена в вытяжках не будет превышать 0,5 мг/л - для диализаторов ДИП-02; 5,0 мг/л - для шприцев инъекционных.

При получении отрицательных результатов изделия необходимо дополнительно проветрить до получения указанных величин.

7.3. По гемолитическому тесту.

Испытуемые изделия свободны от гемолитически активных веществ, если % гемолиза всех проб равен или менее 2. При значении гемолиза двух из испытуемых проб более 2% вытяжка считается гемолитически активной и дальнейшие испытания прекращаются.

При значении гемолиза одной пробы более 2% опыт следует повторить. При получении такого же результата вытяжка считается гемолитически активной и дальнейшие испытания прекращаются.

7.4. По индексу токсичности.

Испытуемые изделия считаются нетоксичными, если индекс токсичности соответствует указанному в таблице:

Наименование изделия	Индекс токсичности, %
Устройства для переливания крови ПК 11, ПК 23	60-120
Устройства для взятия крови ВК 10	40-120
Шприцы инъекционные	60-120
Катетеры детские пупочные и желудочные, катетеры внутривенные нерентгеноконтрастные, эндобронхотрахеальные, рентгеноконтрастные спинальные, рентгеноконтрастные висцеральные, рентгеноконтрастные церебральные	60-120
Диализаторы ДИП-02	60-120
Магистрали кровопроводящие входные МК-03 или выходные МК-04	60-120

Если индекс токсичности изделий не соответствует указанному в таблице, следует провести испытания на удвоенном количестве образцов.

Зам. директора по научной работе ВНИИМТ — А. П. Шишов

Зав. отделом токсикологических исследований и испытаний полимерных, других материалов и изделий медицинского назначения — В. Г. Лаппо

Зав. лабораторией методов и средств медико-биологического экспресс-контроля — А. П. Еськов

gost.e-ecolog.ru