Министерство здравоохранения Российской Федерации

"СОГЛАСОВАНО"	"СОГЛАСОВАНО"	"УТВЕРЖДАЮ"
Начальник Управления Государственного контроля лекарственных средств и медицинской техники Минздрава России	Начальник Управления научных и образовательных медицинских учреждений Минздрава России	Зам.министра здравоохранения Российской Федерации
_____ Р.У.Хабриев	_____ В.И.Сергиенко	_____ А.Е.Вилькен
"21" января 1997г.	"21" января 1997г.	"17" января 1997г.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ В ИНЪЕКЦИОННЫХ РАСТВОРАХ ДО СТЕРИЛИЗАЦИИ

Москва 1997

gost.e-ecolog.ru

Министерство здравоохранения Российской Федерации

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ В ИНЪЕКЦИОННЫХ РАСТВОРАХ ДО СТЕРИЛИЗАЦИИ

(Методические указания) № 97/12 С

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°С. Симтомы 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 бóльшей 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 обьемах.

В нашей стране подавляющее большинство (в настоящее время около 96% от общего количества) инфузионных растворов изготовляется в аптеках лечебно-профилактических учреждений. Испытание на пирогенность, предусмотренное ГФ-XI, эти растворы не проходят. Поэтому в методические указания в первую очередь вводится методика обнаружения и нормы содержания пирогенобразующих 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 (пирогенобразующих) микроорганизмов. Идентификацию пирогенобразующих 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-XI. 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-XI.

Методика обнаружения и нормы содержания общего количества и пирогенобразующих 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 пирогенобразующих микроорганизмов в растворах для инъекций и дистиллированной воде, предназначенной для их изготовления

I 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°С. 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 пирогенобразующие микроорганизмы. Если образования геля не происходит, раствор остается гомогенным, то в исследуемом растворе отсутствуют пирогенобразующие 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 I0000 - I00000 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 пирогенобразующих микроорганизмов.

Нормативы предельно допустимого содержания непатогенных микроорганизмов в дистиллированной воде и растворах для инъекций

№/пп	Наименование	Предельно допустимое содержание микроорганизмов в I мл
I.	Дистиллированная вода, используемая для изготовления инъекционных растворов	пирогенобразующих-5 общее количество I0-I5
2.	Растворы для инъекций до стерилизации не позднее 3 часов после изготовления:	
2.I.	глюкозы 5%,I0%,25% и 40%	пирогенобразующих-I0
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 I00,0 воды для инъекций до I л	
2.5.	Рингера	
2.6.	Рингера-Локка	
2.7.	Квартасоль	
2.8.	Новокаина 0,25%,0,5%,I%и2%	пирогенобразующих 30-40 общее количество - I00

Примечание: при внутривенном введении взрослым растворов глюкозы, 0.9% раствора натрия хлорида, 4% раствора натрия гидрокарбоната, солевого раствора с глюкозой, растворов Рингера, Рингера-Локка и Квартасоль в обьеме не превышающем I00 мл допустимым является содержание не более 30-40 пирогенобразующих микроорганизмов в I мл, общее количество не должно превышать I00 в I мл.

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

I. Ряд лекарственных препаратов влияет на пирогенную активность микроорганизмов. Одни лекарственные вещества способны активизировать действие бактериальных пирогенов, другие, наоборот, значительно ослаблять, 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 пирогенобразующих микроорганизмов в инфузионных растворах до стерилизации учитывалось, что официнальное 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 I кг массы кролика должна составлять I/I0 - I/20 максимальной, применяемой в клинике, не соблюдается. Доза препарата при испытании его на пирогенность на кроликах, считая на I кг массы животного, может быть меньше суточной дозы для человека не более чем в I0-20 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 лишенным смысла. Вышеуказанное было учтено при установлении предельно допустимого содержания пирогенобразующих 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 обьектах до стерилизации живых пирогенобразующих микроорганизмов в количестве до 50 в I мл пирогенная реакция не наблюдается. При содержании 50 - 100 микроорганизмов в I мл пирогенная реакция у кроликов наблюдается не всегда, однако это содержание уже опасно. При наличии пирогенобразующих микроорганизмов более 100 в I 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 официнального биологического испытания на кроликах. Предлагаемая методика проста в исполнении, доступна, применение ее на практике позволит значительно повысить качество инъекционных растворов изготовляемых в аптеках.

Директор НИИФ
доктор фармац.наук, профессор Л.В.Мошкова

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

Ст. научн.сотр. Л.Е.Шедрина

gost.e-ecolog.ru