МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

 **ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**СЫВОРОТКА ПРОТИВ ЯДА ФС**

**ГАДЮКИ ЛОШАДИНАЯ** Вводится взамен ВФС 42-3070-98

Сыворотка против яда змеи гадюки лошадиная представляет собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие яд змеи гадюки обыкновенной.

 ПРОИЗВОДСТВО

 Производство сыворотки против яда змеи гадюки лошадиной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих качество и безопасность ее применения.

Сыворотку получают из плазмы крови лошадей, иммунизированных ядом змеи гадюки обыкновенной. Для получения очищенной, концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы крови лошади, содержащей антитела, нейтрализующие яд змеи гадюки обыкновенной, применяют методы солевого фракционирования, ферментолиза, мембранной фильтрации.

 ИСПЫТАНИЯ

**Описание.**  Прозрачная или слегка опалесцирующая, с желтоватым оттенком жидкость. Определение проводят визуально.

 **Прозрачность.** Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05.

 Определение проводят колориметрическим методом при длине волны 540 нм в кювете толщиной слоя 3 мм против воды.

**Цветность**. Жидкость с желтоватым оттенком. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15.

Определение проводят колориметрическим методом при длине волны 400 нм в кювете толщиной слоя 3 мм против воды.

**рН.** От 6,8 до 7,2. Определение проводят методом потенциометрического титрования в соответствии с ОФС «Ионометрия».

 **Подлинность.** Сыворотка должна нейтрализовывать действие яда змеи гадюки обыкновенной. Определение проводят по разделу «Специфическая активность».

**Содержание белка**. От8 до 12 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

**Стерильность.** Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

 **Пирогенность.**Должна быть апирогенной*.* Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность», если нет других указаний в нормативной документации. Указывают допустимые пределы изменений температуры у животных, тест-дозу. Если не указано иначе, вводят 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика.

**Аномальная токсичность.** Должна быть нетоксичной.Определение проводятвсоответствии с ОФС «Аномальная токсичность. Тест для вакцин и сывороток», если не указано иначе в нормативной документации.

**Специфическая активность.** Не менее 50антитоксических единиц (АЕ) в 1 мл. Специфическую активность сыворотки устанавливают по ее способности нейтрализовывать яд гадюки и выражают в антитоксических единицах (АЕ). За одну антитоксическую единицу принимают количество сыворотки, которое в смеси с 3 LD50 яда гадюки защищает от гибели 50 % мышей, взятых в опыт (LD50 - доза яда гадюки, вызывающая гибель 50 % взятых в опыт, животных в течение двух суток).

*Определение LD50 яда гадюки*

Яд гадюки разводят в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида. Готовят 5-6 разведений, концентрация каждого из которых больше концентрации предшествующего в 1,1 или 1,2 раза (шаг разведений 1,1 или 1,2 соответственно). Разведения яда готовят таким образом, чтобы наибольшее не вызывало гибели, а наименьшее вызывало гибель 100 % мышей. Каждое разведение вводят мышам массой 16 – 18 г внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение двух суток, регистрируя количество павших. LD50 яда рассчитывают по формуле Кербера:

 lgLD50=lgD- σ(ΣLi-0,5), где

lg D – логарифм максимальной из испытанных доз яда,

Li – отношение числа павших к общему числу мышей, получивших одно и то же разведение яда,

σ – логарифм шага разведений.

*Определение специфической активности сыворотки против яда гадюки*

Для разведения испытуемой сыворотки и яда используют стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида.

Испытуемую сыворотку разводят так, чтобы, исходя из ее предполагаемой активности, получить несколько разведений, отличающихся одно от другого в 1,1 - 1,2 раза. Яд гадюки разводят до содержания 10 LD50 в 1 мл (3 LD50 в 0,3 мл). Готовят смеси яда змеи и подготовленных разведений испытуемой сыворотки, в которых на 0,2 мл сыворотки должно приходиться 0,3 мл яда. Общий объем смеси должен быть достаточен для введения по 0,5 мл 5-6 мышам. Смеси яда и разведений сывороток инкубируют 45 мин при температуре (37 ± 0,5) ºС и вводят мышам массой 16 – 18 г внутривенно в объеме 0,5 мл. Каждый опыт сопровождают контролем активности яда змеи. Для контроля готовят не менее трех доз яда, содержащих 0,75; 1,5; 3 LD50 в объеме 0,5 мл.

За животными наблюдают в течение двух суток, регистрируя количество выживших в каждой группе.

Активность сыворотки рассчитывают по наибольшему ее разведению, которое при внутривенном введении мышам в смеси с 3 LD50 яда змеи обеспечивает защиту 50 % животных.

**Удельная активность.** Не менее 50 АЕ на 0,1 г белка. Удельную активность (Х) вычисляют по формуле:

 $\frac{Т}{С ×10} $$\frac{Т}{С ×10} $ ,

где: Т – титр сыворотки, АЕ/мл,

 С - концентрация белка, г/мл,

 10 – постоянный коэффициент.

**Сульфат-ионы.**  Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом.

Методика

К 5 мл испытуемого образца и к 5 мл эталонного раствора (основной раствор калия сульфата разводят в 50 раз) прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм против контрольных растворов. Контрольным раствором для испытуемого образца служит раствор, содержащий 5 мл образца и 0,5 мл воды, для эталонного раствора – вода.

Испытание проводят в двух повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов в % проводят по формуле:

 Х$=\frac{0,002\% ×Аопыт}{Аэталон}$, где

Аопыт –оптическая плотность испытуемого образца

Аэталон - оптическая плотность эталонного раствора

**Примечания**

 Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100–105 °C, растворяют в воде в мерной колбе, вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

 **Натрия хлорид.** От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в иммунобиологических препаратах»

 **Хлороформ.** Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию.

Методика

 В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают.

Содержимое пробирок перемешивают и нагревают в кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают в холодной воде до температуры 15-18 0С, затем измеряют оптическую плотность (Д) окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет.

Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствора хлороформа).

Содержание хлороформа (Х) в испытуемом образце в процентах вычисляют по формуле:

 $Х=\frac{0,1×А исп }{А ст},$

где А исп - оптическая плотность испытуемого образца,

А ст - оптическая плотность образца сравнения - 0,1 % раствора хлороформа.

**Примечание:**

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерный цилиндр вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.
2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерный цилиндр вместимостью 100 мл помещают 5 мг резорцина, растворяют в 30 мл воды, доводят объем раствора до 50 мл и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

 **Извлекаемый объем.** Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения»

 **Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

**Транспортирование, хранение.** При температуреот 2 до 8 ºС, если в нормативной документации нет других указаний.