МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Пирогенал ФС**

**раствор для внутримышечного введения** **Вводится впервые**

Пирогенал, раствор для внутримышечного введения, представляет собой липополисахарид, выделенный из клеток *Salmonella typhi* и растворенный в фосфатно-солевом буферном растворе.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология получения липополисахарида (ЛПС) предусматривает культивирование производственного штамма (штамма-продуцента) в полусинтетической питательной среде, инактивацию микробных клеток формалином, поэтапное выделение и очистку липополисахарида ферментативными методами.

Производственный штамм *Salmonella typhi* Ty2 4446 должен обладать типичными морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами:

- на плотной питательной среде (МПА) образовывать круглые, гладкие, выпуклые, блестящие колонии (S- форма);

- на висмут - сульфит агаре образовывать блестящие колонии черного цвета;

- в мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные палочки с закругленными концами;

- должен ферментировать глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кислоты без газа;

- должен продуцировать сероводород;

- не должен ферментировать лактозу и сахарозу;

- не должен образовывать индол;

- LD50 штамма при внутрибрюшинном заражении белых беспородных мышей должна быть не более 50×106 микробных клеток.

Основные этапы производства препарата:

- получение биомассы и ее инактивация;

- концентрирование методом сепарирования;

- поэтапное выделение и очистка липополисахарида ферментативными методами;

- получение готовой лекарственной формы препарата.

На этапе культивирования используют полусинтетическую питательную среду. Полученную биомассу проверяют на бактериологическую чистоту и типичность морфологии, проводят контроль биохимических свойств микроорганизмов, антигенные свойства проверяют в реакции агглютинации. Инактивацию микробных клеток проводят формалином, по окончании процесса инактивированную биомассу высевают на диагностическую питательную среду висмут- сульфит агар для подтверждения отсутствия роста сальмонелл.

Инактивированную культуральную жидкость подвергают ферментативному гидролизу, сепарированию, из гидролизата ферментативными методами поэтапно выделяют липополисахарид, лиофилизируют, получая субстанцию-лиофилизат очищенного липополисахарида.

ИСПЫТАНИЯ СУБСТАНЦИИ

 **Описание.** Порошок светло-кремового цвета. Определение проводят визуально.

 **Белок.** Не более 3,0 %. Испытания проводят колориметрически по методу Лоури в соответствии с ОФС «Определение белка». Приготовление испытуемого образца липополисахарида указывается в нормативной документации.

 **Нуклеиновые кислоты.** Не более 5,0 %. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по Спирину». Приготовление испытуемого образца липополисахарида указывается в нормативной документации.

 **Углеводы.** От 40 до 60 %. Испытания проводят с антроновым реактивом в соответствии с ОФС «Определение сахаров спектрофотометрическим методом». Приготовление испытуемого образца липополисахарида указывается в нормативной документации.

 **Безвредность.** Препарат должен быть безвредным. Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой (17±1) г. 1 мл раствора липополисахарида с концентрацией 100 мкг/мл вводят внутрибрюшинно, срок наблюдения 5 дней. Приготовление испытуемого образца липополисахарида указывается в нормативной документации.

 **Оптическая плотность.** Показания оптической плотностираствора липополисахарида при 256 нм не должно превышать 0,300; при 280 нм не должно превышать 0,200. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимых областях». Приготовление испытуемого образца липополисахарида указывается в нормативной документации.

 **Потеря массы при высушивании.** Не более 10 %. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение потери массы при высушивании».

**Определение минимальной пирогенной дозы (МПД) рабочей серии липополисахарида**. Одна МПД должна составлять (0,0075± 0,0025) мкг ЛПС. Предварительно готовят раствор липополисахарида в концентрации 100 мкг/мл и из него, путем последовательных десятикратных разведений, готовят раствор с концентрацией 0,01 мкг/мл и из него раствор с концентрацией 0,0075 мкг/мл (к 9,0 мл испытуемого образца с концентрацией 0,01мкг/мл прибавляют 3,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность».

За 1 час до опыта у каждого кролика дважды ректально проводят замеры температуры с интервалом не менее 30 мин. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 °С. Животным вводят раствор препарата внутривенно из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Средний показатель повышения температуры должен составлять от 0,6 до 0,8 °С.

В случае, если средний показатель повышения температуры будет ниже 0,6 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,01 мкг/мл по 1мл на 1 кг массы животного, если средний показатель повышения температуры будет выше 0,8 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,005 мкг/мл по 1мл на 1кг массы животного. Повторный контроль проводят на том же количестве кроликов. Если при повторном испытании после введения растворов с концентрацией 0,01мкг/мл или 0,005 мкг/мл средний показатель повышения температуры у животных составит ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С, соответственно, препарат бракуют. Минимальное количество вещества, вводимое внутривенно на килограмм массы кролика, вызывающее среднее повышение температуры тела на (0,6-0,8) °С составляет минимальную пирогенную дозу (МПД). Одна МПД должна составлять (0,0075± 0,0025) мкг ЛПС.

 Субстанцию-лиофилизат очищенного липополисахарида используют для получения лекарственного препарата Пирогенал, раствор для внутримышечного введения.

ИСПЫТАНИЯ

 **Описание.** Прозрачная бесцветная жидкость. Определение проводят визуально.

 **Подлинность**. Препарат должен быть пирогенным. Одна минимальная пирогенная доза (МПД) должна составлять (0,0075±0,0025) мкг ЛПС (раздел «Специфическая активность»).

 **Прозрачность.** Должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

 **Цветность.** Должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

 **рН.** От 6,7 до 7,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

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

 **Механические включения.** Видимые механические включения должны отсутствовать.Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

 **Стерильность.** Должен быть стерильным. Определяют методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

 **Аномальная токсичность.** Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность. Тест для вакцин и сывороток». Мышам массой (15±1) г вводят тест-дозу 1 мл препарата внутрибрюшинно. Период наблюдения за животными составляет 5 сут.

 **Специфическая активность.** При введении1 минимальной пирогенной дозы (МПД) на 1 кг массы кролика, средний показатель повышения температуры должен быть от 0,6 до 0,8 °С. Препарат, в зависимости от концентрации активного вещества, разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 10 мкг/мл. Затем, путем последовательных десятикратных разведений, готовят раствор с концентрацией 0,01 мкг/мл и из него раствор с концентрацией 0,0075 мкг/мл (к 9,0 мл раствора препарата с концентрацией 0,01мкг/мл прибавляют 3,0 мл раствора натрия хлорида 0,9 %). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». За 1 час до начала опыта у каждого кролика дважды ректально проводят замеры температуры с интервалом не менее 30 мин. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 °С. Животным вводят раствор препарата внутривенно из расчета 1 мл на 1 кг массы. Средний показатель повышения температуры должен составлять от 0,6 до 0,8 °С.

В случае, если средний показатель повышения температуры будет ниже 0,6 °С, вводят 1 мл/кг раствор препарата с концентрацией 0,01 мкг/мл, если выше 0,8 °С, вводят 1 мл/кг раствор препарата с концентрацией 0,005 мкг/мл и проводят повторный контроль на том же количестве кроликов. Если при повторном испытании после введения растворов с концентрацией 0,01мкг/мл или 0,005 мкг/мл средний показатель повышения температуры у животных составит ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С, соответственно, препарат бракуют.

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

 **Хранение.** При температуре от 2 до 8 °С.