МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Пирогенал ФС**

**суппозитории ректальные** **Вводится впервые**

 Пирогенал представляет собой липополисахарид (ЛПС), выделенный из клеток *Salmonella typhi,* используемый в виде ректальных суппозиторий.

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 методом Спирина 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 должны превышать 0,300; при 280 нм не должны 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 1 кг 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, суппозитории ректальные.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание**. Суппозитории желтовато-белого цвета однородной консистенции, цилиндрической формы с заостренным концом, диаметром не более 10 мм.

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

**Средняя масса и отклонение от средней массы.** 1,6 г ± 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

**Температура и время плавления.** Не более 20 мин. Один суппозиторий, залитый 50 мл воды очищенной, подогретой до температуры (37±1) °С в конической колбе вместимостью 100 мл и помещенный в термостат при температуре (37±1) °С, должен расплавиться в течение не более 20 мин.

**Микробиологическая чистота**. В одном суппозитории допускается не более 300 колониеобразующих единиц (КОЕ) микробов-сапрофитов при отсутствии патогенных, условно-патогенных микроорганизмов и грибов. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

 **Безвредность.** Должен быть безвредным. Для испытания отбирают 4 суппозитория. Испытуемые образцы помещают в пробирку вместимостью 20 мл и расплавляют в водяной бане при температуре 40- 45 °С в течение 15-20 мин. Расплавленную массу вводят 5 беспородным белым мышам массой (15±1) г по 1,0 мл внутрибрюшинно со скоростью 0,1 мл/сек шприцем вместимостью 1,0 см3. В течение 5 сут животные должны оставаться живыми. В случае гибели хотя бы одного животного опыт повторяют на удвоенном количестве мышей. Если при повторном испытании животные остались живы, препарат считают прошедшим испытание. В противном случае препарат бракуют.

**Специфическая активность.** Должен быть пирогенным. При введении 1 МПД на 1 кг массы кролика средний показатель повышения температуры должен составлять (0,6-0,8) °С. Для определения специфической активности берут 3 суппозитория. В коническую колбу вместимостью 500 мл наливают 295 мл 0,9 % раствор натрия хлорида и доводят до закипания. В раствор опускают 3 суппозитория и ставят колбу на разогретую магнитную мешалку. Экстракцию пирогенала из суппозиториев проводят в течение 60 мин при интенсивном перемешивании, чтобы жировой слой разбивался на мельчайшие капельки, затем содержимое отстаивают в течение 10-15 мин. В результате полученный раствор пирогенала считают разведенным в 100 раз, т.е. до 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мкг/мл, в зависимости от исходного содержания пирогенала в 1 суппозитории. Далее из нижнего слоя раствора делают разведение до 0,0075 мкг/мл. Трем кроликам вводят препарат в концентрации 0,0075 мкг/мл внутривенно из расчета 1 мл на 1 кг массы. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Средний показатель повышения температуры должен составлять (0,6 - 0,8) °С. Если повышение температуры будет ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С, то испытуемый образец с концентрацией 0,01 мкг/мл или 0,005 мкг/мл вводят повторно. Если при этом средний показатель повышения температуры будет ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С серию бракуют.

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

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