МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Сыворотка противодифтерийная ФС**

**лошадиная**

Вводится взамен

ФС 42-3813-99

Сыворотка противодифтерийная лошадиная, представляет собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие токсин *Corynebacterium diphtheriae*. Сыворотка противодифтерийная лошадиная предназначена для профилактики и лечения дифтерии.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки дифтерийной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих её качество и безопасность применения.

Сыворотку получают из плазмы крови лошадей, иммунизированных дифтерийным анатоксином. Для получения очищенной, концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы крови лошади, содержащей антитела, нейтрализующие дифтерийный токсин, применяют методы солевого фракционирования, ферментолиза, мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТА

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

**Подлинность.** Сыворотка должна нейтрализовывать действие дифтерийного токсина. Определение проводят по разделу «Специфическая активность».

**Прозрачность.** Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей» 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 в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей» при длине волны 400 нм в кювете толщиной слоя 3 мм против воды.

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

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

**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». Вводят 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика. В нормативной документации указывают допустимые пределы изменений температуры животных, тест-дозу.

**Аномальная токсичность.** Должна быть нетоксичной. Определение проводятвсоответствии с ОФС «Аномальная токсичность. Тест для вакцин и сывороток», если в нормативной документации нет других указаний

**Специфическая активность.** Не менее 1500МЕ (Международных единиц) в 1 мл. Специфическую активность противодифтерийной сыворотки определяют в тесте нейтрализации дифтерийного токсина на морских свинках по методу Ремера и выражают в МЕ/мл. (1 МЕ дифтерийного антитоксина – это специфически нейтрализующая активность в отношении дифтерийного токсина, которая содержится в определенном количестве международного стандартного образца, представляющего собой противодифтерийную лиофилизированную лошадиную сыворотку).

*Определение опытной некротической дозы дифтерийного токсина (Ln/50)*

Опытная некротическая доза дифтерийного токсина Ln/50представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с 1/50 ME противодифтерийной сыворотки при внутрикожном введении морским свинкам в объеме 0,05 мл вызывает некроз кожи к 4 суткам.

При определении Ln/50дифтерийного токсина используют стандартный образец (СО) активности противодифтерийной сыворотки, калиброванный в МЕ, который разводят 0,9 % раствором натрия хлорида с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось 2/5 МЕ (соответственно в 0,05 мл 1/50 МЕ).

Готовят несколько (не менее пяти) разведений дифтерийного токсина, различающихся между собой на 10–20 %. Для разведения дифтерийного токсина используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

За сутки до проведения теста участки кожи на боках морских свинок освобождают от шерсти и подшерстка, не допуская ее повреждения. Свинок черной масти и альбиносов не используют. При определении Ln/50дифтерийного токсина одной морской свинке делают не более четырех инъекций.

Смешивают 1 мл противодифтерийной сыворотки и 1 мл одного из разведений дифтерийного токсина. Смеси выдерживают при температуре   
(37 ± 1) ºС и вводят по 0,1 мл внутрикожно не менее чем двум морским свинкам массой (425 ± 25) г. Для инъекций используют шприцы с иглами, имеющими угол скоса не менее 30º. Результаты реакции учитывают ежедневно в течение четырех суток. В зависимости от количества дифтерийного токсина, оставшегося не связанным с противодифтерийной сывороткой, на месте введения смеси токсина и сыворотки может возникнуть эритема, инфильтрат или некроз. При полной нейтрализации дифтерийного токсина антитоксином реакция на месте инъекции должна отсутствовать.

*Определение специфической активности противодифтерийной сыворотки*

Исходя из предполагаемой активности, сыворотку разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 0,4 МЕ/мл (2/5 МЕ в 1 мл). Готовят несколько разведений, отличающихся по активности одно от другого на 10–20 %.

По 1 мл каждого разведения сыворотки смешивают с 1 мл рабочего разведения дифтерийного токсина. Полученные смеси осторожно перемешивают, избегая пенообразования и после выдерживания при температуре (37 ± 1) ºС в течение (30 ± 1) мин вводят двум морским свинкам массой (425 ± 25) г подкожно в объеме 0,1 мл.

Для контроля опытной некротической дозы каждой морской свинке вводят 0,1 мл смеси, содержащей 1 Ln/50дифтерийного токсина и 1/50 МЕстандартного образца. За животными наблюдают 4 сут, отмечая развитие кожных реакций.

Специфическую активность (титр) сыворотки следует рассчитывать по наибольшему ее разведению, которое при внутрикожном введении в смеси с дифтерийным токсином не вызывает у морских свинок кожной реакции к 4 суткам.

**Удельная активность.** Не менее 1300 МЕ на 0,1 г белка. Удельную активность (*Х*) вычисляют по формуле:

где: *Т* – титр сыворотки, МЕ/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, 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.

В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), прибавляют 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 °С, затем измеряют оптическую плотность (*А*) 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 прибавляют, 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:

где: *А*исп – оптическая плотность испытуемого образца;

*А*ст  – оптическая плотность образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа;

0,1 – количество испытуемого образца, взятого на анализ, мл.

**Примечания**

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. 0,1 мл хлороформа помещают в мерный цилиндр вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

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

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

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

**Транспортирование, хранение.** При температуре от 2 до 8 ºС.