МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Сыворотка противостолбнячная ФС**

**лошадиная**

Вводится впервые

Cыворотка противостолбнячная лошадиная представляет собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие столбнячный токсин. Сыворотка противостолбнячная лошадиная применяется для профилактики и лечения столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

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

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

ИСПЫТАНИЯ

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

**Подлинность.** Сыворотка должна нейтрализовывать действие столбнячного 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 при длине волны 540 нм в кювете толщиной слоя 3 мм, если нет других указаний в нормативной документации.

**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, если нет других указаний в нормативной документации.

**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, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Содержание белка**. От8 до 12 %, если нет других указаний в нормативной документации. 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 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 в нормативной документации нет других указаний.

**Специфическая активность.** Не менее 1200Международных единиц (МЕ) в 1 мл. Специфическую активность противостолбнячной сыворотки определяют в тесте нейтрализации столбнячного токсина и выражают в МЕ/мл. (1 МЕ столбнячного антитоксина – это специфически нейтрализующая активность в отношении столбнячного токсина, которая содержится в определенном количестве международного стандартного образца, представляющего собой противостолбнячную лиофилизированную лошадиную сыворотку).

*Определение опытной дозы столбнячного токсина*

Опытная доза столбнячного токсина *(L+/100)* представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с 0,01 ME противостолбнячной сыворотки при введении мышам в объеме 0,4 мл вызывает гибель 50 % мышей на 4 сутки при явлениях столбняка.

Готовят несколько разведений столбнячного токсина, различающихся между собой на 10–20 %.

При определении опытной дозы столбнячного токсина используют стандартный образец (СО) активности противостолбнячной сыворотки, калиброванный в МЕ по отношению к соответствующему международному стандартному образцу. СО разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 0,1 ME/мл. Готовят смеси, состоящие из 1 мл СО активности противостолбнячной сыворотки, 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 1 мл одного из разведений столбнячного токсина. Смеси токсина с сывороткой осторожно перемешивают и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (45 ± 1) минут, затем вводят по 0,4 мл 4 белым мышам массой тела (17 ± 1) г под кожу бедра. За животными наблюдают 4 суток. Отмечают разведение токсина, которое в смеси со стандартным образцом активности противостолбнячной сыворотки вызвало гибель от столбняка 50 % животных.

*Определение специфической активности противостолбнячной сыворотки*

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

По 1 мл каждого разведения сыворотки переносят во флаконы, добавляют по 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 10 опытных доз столбнячного токсина в объеме 1 мл. Полученные смеси осторожно перемешивают, избегая пенообразования, и после выдерживания при температуре (37 ± 1) ºС в течение (45 ± 1) мин вводят 4 белым мышам массой (17 ± 1) г под кожу бедра в объеме 0,4 мл.

Опыт сопровождают контролем опытной дозы токсина, для чего готовят смесь, содержащую 1 мл стандартного образца активности противостолбнячной сыворотки, разведенного до концентрации 0,1 МЕ/мл, 1 мл токсина, содержащего 10 опытных доз, и 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Смесь инкубируют при тех же условиях, что и испытуемую сыворотку и вводят ее 4 белым мышам массой (17 ± 1) г под кожу бедра в объеме 0,4 мл. За животными опытной и контрольной групп наблюдают 4 сут, отмечая количество павших от столбняка.

Специфическую активность (титр) сыворотки рассчитывают, исходя из наибольшего ее разведения, которое в смеси с опытной дозой токсина обеспечивает защиту 100 % мышей от столбняка. Тест не учитывают, если все мыши в контрольной группе остались живы без признаков столбняка.

**Удельная активность.** Не менее 1000 МЕ на 0,1 г белка. Удельную активность (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{T}{C×10},$$

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 толщиной слоя 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 м 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 и 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 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:

$$X=\frac{0,1×A\_{исп}}{A\_{ст}} ,$$

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 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 и хранение**. Температура транспортирования и хранения должна находиться в пределах от 2 до 8 ºС, если в нормативной документации нет других указаний.