

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Анатоксин стафилококковый	ФС.3.3.1.0006.15
очищенный,	
раствор для подкожного	Взамен ГФ X, ст. 62,
введения	ФС 42 – 3238 - 95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на анатоксин стафилококковый очищенный, раствор для подкожного введения, который представляет собой токсин стафилококковый, обезвреженный формалином при нагревании и очищенный от балластных белков способом, гарантирующим полную детоксикацию и отсутствие возможности реверсии токсичности, при сохранении антигенной и иммуногенной активности.

Препарат не содержит консервантов и антибиотиков.

При подкожном введении анатоксин стафилококковый очищенный вызывает образование специфических антител (антитоксинов) против экзотоксина стафилококкового.

Область применения – специфическая иммунотерапия острой и хронической (в стадии обострения) стафилококковой инфекции у взрослых.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве анатоксина стафилококкового очищенного используют штамм *Staphylococcus aureus* O15 (или другой штамм стафилококка, обладающий аналогичными свойствами), который депонирован в официальной коллекции, происхождение и история которого документированы.

При культивировании на жидких питательных средах штамм должен образовывать токсин стафилококковый (синонимы: экзотоксин, альфатоксин, альфастафилолизин). Метод культивирования должен обеспечивать высокую продукцию токсина, сохранять гемолитические свойства штамма и исключать контаминацию штамма посторонней микрофлорой. Токсинсодержащая культуральная жидкость, освобожденная от микробных клеток и продуктов их распада, должна содержать токсин стафилококковый с гемолитической активностью не менее 500 ДНМ (минимальная гемолитическая доза) и иметь Lh (лимит гемолитического действия) токсина не более 0,4 мл. Способ детоксикации токсина стафилококкового должен гарантировать отсутствие токсичности и возможность ее реверсии при сохранении антигенной (не менее 2 ЕС/мл) и иммуногенной (способность вызывать образование специфических антител) активности анатоксина стафилококкового.

Для характеристики анатоксина стафилококкового очищенного, раствора для подкожного введения, определяют: рН, прозрачность, цветность, стерильность, аномальную токсичность, специфическую безвредность, специфическую активность, антигенную активность, содержание формальдегида.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость бесцветная или светло-желтого цвета. Определяют визуально.

Подлинность. Должен вызывать образование антител к токсину стафилококковому. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в препаратах крови человека и животных».

Прозрачность. Должен быть прозрачным. Определение проводят визуально.

Цветность. Не должен быть окрашен более эталона Y₆. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Извлекаемый объём. Не менее номинального. Нормативные требования указывают в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,2 до 7,4, если нет других указаний в нормативной документации. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным.

Белым мышам (5 животным) массой 18–20 г препарат вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл, 2 морским свинкам массой 250–300 г подкожно по 2 мл.

Препарат считают выдержавшим испытание, если:

- в течение 7 сут наблюдения все животные остались живы и ни у одного из животных не были выявлены видимые признаки заболевания;
- ни у одного из животных не отмечена потеря массы тела;
- ни у одной морской свинки в месте введения препарата не развился абсцесс или некроз.

Если в течение периода наблюдения регистрируют гибель хотя бы 1 животного, заболевание, уменьшение массы тела или повреждение в месте инъекции, испытание повторяют на удвоенном количестве животных при тех же условиях учета опыта. Повторное испытание считают удовлетворительным, если препарат отвечает вышеперечисленным требованиям.

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвредным.

Кроликам (2 животным) массой 2 – 2,5 кг препарат в дозе 3 мл вводят подкожно в боковую поверхность тела и в той же дозе – внутривенно в краевую вену уха.

Препарат считают выдержавшим испытание, если в течение 5 сут наблюдения кролики остаются здоровыми и в местах введения препарата отсутствуют явления некроза тканей.

Примечание.

Для проведения исследования специфической безвредности и специфической активности (иммуногенности) используют кроликов, у которых в 1 мл сыворотки крови содержится не более 0,125 МЕ (Международных единиц) антиальфастафилолизина. Определение проводят по ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Специфическая активность (иммуногенность). Должен вызывать образование специфических антител при подкожном введении (содержание антиальфастафилолизина (специфических антител) в сыворотке крови иммунизированных кроликов должно быть не менее 3 МЕ в 1 мл (среднеарифметическое значение).

Кроликам (3 животным) массой (2,0 ± 0,5) кг, признанным пригодными для проведения испытания, препарат вводят подкожно в боковую поверхность тела трехкратно с интервалом 5–6 сут в объемах 0,5; 1,0; 1,5 мл. Через 7–9 сут после последней иммунизации у кроликов берут кровь из краевой вены уха и определяют в сыворотке крови каждого животного содержание антиальфастафилолизина. Определение проводят по ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Антигенная активность (антитоксинсвязывающая способность). 1 мл препарата должен содержать от 10 до 14 ЕС (единиц связывания)

стафилококкового анатоксина. 1 ЕС представляет собой минимальное количество анатоксина, которое связывает 1 МЕ (Международную единицу) антиальфастафилолизина.

Метод определения антигенной активности основан на способности стафилококкового анатоксина связывать специфические антитела (антиальфастафилолизин) и на способности антител нейтрализовать гемолитические свойства токсина стафилококкового.

Для постановки реакции используют следующие ингредиенты:

- испытуемый анатоксин стафилококковый;
- стандартный образец (СО) антиальфастафилолизина с установленным содержанием стафилококковых антител (МЕ/мл);
- токсин стафилококковый, гемолитические свойства которого характеризуются величиной Lh (лимит гемолитического действия – минимальное количество токсина стафилококкового, которое, будучи связано с 1 МЕ антиальфастафилолизина, вызывает почти полный (+++) гемолиз эритроцитов кролика);
- 15 % взвесь эритроцитов кролика;
- 0,9 % раствор натрия хлорида.

Определение антитоксинсвязывающей способности анатоксина стафилококкового сопровождается 4 контролями.

1 контроль – служит для коррекции учета результатов опытного ряда, т.к. в нем определяется количество МЕ (Международных единиц) антиальфастафилолизина, которое нейтрализует Lh токсина стафилококкового в условиях опыта. СО антиальфастафилолизина разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до содержания 1 МЕ в 1 мл, разливают в ряд пробирок в объеме 0,8; 0,9; 1; 1,1; 1,2 мл и доводят общий объем в каждой пробирке 0,9 % раствором натрия хлорида до 2 мл. Таким образом, первый контроль состоит из ряда пробирок, содержащих от 0,8 до 1,2 МЕ антиальфастафилолизина.

2 контроль – контроль «полноты» нейтрализации Lh токсина стафилококкового специфическими антителами в условиях опыта. В пробирку наливают 1 мл раствора СО антиальфастафилолизина, разведенного до содержания 2 МЕ/мл, и доводят общий объем 0,9 % раствором натрия хлорида до 2 мл.

3 контроль – контроль отсутствия спонтанного лизиса эритроцитов кролика. В пробирку вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

4 контроль – контроль гемолитического действия токсина стафилококкового на эритроциты кролика в условиях опыта. В пробирку вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Опытный ряд – испытуемый препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в 8, 10, 12, 14 и 16 раз. Переносят в пробирки по 1 мл приготовленных разведений и добавляют в них по 1 мл раствора СО антиальфастафилолизина, содержащего 2 МЕ/мл. Пробирки осторожно встряхивают и выдерживают 20 мин при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Затем в пробирки опытного и контрольных рядов (кроме третьего) добавляют токсин стафилококковый в объеме Lh, установленном в день проведения испытания. Все пробирки встряхивают и выдерживают 20 мин при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Далее в каждую пробирку добавляют по 0,1 мл свежеприготовленной 15 % взвеси эритроцитов, пробирки вновь встряхивают и выдерживают в течение 1 ч при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, а затем – 1 ч при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Результаты учитывают визуально по степени гемолиза эритроцитов:

«++++» – полный гемолиз (прозрачная ярко окрашенная жидкость);

«+++» – почти полный гемолиз (опалесцирующая окрашенная жидкость);

«++» – частичный гемолиз (надосадочная жидкость, – окрашена);

«+» – слабый гемолиз (надосадочная жидкость, – слегка окрашена);

«–» – отсутствие гемолиза (надосадочная жидкость, – прозрачная,

бесцветная).

Учет результатов опыта начинают с определения результатов контроля.

Во втором и третьем контроле гемолиз эритроцитов должен отсутствовать. Отсутствие гемолиза во втором контроле свидетельствует, о том, что антиальфастафилолизин в дозе 2 МЕ полностью нейтрализовал гемолитическое действие дозы токсина стафилококкового в опыте; в четвертом контроле должен произойти полный гемолиз эритроцитов.

Учет результатов опытного ряда проводят в сравнении с результатами первого контрольного ряда—учитывают первые пробирки, в которых произошел почти полный гемолиз «+++».

При оптимальных условиях опыта почти полный гемолиз «+++» должен произойти в пробирке контрольного ряда, содержащей 1 МЕ антиальфастафилолизина. В той пробирке опытного ряда, в которой зафиксирован также почти полный гемолиз «+++», вызываемый оставшимся свободным стафилококковым токсином, испытуемый анатоксин связал 1 МЕ антиальфастафилолизина и, следовательно, в ней содержится 1 ЕС (единица связывания) анатоксина.

Антигенная активность (антитоксическая способность) (АС) стафилококкового анатоксина, выраженная в единицах связывания (ЕС), рассчитывается по следующей формуле:

$$AC = n \cdot (2 - a),$$

где n – кратность разведения испытуемого анатоксина в опыте;

2 – количество МЕ антиальфастафилолизина в опыте;

a – количество МЕ антиальфастафилолизина, затраченное на нейтрализацию дозы токсина стафилококкового в первом контрольном ряду;

$(2 - a)$ – количество МЕ антиальфастафилолизина, связанное испытуемым анатоксином в условиях опыта, являющееся эквивалентом количества единиц связывания (ЕС) анатоксина в опыте.

Если почти полный гемолиз «+++» произошел в пробирке

контрольного ряда, содержащей 1 МЕ антиальфастафилолизина, и аналогичный результат зафиксирован в пробирке опытного ряда, содержащей испытуемый анатоксин, разведенный в 12 раз, следовательно, в 1 мл испытуемого анатоксина содержится $12 \cdot (2-1) = 12$ ЕС.

Если почти полный гемолиз «+++» произошел в пробирке контрольного ряда, содержащей 0,9 МЕ антиальфастафилолизина, и аналогичный результат получен в пробирке опытного ряда, содержащей испытуемый анатоксин, разведенный в 10 раз, то 1 мл испытуемого анатоксина содержит $10 \cdot (2-0,9) = 10 \cdot 1,1 = 11$ ЕС.

Если почти полный гемолиз «+++» произошел в пробирке контрольного ряда, содержащей 1,1 МЕ антиальфастафилолизина, и аналогичный результат зафиксирован в пробирке опытного ряда, содержащей анатоксин, разведенный в 14 раз, то 1 мл испытуемого анатоксина содержит $14 \cdot (2-1,1) = 14 \cdot 0,9 = 12,6$ ЕС.

Примечание.

Приготовление 15 % взвеси эритроцитов кролика и определение величины Lh токсина проводят по ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Производственный штамм. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штамма(ов); место их депонирования; морфологическую характеристику; при необходимости допустимое количество пассажей и методику их проведения с указанием субстрата и условий культивирования; дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Показатели, которые отражают качество конечного продукта, но не могут быть определены, должны быть определены на промежуточных стадиях производства, что также должно быть отражено в нормативной документации.

Формальдегид. Не более 30 мкг/мл. Испытание проводят по ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических

лекарственных препаратах».

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

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.