

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Сыворотка противогангренозная	ФС.3.3.1.0041.15
поливалентная лошадиная	Взамен ГФ X, ст.610,
	ФС 42-3616-98

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку противогангренозную поливалентную лошадиную, представляющую собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови лошадей, содержащую специфические антитела, нейтрализующие токсины возбудителей газовой гангрены рода *Clostridium* (*C. perfringens* типа А, *C. novyi* и *C. septicum*).

Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная предназначена для экстренной профилактики и лечения газовой гангрены.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки противогангренозной поливалентной лошадиной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих ее качество и безопасность применения.

Сыворотку получают из плазмы лошадей, гипериммунизированных гангренозными токсинами/анатоксинами. Для получения очищенной концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы лошади, содержащей антитела (антитоксины), нейтрализующие гангренозные экзотоксины, применяют методы солевого фракционирования, ферментолита и мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

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

Подлинность. Должна нейтрализовать действие токсинов, продуцируемых *C. perfringens* типа А, *C. novyi* и *C. septicum*. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Прозрачность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм против контрольного раствора – воды очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм против контрольного раствора – воды очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

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

рН. От 6,8 до 7,2, если не указано иначе в нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 8 до 14 %, если не указано иначе 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 апиrogenной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность», если не указано иначе в нормативной документации производителя. Указывают допустимые пределы изменения температуры тела животных и тест-дозу. Если не указано иначе, вводят внутривенно 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая активность. Не менее 700 международных единиц (МЕ) каждого типа гангренозных антитоксинов в 1 мл. Специфическую активность сыворотки по каждому типу гангренозных антитоксинов определяют в тесте нейтрализации соответствующих токсинов.

Определение опытных доз гангренозных токсинов. Опытная доза токсина (L^{+/}) представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с определенным количеством соответствующего антитоксина при внутривенном введении белым мышам вызывает гибель не менее 50 % животных.

Опытную дозу токсина *C. perfringens* (L^{+/10}) определяют по отношению к 0,1 МЕ антитоксина *C. perfringens*, токсина *C. septicum* (L^{+/5}) – по отношению к 0,2 МЕ антитоксина *C. septicum*, токсина *C. novyi* (L^{+/50}) – по отношению к 0,02 МЕ антитоксина *C. novyi*.

Для определения опытных доз для каждого из гангренозных токсинов готовят не менее 4 последовательных разведений, отличающихся между собой по содержанию токсина на 10 – 20 %. К 0,1 МЕ референс-препарата (или стандартного образца активности) антитоксина *C. perfringens*, или 0,2 МЕ референс-препарата (или стандартного образца активности) антитоксина *C. septicum*, или 0,02 МЕ референс-препарата (или стандартного образца активности) антитоксина *C. novyi*, взятых в объеме 0,2 мл, добавляют подготовленные разведения токсинов в объеме 0,3 мл. Смеси готовят из расчета на 5 мышей (1 мл стандартного образца активности антитоксина и 1,5 мл токсина).

Полученные смеси перемешивают и выдерживают при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин, затем каждую вводят по 0,5 мл внутривенно 4 белым мышам.

При определении опытной дозы токсинов *C. perfringens* и *C. septicum* наблюдают за животными в течение 48 ч, а при определении опытной дозы токсина *C. novyi* – в течение 96 ч, отмечая количество выживших мышей в каждой группе.

Определение специфической активности (титра) сыворотки противогангренозной C. perfringens. Готовят ряд разведений испытуемой поливалентной противогангренозной сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида с таким расчетом, чтобы, в зависимости от предполагаемого титра, 0,1 МЕ содержалось в 0,2 мл раствора. К 1 мл каждого разведения сыворотки добавляют 1,5 мл токсина *C. perfringens*, содержащего в объеме 0,3 мл опытную дозу. Определение проводят с 6 – 8 разведениями сыворотки (например, 1:1300; 1:1400; 1:1500 и т.д.), отличающимися по своей предполагаемой активности одно от другого на 10 – 20 %.

Каждый опыт титрования (приготовления разведений испытуемой сыворотки) сопровождают контролем опытной дозы токсина, вводимой в смеси с 0,1 МЕ стандартного образца активности антитоксина *C. perfringens*. После выдерживания при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин смесь из каждой пробирки вводят 4 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 48 ч. К концу наблюдения в контроле должно погибнуть не менее 50 % взятых в опыт мышей. Максимальное разведение сыворотки, предохраняющее от гибели 100 % мышей в данной группе, содержит 0,1 МЕ в 0,2 мл, т.е. 0,5 МЕ в 1 мл.

Титр антитоксина *C. perfringens* в испытуемой сыворотке рассчитывают, исходя из взятых в опыт разведений. Например, если максимальное разведение сыворотки, защищающее от гибели 100 % мышей, соответствует 1:1300, то 1 мл этого разведения содержит 0,5 МЕ антитоксина

C. perfringens, следовательно, 1 мл испытуемой сыворотки содержит 0,5 МЕ $1300 = 650$ МЕ антитоксина *C. perfringens*.

Определение титра антитоксина C. septicum. Готовят ряд разведений испытуемой поливалентной противогангренозной сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида с таким расчетом, чтобы, в зависимости от предполагаемого титра, в 0,2 мл разведенной сыворотки содержалось 0,2 МЕ. К 1 мл каждого разведения сыворотки добавляют 1,5 мл токсина *C. septicum*, содержащего в объеме 0,3 мл опытную дозу. Определение проводят с 6 – 8 разведениями сыворотки (например, 1:650; 1:700; 1:750 и т.д.), отличающимися по своей предполагаемой активности одно от другого на 10 – 20 %.

Каждый опыт титрования испытуемой сыворотки сопровождают контролем опытной дозы токсина, вводимой в смеси с 0,2 МЕ стандартного образца активности антитоксина *C. septicum*. После выдерживания при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин смесь токсина с каждым разведением сыворотки вводят 4 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 48 ч. К концу наблюдения в контроле должно погибнуть не менее 50 % взятых в опыт мышей. Максимальное разведение сыворотки, предохраняющее от гибели 100 % мышей в группе, содержит 0,2 МЕ в 0,2 мл, т.е. 1 МЕ в 1 мл. Титр антитоксина *C. septicum* в испытуемой сыворотке рассчитывают, исходя из взятых в опыт разведений. Например, если максимальное разведение сыворотки, защищающее от гибели 100 % мышей, соответствует 1:700, то 1 мл этого разведения содержит 1 МЕ, следовательно, 1 мл неразведенной сыворотки содержит 1 МЕ $700 = 700$ МЕ антитоксина *C. septicum*.

Определение титра антитоксина C. novyi. Готовят ряд разведений испытуемой поливалентной противогангренозной сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида с таким расчетом, чтобы, в зависимости от предполагаемого титра, 0,02 МЕ содержались в 0,2 мл раствора. К 1 мл каждого разведения сыворотки добавляют 1,5 мл токсина, содержащего в

объеме 0,3 мл опытную дозу. Определение проводят с 6 – 8 разведениями сыворотки (например, 1:6500; 1:7000; 1:7500 и т.д.), отличающимися по предполагаемой активности одно от другого на 10 – 20 %. Каждый опыт титрования сопровождают контролем опытной дозы токсина, вводимой в смеси с 0,02 МЕ стандартного образца активности антитоксина *C. novyi*. После инкубирования при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин каждую смесь вводят 4 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 96 ч. К концу наблюдения в контроле должно погибнуть не менее 50 % взятых в опыт мышей.

Максимальное разведение сыворотки, предохраняющее от гибели 100 % взятых в опыт белых мышей, содержит 0,02 МЕ в 0,2 мл, т.е. 0,1 МЕ в 1 мл. Титр антитоксина *C. novyi* в испытуемой сыворотке рассчитывают, исходя из взятых в опыт разведений. Например, если максимальное разведение сыворотки, защищающее от гибели 100 % мышей, соответствует 1:8000, то в 1 мл этого разведения содержится 0,1 МЕ антитоксина *C. novyi*. Следовательно, 1 мл неразведенной сыворотки содержит 0,1 МЕ 8000 = 800 МЕ антитоксина *C. novyi*.

Активность каждого компонента поливалентной сыворотки рассчитывают, исходя из разведения с наименьшей концентрацией сыворотки, которое в смеси с опытной дозой токсина обеспечивает 100 % выживаемость взятых в опыт животных.

Специфическую активность (титр) поливалентной сыворотки выражают по компоненту с наименьшей активностью. В данном примере – по антитоксину *C. perfringens*.

Удельная активность. Не менее 500 МЕ на 0,1 г белка каждого типа антитоксина *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*.

Удельную активность (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{T}{C \cdot 10},$$

где T – титр сыворотки, МЕ/мл;

C – концентрация белка, г/мл;

10 – постоянный коэффициент

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и 5 мл рабочего эталонного раствора 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 контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, для эталонного раствора – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов (X) в процентах производят по формуле:

$$X = \frac{0,002 \% \cdot A_{\text{опыт}}}{A_{\text{эталон}}},$$

где $A_{\text{опыт}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{эталон}}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора.

Примечания.

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.

2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных 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), добавляют 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 на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15 – 18 °С, затем измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 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 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (X) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0,1 \cdot A_{\text{исп}}}{A_{\text{ст}}},$$

где $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

Примечания.

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 часа.

2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды

очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

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

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

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С, если не указано иначе в нормативной документации. Замораживание не допускается.