

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Сыворотки противоботулинические
типов А, В, Е лошадиные**

**ФС.3.3.1.0042.15
Взамен ГФ X, ст. 608,
ФС 42-3814-99**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотки противоботулинические типов А, В и Е, представляющие собой иммуноглобулиновые фракции сыворотки крови лошадей, содержащие специфические антитела, нейтрализующие ботулинические токсины типов А, В или Е. Сыворотки предназначены для экстренной профилактики и лечения ботулизма.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сывороток противоботулинических типов А, В и Е должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований и гарантирующее качество и безопасность их применения.

Сыворотки получают из плазмы крови лошадей, гипериммунизированных соответствующими ботулиническими анатоксинами/токсинами. Полученную иммуноглобулиновую фракцию плазмы крови лошади, содержащую антитела (антитоксины), нейтрализующие ботулинический токсин соответствующего типа, очищают и концентрируют методами солевого фракционирования, ферментолиза и мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

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

Подлинность. Сыворотка должна нейтрализовывать действие ботулинических токсинов типов А, В и/или Е. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Прозрачность. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кювете с 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 фотометрическим методом при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм, 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 производителя. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Содержание белка. От 8 до 12 %, если не указано иначе в нормативной документации производителя. 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. Указывают допустимые пределы изменений температуры тела у животных и тест-дозу. Если не указано иначе, вводят 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность», если нет других указаний в нормативной документации.

Специфическая активность. Не менее 2500 международных единиц (МЕ) в 1 мл – для противоботулинической сыворотки типа А, не менее 600 МЕ/мл – для противоботулинической сыворотки типа В и не менее 1200 МЕ/мл – для противоботулинической сыворотки типа Е. Специфическую активность противоботулинических сывороток каждого серотипа в отдельности определяют в тесте нейтрализации соответствующих токсинов (1 МЕ ботулинического антитоксина – это специфически нейтрализующая активность антитоксической сыворотки в отношении ботулинического токсина одноименного типа, которая содержится в определенном количестве международного стандартного образца, представляющего собой противоботулиническую лиофилизированную лошадиную сыворотку определенного серотипа).

Определение опытной дозы ботулинических токсинов. Опытная доза (L+/5) ботулинических токсинов типа А, В и Е представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с 0,2 МЕ антитоксической противоботулинической сыворотки одноименного типа при введении мышам вызывает гибель 50 % животных (при явлениях ботулизма) на 4 сут.

Для определения опытной дозы готовят несколько разведений ботулинического токсина, различающихся между собой на 10 – 20 %.

При определении L+/5 токсина используют стандартный образец (СО) активности противоботулинической сыворотки соответствующего типа, калиброванный в МЕ, который разводят 0,9 % раствором натрия хлорида с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалась 1 МЕ (0,2 МЕ в 0,2 мл). Смешивают 1 мл СО активности противоботулинической сыворотки с 1,5 мл раствора ботулинического токсина одноименного типа разной концентрации, начиная с наименьшей. Смеси токсина с сывороткой осторожно перемешивают, выдерживают при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ±

1) мин, затем вводят по 0,5 мл внутривенно 4 белым мышам массой 16 – 18 г. За животными наблюдают 4 сут, отмечая у них появление симптомов ботулизма. Определяют то разведение токсина, которое в смеси со стандартным образцом соответствующего антитоксина вызвало гибель 50 % животных при явлениях ботулизма.

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

По 1 мл каждого разведения сыворотки переносят во флаконы, добавляют по 1,5 мл ботулинического токсина одноименного типа, содержащего 5 опытных доз. Полученные смеси осторожно перемешивают, избегая пенообразования и после выдерживания при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин вводят 4 белым мышам массой 16 – 18 г внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают 4 сут, отмечая клинику заболевания и число павших от ботулизма мышей.

Опыт сопровождают контролем опытной дозы токсина, для чего готовят смесь, содержащую 1 мл СО активности противоботулинической сыворотки соответствующего типа с исходной концентрацией 1 МЕ/мл и 1,5 мл токсина, содержащего 5 опытных доз. Смесь инкубируют при тех же условиях, что и испытуемую сыворотку и вводят ее внутривенно 4 белым мышам массой 16 – 18 г в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают 4 сут, отмечая клинику заболевания и число мышей, павших от ботулизма.

Специфическую активность (титр) сыворотки рассчитывают, исходя из наибольшего ее разведения, которое в смеси с опытной дозой токсина обеспечивает защиту 100 % мышей от ботулизма. Тест не учитывают, если более 50 % мышей контрольной группы остались живы.

Удельная активность. Не менее 2000 МЕ на 0,1 г белка для противоботулинической сыворотки типа А, не менее 500 МЕ – для

противоботулинической сыворотки типа В, не менее 1000 МЕ – для противоботулинической сыворотки типа Е.

Расчет удельной активности (X) производят 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 растворяю 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 «Иммунобиологические лекарственные препараты».

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