

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Сыворотка противодифтерийная

ФС.3.3.1.0043.15

лошадиная

Взамен ГФ X, ст. 609,

ФС 42-3813-99

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку противодифтерийную лошадиную, которая представляет собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие дифтерийный экзотоксин. Сыворотка противодифтерийная лошадиная предназначена для экстренной профилактики и лечения дифтерии.

ПРОИЗВОДСТВО

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

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

ИСПЫТАНИЯ

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

Подлинность. Сыворотка должна нейтрализовывать действие дифтерийного токсина. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Прозрачность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей» при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм по сравнению с водой очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей» при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм по сравнению с водой 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».

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

Содержание белка. От 8 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 апиrogenной. 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 и тест-дозу.

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

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

Определение опытной некротической дозы дифтерийного токсина. Опытная дермонекротическая доза ($L_{n/50}$) дифтерийного токсина представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с 1/50 МЕ противодифтерийной сыворотки при внутрикожном введении морским свинкам в объеме 0,05 мл вызывает некроз кожи к 4 - 5 сут.

При определении $L_{n/50}$ дифтерийного 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 5) разведений дифтерийного токсина, различающихся между собой по активности на 10 – 20 %. Для разведения дифтерийного токсина используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

За 1 сут 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 $L_{n/50}$ дифтерийного токсина 1 морской свинке делают не более 4 инъекций.

Смешивают 1 мл противодифтерийной лошадиной сыворотки и 1 мл одного из разведений дифтерийного токсина. Смеси выдерживают при

температуре (37 ± 1) °С в течение (30 ± 1) мин и вводят по 0,1 мл внутрикожно не менее чем 2 морским свинкам массой (425 ± 25) г. Для инъекций используют шприцы с иглами, имеющими угол скоса не менее 30°. Результаты реакции учитывают ежедневно в течение 5 сут. 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 (титра) 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 друг от друга по активности 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) °С в течение (30 ± 1) мин вводят 2 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 Ln₅₀ дифтерийного токсина и 1/50 МЕ стандартного образца активности противодифтерийной сыворотки. За животными наблюдают 5 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 – 5 сут.

Удельная активность. Не менее 1300 МЕ на 0,1 г белка. Удельную активность (*X*) вычисляют 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 к 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 проводят 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.