

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Сыворотка противостолбнячная
лошадиная**

ФС.3.3.1.0044.15
Взамен ГФ X, ст. 611,
ФС 42-195ВС-88

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку противостолбнячную лошадиную, представляющую собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие столбнячный токсин. Сыворотка противостолбнячная лошадиная применяется для экстренной профилактики и лечения столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

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

Сыворотку получают из плазмы крови лошадей, гипериммунизированных столбнячным анатоксином/токсином. Для получения очищенной концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы крови лошади, содержащей антитела (антитоксины), нейтрализующие столбнячный экзотоксин, 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 столбнячного токсина. Определение проводят по разделу «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, 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, 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, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Содержание белка. От 8 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 апиrogenной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность», если нет других указаний в нормативной документации. Указывают допустимые пределы изменения

температуры тела 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 в нормативной документации нет других указаний.

Специфическая активность. Не менее 1200 международных единиц (МЕ) в 1 мл. Специфическую активность противостолбнячной сыворотки определяют в тесте нейтрализации столбнячного токсина по методу Эрлиха и выражают в МЕ/мл (1 МЕ столбнячного антитоксина – это специфически нейтрализующая активность антитоксической сыворотки 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 МЕ противостолбнячной сыворотки при введении мышам в объеме 0,4 мл вызывает гибель 50 % мышей (с явлениями столбняка) на 4 сут.

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

При определении опытной летальной 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 МЕ/мл. Готовят смеси, состоящие из 1 мл СО активности противостолбнячной лошадиной 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 $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 1) мин, затем вводят по 0,4 мл 4

белым мышам массой (17 ± 1) г под кожу бедра. За животными наблюдают 4 сут. Отмечают разведение токсина, которое в смеси со СО активности противостолбнячной сыворотки вызвало гибель от столбняка 50 % животных.

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

По 1 мл каждого разведения испытуемой 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) °С 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 СО 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 мышей.

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 (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 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 «Имунобиологические лекарственные препараты».

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