

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Сыворотка против яда

ФС.3.3.1.0045.15

змеи гадюки обыкновенной

лошадиная

Взамен ВФС 42-3070-98

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку против яда змеи гадюки лошадиную, представляющую собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие яд змеи гадюки обыкновенной.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки против яда змеи гадюки лошадиной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих качество и безопасность ее применения.

Сыворотку получают из плазмы крови лошадей, иммунизированных ядом змеи гадюки. Для получения очищенной, концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы крови лошади, содержащей антитела, нейтрализующие яд змеи гадюки, применяют методы солевого фракционирования, ферментолиза, мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

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

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

толщиной слоя 3 мм против контрольного раствора – воды очищенной, 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 по сравнению с контрольным раствором – водой очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

рН. От 6,8 до 7,2. Определение проводят методом потенциометрического титрования в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Подлинность. Сыворотка должна нейтрализовать действие яда змеи гадюки обыкновенной. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

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», если нет других указаний в нормативной документации. Указывают допустимые пределы изменений температуры 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 не указано иначе в нормативной документации.

Специфическая активность. Не менее 50 антитоксических единиц (АЕ) в 1 мл. Специфическую активность сыворотки устанавливают по ее способности нейтрализовать яд гадюки и выражают в антитоксических единицах (АЕ). За одну антитоксическую единицу принимают количество

сыворотки, которое в смеси с 3 LD₅₀ яда гадюки защищает от гибели 50 % мышей, взятых в опыт (LD₅₀ – доза яда гадюки, вызывающая гибель 50 % взятых в опыт животных в течение 2 сут).

Определение LD₅₀ яда гадюки. Яд гадюки разводят в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида. Готовят 5–6 разведений, концентрация каждого из которых больше концентрации предшествующего в 1,1 или 1,2 раза (шаг разведений 1,1 или 1,2 соответственно). Разведения яда готовят таким образом, чтобы наибольшее разведение (содержащее наименьшее количество яда) не вызывало гибели, а наименьшее разведение с максимальной дозой токсина вызывало гибель 100 % мышей. Каждое разведение вводят мышам массой 16 – 18 г внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 2 сут, регистрируя количество павших животных. LD₅₀ яда рассчитывают по формуле Кербера:

$$\lg LD_{50} = \lg D - \sigma (\sum L_i - 0,5),$$

где $\lg D$ – логарифм максимальной из испытанных доз яда;

L_i – отношение числа павших к общему числу мышей, получивших одно и то же разведение яда;

σ – логарифм шага разведений.

Определение специфической активности сыворотки против яда гадюки. Для разведения испытуемой сыворотки и яда используют стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида.

Испытуемую сыворотку разводят так, чтобы, исходя из ее предполагаемой активности, получить несколько разведений, отличающихся одно от другого на 10 - 20 %. Яд гадюки разводят до содержания 10 LD₅₀ в 1 мл (3 LD₅₀ в 0,3 мл). Готовят смеси яда змеи и подготовленных разведений испытуемой сыворотки, в которых на 0,2 мл сыворотки должно приходиться 0,3 мл яда. Общий объем смеси должен быть достаточен для введения по 0,5 мл 5 – 6 мышам. Смеси яда и разведений сывороток инкубируют 45 мин при температуре (37 ± 0,5) °C и

вводят внутривенно в объеме 0,5 мл мышам массой 16 – 18 г. Каждый опыт сопровождают контролем активности яда змеи. Для контроля готовят не менее 3 доз яда, содержащих 0,75; 1,5; 3 LD₅₀ в объеме 0,5 мл.

За животными наблюдают в течение 2 сут, регистрируя количество выживших в каждой группе.

Активность сыворотки рассчитывают по наибольшему ее разведению, которое при внутривенном введении мышам в смеси с 3 LD₅₀ яда змеи обеспечивает защиту 50 % животных.

Удельная активность. Не менее 50 АЕ на 0,1 г белка. 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, эталонный раствор – вода очищенная (5 мл).

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

Расчет содержания сульфат-ионов 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. Затем пробирки нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15–18 °С, 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 в нормативной документации нет других указаний. Замораживание не допускается.