**МИНИЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**ТАТЬЯ**

Анатоксин дифтерийный ФС

очищенный концентрированный

жидкий (ОКДА) Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию анатоксина дифтерийного очищенного концентрированного жидкого (ОКДА), которая представляет собой дифтерийный анатоксин, полученный из дифтерийного экзотоксина путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, предназначенный для производства моно и ассоциированных вакцин, а также для производства диагностикумов содержащих дифтерийный компонент.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства субстанции дифтерийного анатоксина должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и гарантии безопасность ее применения.

Дифтерийный анатоксин представляет собой токсин *Corynebacterium diphtheriae*, обезвреженный и очищенный способом, гарантирующим полную стабильную детоксикацию при сохранении антигенной активности. Для получения дифтерийного токсина используют токсигенный штамм *C. diphtheriae*, полученный и депонированный в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию дифтерийного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, рН и содержание токсина. Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина и очистка дифтерийного анатоксина (кислотно-солевое осаждение, мембранная фильтрация) должны обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

*Определение специфической безопасности дифтерийного анатоксина (ОКДА)*

Испытание проводят на 5 морских свинках массой 250 − 350 г, которым вводят подкожно 1500 Lf (суммарно в оба бока) дифтерийного анатоксина. Анатоксин считается безопасным, если в течение 30 сут все животные остаются живыми и в течение указанного периода у животных не отмечена потеря в массе тела, не обнаруживаются изъязвления, инфильтраты, абсцессы, некрозы и другие местные патологические явления. Если наблюдается гибель хотя бы 1 животного от дифтерийной интоксикации (красные надпочечники при аутопсии погибших животных), дифтерийный анатоксин применению не подлежит. Если фиксируют гибель более 1 животного по причине, не связанной с дифтерийной интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдается гибель более 1 животного, дифтерийный анатоксин считают не прошедшим испытание.

*Реверсия токсичности дифтерийного анатоксина*

Готовят раствор, содержащий дифтерийный анатоксин и консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут первую − при температуре (37 ± 1) ºС, вторую − при температуре от 2 до 8 ºС. По 0,1 мл каждого образца препарата вводят внутрикожно 2 морским свинкам массой 250 − 350 г или 1 кролику массой (2,5 ± 0,5) кг в объеме 0,2 мл. Наличие реакций на месте инъекции в течение 4 сут наблюдения свидетельствует о присутствии во введенном растворе дифтерийного токсина.

Для характеристики очищенного дифтерийного анатоксина определяют его рН, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность). Дифтерийный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства ОКДА можно использовать только стерильный и безопасный дифтерийный анатоксин с активностью не менее 1500 Lf на мг белкового азота.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Прозрачная жидкость от светло желтого до коричневого цвета, допускается опалесценция. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

**Подлинность.** Должна вступать в реакцию флокуляции с противодифтерийной сывороткой для флокуляции (раздел «Антигенная активность»).

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

**Общий азот.** От 0,25 до 0,75 мг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение общего азота с реактивом Несслера в биологических лекарственных препаратах».

**Белковый азот.** От 0,20 до 0,70 мг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белкового азота с реактивом Несслера с предварительным осаждением белкового материала в биологических лекарственных препаратах».

**рН.** От 6,7 до 7,3. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Специфическая безопасность.** Субстанция считается безопасным, если в течение 30 сут после инъекции все животные остаются живыми без потери массы тела, паралича, некрозов и других местных патологических явлений. При гибели одного из животных опытной группы испытания повторяют на удвоенном количестве животных при тех же условиях. Если при повторном испытании наблюдается гибель животных, лекарственный препарат признают не соответствующим требованиям.

**Реверсия токсичности.** Должна отсутствовать. Два образца субстанции разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до активности 60 Lf/мл. Один образец выдерживают в течение 42 сут при температуре (37±1) ºС, а второй образец выдерживают в течение 42 сут при температуре (5±3) ºС. Определение проводят не менее чем на четырех кроликах. Реверсию токсичности проверяют посредством внутрикожного введения кролику 0,2 мл. За животными наблюдают ежедневно в течение 4 сут после инъекции. Внутрикожное введение анатоксина не должно вызывать местных реакций. Ни у одного животного не должно наблюдаться признаков столбняка в течение всего периода наблюдения.

**Специфическая (антигенная) активность**. Не менее 300 Lf в 1мл. Антигенные свойства субстанции дифтерийного анатоксина определяют в реакции флокуляции. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции».

**Удельная активность**. Не менее 1500 Lf на 1 мг белкового азота. Величину удельной активности (Х), выраженную в Lf на мг белкового азота, вычисляют по формуле: Х = А/В, где:

А – антигенная активность (Lf/мл);

В – количество белкового азота (мг/мл)

**Формальдегид**. От 200 до 800 мкг/мл. Определение проводятв соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

**Производственные штаммы микроорганизмов.** Штамм *Corynebacterium diphtheria* РW вариант *Massachusetts* № 800013 при культивировании на бульоне Лингуда должен образовать токсин, содержащий от 10000 до 100000 DLM/ мл.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». На первичную упаковку наносят дополнительное указание «Встряхивать!». На вторичную упаковку наносят дополнительные указания «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается».

**Транспортирование и хранение.** При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.