**Антигены условно-патогенных ФС**

**микроорганизмов *Staphylococcus aureus* +**

***Klebsiella pneumoniae* + *Proteus vulgaris +***

***Escherichia coli*, лиофилизат**

**для приготовления раствора**

**для подкожного введения Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на антигены условно-патогенных микроорганизмов *Staphylococcus aureus* + *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus vulgaris + Escherichia coli*, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения представляющий собой лиофилизированную смесь водорастворимых антигенов, извлеченных из микробных клеток *S. аureus*, *K. pneumoniae, P. vulgari, E. coli.*

Действующим веществом препарата являются антигены микробных клеток *S. аureus*, *K. pneumoniae, P. vulgaris, E. coli F-147* - липополисахаридные комплексы наружной мембраны, пептидогликан, тейхоевые кислоты, белки клеточных стенок, стимулирующие экспрессию *Toll*-подобных рецепторов (*TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-6, TLR-9*), расположенных на клетках - эффекторах врожденного иммунитета, что приводит к повышению продукции цитокинов (в первую очередь интерферона), к усилению пролиферации и цитотоксической активности естественных киллеров, а также повышению концентрации IgA в сыворотке и в секретах слизистой оболочки носоглотки.

Препарат обладает перекрестной протективной активностью против условно-патогенных микроорганизмов, наиболее часто вызывающих инфекционно-воспалительные заболевания, оказывает иммуномодулирующее действие, стимулирует врожденный и приобретенный (общий и мукозальный) иммунитет.

Препарат выпускается в ампулах и флаконах в комплекте с растворителем для приготовления раствора для подкожного введения.

Препарат предназначен для профилактики и лечения острых и хронических заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами.

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата антигены условно-патогенных микроорганизмов *Staphylococcus aureus* + *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus vulgaris + Escherichia coli* основано на системе посевного материала.

Все этапы производства препарата должны осуществляться с соблюдением:

* установленных требований организации производства и контроля качества медицинских биологических препаратов, гарантирующих качество и безопасность для человека;
* условий, исключающих контаминацию чужеродными агентами;
* требований ОФС: «Биотехнологические лекарственные препараты», «Вакцины и анатоксины».

Производственные штаммы должны иметь паспорт, где представлены данные по истории выделения штамма, основным биологическим свойствам, условиям хранения.

Производственные штаммы (*S. aureus № 5, № 9, № 1991 и № 1986, K. pneumoniae № 204, P. vulgaris № 177, E. coli F-147)* должны храниться в лиофилизированном виде в ампулах на производстве в соответствии с установленными правилами порядка учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I- IV групп патогенности, действующими на территории РФ.

На первом этапе производства вакцинного препарата каждый производственный штамм культивируют отдельно на специальных питательных средах, в условиях, обеспечивающих стабильный рост бактериальной массы. Полученную биомассу производственных штаммов дезинтегрируют и выделяют нужные антигены.

Бактериальную массу производственных штаммов *K. pneumoniae, P. vulgaris* и *E. coli F-147* дезинтегрируют с помощью лизирующего агента - гидроксиламина. Из цельных лизатов выделяют липополисахаридные комплексы наружной мембраны клеточной стенки. Для этого цельные лизаты подвергают многоступенчатому процессу очистки, удаляя неразрушенные микробные клетки и балластные вещества (низкомолекулярные компоненты лизированных бактерий и примеси питательной среды).

Антигены производственных штаммов *S. аureus* (пептидогликан, тейхоевые кислоты и белки клеточной стенки) выделяют из бактериальной массы путем водной экстракции.

Выделенные антигены условно-патогенных микроорганизмов производственных штаммов смешивают в необходимых пропорциях и проводят стерилизующую фильтрацию. В асептических условиях препарат разливают в ампулы, лиофильно высушивают и запаивают. После чего контролируют герметичность упаковки под вакуумом или в атмосфере инертного газа. Ампулы должны быть герметичны.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Пористая или кристаллическая масса белого или белого с желтоватым оттенком цвета. Определение проводят визуально.

**Подлинность.** Должен вызывать торможение гемагглютинации сенсибилизированных эритроцитов с гипериммунной сывороткой. Определение проводят в реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА), по разделу «Специфическая активность».

**Время восстановления препарата.** Не более 2 мин. При добавлении в ампулу с препаратом 0,5 мл воды для инъекций или стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида при температуре 18 - 20 ºС содержимое ампулы должно полностью раствориться.

Содержимое флакона должно раствориться в течение не более 2 мин в 4 мл воды для инъекций или стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида при температуре 18 - 20 ºС.

Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

**Прозрачность.** Восстановленный раствор должен выдерживать сравнение с эталоном III. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей». Для приготовления испытуемого образца содержимое 10 ампул растворяют в пробирке в 5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида.

В два флакона добавляют по 4 мл воды для инъекций или стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида переносят в одну емкость и перемешивают.

**Цветность.** Восстановленный раствор не должен превышать эталон оттенка № 4 Y. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**рН.** Значение рН восстановленного раствора должно находиться в интервале от 7,1 до 8,1. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для приготовления испытуемого образца содержимое 30 ампул растворяют в 15 мл воды очищенной или содержимое 4 флаконов растворяют в 16 мл воды очищенной.

**Средняя масса и отклонения от средней массы**. От 11,7 до 14,3 мг для ампул и от 95 до 115 мг для флаконов. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 10 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или «Определение воды».

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева. Препарат в условиях испытания не обладает антимикробным действием.

**Аномальная токсичность.** Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Препарат растворяют в 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Тест-доза составляет: для белых мышей 0,2 мл внутрибрюшинно, для морских свинок - 0,2 мл подкожно.

**Специфическая активность.** Минимальная тормозящая доза с 2 гемагглютинирующими единицами гипериммунной сыворотки должна составлять:

* для клебсиеллезного и протейного компонентов не более 1,25 мкг;
* для эшерихиозного компонента не более 5,0 мкг;
* для стафилококкового компонента не более 12,5 мкг.

Определение проводят в РТПГА. Методика проведения испытания должна быть указана в нормативной документации.

**Белок.** Не более 0,3 мг в 1 ампуле (флаконе). Определение проводят спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

Испытание проводят с разведенными образцами препарата. В три ампулы с препаратом добавляют по 1 мл воды. Содержимое первой ампулы разводят в 10 раз, содержимое второй ампулы - в 20 раз, содержимое третьей ампулы - в 30 раз.

В три флакона с препаратом добавляют по 10 мл воды. Переносят по 1 мл полученного раствора из каждого флакона в три пробирки. Содержимое первого флакона разбавляют водой в 10, второго - в 20 и третьего - в 30 раз.

Определяют значение оптической плотности каждого раствора при длинах волн 215 и 225 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве растворов сравнения используют растворы лактозы: для 10-кратного разведения - раствор лактозы с концентрацией 1,2 мг/мл, для 20-кратного - 0,6 мг/мл, для 30-кратного - 0,4 мг/мл.

Среднее значение содержания белка (*Сi*) в мг/мл для каждого раствора вычисляют по формуле:

$$С\_{i}=\left(A\_{215}-A\_{225}\right)∙P\_{i}∙0,144, $$

где:

*А215 и А225* - показатели оптической плотности раствора препарата при длине волн 215 и 225 нм, соответственно;

*Рi* - кратность разведения;

0,144 - эмпирически вычисленный коэффициент для белков при измерении оптической плотности растворов при длинах волн 215 и 225 нм

Примечания

Приготовление раствора лактозы концентрацией 1,2 мг/мл. 12 мг лактозы растворяют в 10 мл воды и перемешивают.

Приготовление раствора лактозы концентрацией 0,6 мг/мл. К 2 мл раствора лактозы концентрацией 1,2 мг/мл добавляют 2 мл воды.

Приготовление раствора лактозы концентрацией 0,4 мг/мл. К 2 мл раствора лактозы концентрацией 1,2 мг/мл добавляют 4 мл воды.

**Лактоза.** От 11,2 до 13,8 мг в ампуле и от 90 до 110 мг во флаконе. Определение проводят рефрактометрическим методом в соответствии с ОФС «Рефрактометрия».

Методика определения в ампулах

В три ампулы с препаратом добавляют по 0,5 мл воды и перемешивают в одной емкости. На призму рефрактометра наносят 1 каплю испытуемого образца и определяют показатель преломления. По калибровочному графику находят содержание лактозы. Содержание лактозы (*X*) мг в 1 ампуле вычисляют как среднее арифметическое значение трех измерений по формуле:

$X=A∙0,15$*,*

где:

*А* - содержание лактозы, найденное по калибровочному графику, мг/мл;

0,5 - объем препарата в ампуле, мл

Калибровочный график*.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 мг лактозы (точная навеска) и растворяют в воде при нагревании на водяной бане до температуры не более 60 ºС (содержание лактозы 0,1 мг/мл), объем раствора доводят водой до метки и перемешивают. В 10 мерных пробирок помещают от 0,1 до 1,0 мл полученного раствора (содержание лактозы от 0,01 до 0,1 мг соответственно), объем раствора в каждой пробирке доводят водой до 2 мл и перемешивают.

Методика определение во флаконах

В три флакона с препаратом добавляют по 2 мл воды, содержимое флаконов объединяют в одной емкости и перемешивают. На призму рефрактометра наносят 1 каплю испытуемого образца и определяют показатель преломления. По калибровочному графику находят содержание лактозы. Содержание лактозы (*X*) мг в одном флаконе вычисляют как среднее арифметическое значение трех измерений по формуле:

$X=A∙2$*,*

где:

*А* - содержание лактозы, найденное по калибровочному графику, мг/мл;

2 - объем препарата во флаконе, мл

Калибровочный график. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 г лактозы (точная навеска) и растворяют в воде при нагревании на водяной бане до температуры не более 60 ºС (содержание лактозы 200 мг/мл). Объем раствора доводят водой до метки и перемешивают. В 10 мерных пробирок помещают от 0,1 до 1,0 мл полученного раствора (содержание лактозы от 20 до 200 мг соответственно), объем раствора в каждой пробирке доводят водой до 2 мл и перемешивают.

Измеряют показатель преломления для каждого раствора лактозы (ампулы/флаконы) и строят график, где по оси абсцисс откладывают значения концентрации лактозы (мг/мл), а по оси ординат - показатель преломления. Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

**Гидроксиламин.** Не более 0,5 мкг в ампуле, во флаконе не более 4 мкг. Определение проводят колориметрическим методом.

В три ампулы с препаратом добавляют по 0,5 мл воды и переносят в пробирку.

Во флакон с препаратом добавляют 4 мл воды.

Готовят испытуемые и контрольные образцы при постоянном помешивании, согласно табл.

Таблица - Приготовление испытуемой и контрольной проб.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Реактивы** | **Контрольный образец** | **Испытуемый образец** |
| 1.  | раствор препарата | 1 мл | - |
| 2.  | вода | - | 1 мл |
| 3.  | 20 % раствора натрия ацетата | 0,5 мл | 0,5 мл |
| 4. | 1 % раствора сульфаниловой кислоты | 0,5 мл | 0,5 мл |
| 5.  | 1,3 % раствора йода | 0, 15 мл | 0, 15 мл |
| 6.  | 1,6 % раствора натрия тиосульфата | 0,5 мл | 0,5 мл |

После обесцвечивания растворов в испытуемые и контрольные образцы (ампулы/флаконы) прибавляют по 0,3 мл 0,3 % раствора α-нафтиламина. Появляется красное окрашивание.

Определяют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным образцом. Содержание гидроксиламина (мкг/мл) определяют по калибровочному графику.

Калибровочный график для определения содержания гидроксиламина в препарате в ампулах и флаконах. 0,1 % раствор гидроксиламина разводят водой в 1000 раз в мерной колбе вместимостью 1000 мл (содержание гидроксиламина 1 мкг/мл). В 10 мерных пробирок вносят полученный раствор гидроксиламина от 0,1 до 1,0 мл (содержание гидроксиламина от 0,1 до 1 мкг, соответственно). В каждой пробирке объем раствора доводят водой до 1 мл. Затем в каждую пробирку при постоянном помешивании вносят реактивы, в последовательности указанной в табл. После обесцвечивания растворов в образцы прибавляют по 0,3 мл 0,3 % раствора α-нафтиламина и определяют оптическую плотность каждого образца. Строят калибровочный график зависимости оптической плотности от содержания гидроксиламина, который воспроизводят при каждом анализе.

Примечания

Приготовление 0,1 % раствора гидроксиламина. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 0,1 г гидроксиламина гидрохлорида, растворяют в воде и перемешивают. Раствор доводят водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 3 мес при комнатной температуре.

Приготовление 1,3 % раствора йода. В мерный цилиндр вместимостью 100 мл вносят 1,3 г йода, растворяют в небольшом количестве уксусной кислоты ледяной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят в защищенном от света месте в течение 6 мес при комнатной температуре.

Приготовление 1% раствора сульфаниловой кислоты. В мерный цилиндр вместимостью 100 мл вносят 1 г сульфаниловой кислоты, растворяют в 75 мл воды, затем прибавляют 25 мл уксусной кислоты ледяной и перемешивают. Раствор хранят в защищенном от света месте в течение 6 мес при комнатной температуре.

Приготовление 0,3 % раствора α-нафтиламина. В мерный цилиндр вместимостью 100 мл вносят 0,3 г α-нафтиламина растворяют в 70 мл воды, прибавляют 30 мл уксусной кислоты ледяной и перемешивают. Раствор готовят за 18 ч до применения. Раствор хранят в защищенном от света месте в течение 7 сут при комнатной температуре.

Приготовление 1,6 % раствора натрия тиосульфата. В мерный цилиндр вместимостью 100 мл вносят 1,6 г натрия тиосульфата и растворяют в воде. Объем раствора доводят водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в защищенном от света месте течение 6 мес при комнатной температуре.

Приготовление 20 % раствора натрия ацетата. В мерный цилиндр вместимостью 100 мл вносят 20 г натрия ацетата растворяют в воде, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят в защищенном от света месте в течение 6 мес при комнатной температуре.

**Производственные штаммы.** Антигены условно-патогенных микроорганизмов *Staphylococcus aureus* + *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus vulgaris + Escherichia coli F-147*, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения готовят из культур штаммов следующих микроорганизмов:

*S. aureus № 5, № 9, № 1991 и № 1986*. Штаммы должны обладать типичными морфологическими, культуральными, биохимическими, антигенными и другими свойствами характерными для вида *S. аureus*. ЕD50 штаммов *№ 5 и № 9* составляет (1·107 - 1·108) микробных клеток (м.к.), для штамма *№ 1991* - (1·106 - 1·107) м.к.и для штамма *№1986* - (1·107 - 5·107) м.к. LD50 штаммов *S. aureus №5, №9, № 1991 и №*1986, при внутрибрюшинном введении мышам в агаре с массовой долей 0,4 %, составляет (1·108 - 1·109) м.к.

*K. pneumoniae № 204*. Штамм должен обладать типичными морфологическими, культуральными, биохимическими, антигенными и другими свойствами характерными для вида *K. рneumoniae*. Бактерии штамма *K. pneumoniae № 204* должны иметь слабо выраженную капсулу и образовывать колонии S-формы. ЕD50 штамма *K. pneumoniae № 204* для мышей составляет (35·106 - 65·106) м.к., убитых нагреванием при температуре 56 ºС в течение 47 ч, при заражении 2,5 - 3,5 LD50 гомологичного штамма. LD50 штамма *K. pneumoniae № 204*, при внутрибрюшинном введении мышам в агаре с массовой долей 0,4 %, составляет (180·106 - 320·106) м.к.

*P. vulgaris № 177*. Штамм должен обладать типичными морфологическими, культуральными, биохимическими, антигенными и другими свойствами характерными для вида *P. vulgaris*. ЕD50 штамма *P. vulgaris № 177* для мышей при подкожной иммунизации составляет (55·106 - 85·106) м.к., убитых нагреванием при температуре 56 ºС в течение 47 ч, при внутрибрюшинном заражении 3 - 5 LD50 вакцинного штамма. LD50 штамма *P. vulgaris № 177*, при внутрибрюшинном введении мышам в агаре с массовой долей 0,4 %, составляет (2·106 - 6·106) м.к.

*E. coli F-147*. Штамм должен обладать типичными морфологическими, культуральными, биохимическими, антигенными и другими свойствами характерными для вида *E. сoli*. ЕD50 штамма *E. coli F-147* для мышей составляет (150·106 - 250·106) м.к., убитых нагреванием при температуре 56 ºС в течение 47 ч. LD50 штамма, *E. coli F-147* при внутрибрюшинном введении мышам в агаре с массовой долей 0,4 %, составляет (140·106 - 160·106) м.к.

Штаммы должны быть депонированы в официальной коллекции.

Штаммы должны храниться в лиофилизированном виде в ампулах на производстве в соответствии с установленными правилами порядка учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I- IV групп патогенности, действующими на территории РФ.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

**Транспортирование** и **хранение.** При температуре от 2 до 8 оС в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25оС не более 10 сут.