**Вакцина стафило-протейно- ФС**

**синегнойная адсорбированная,**

**суспензия для подкожного введения Взамен ВФС 42-2685-96**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину стафило-протейно-синегнойную адсорбированную, суспензию для подкожного введения. Препарат представляет собой комплекс очищенных концентрированных анатоксинов синегнойной палочки и стафилококка, цитоплазматического антигена стафилококка и протейного поливалентного антигена, сорбированных на геле алюминия гидроксида. Активными веществами являются: анатоксин синегнойной палочки очищенный концентрированный (30±3) мкг, стафилококковый анатоксин очищенный (7±1) ЕС, протейный поливалентный антиген (50±5) мкг, цитоплазматический антиген стафилококка (1,0±0,1) мг.

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Все стадии производственного процесса получения вакцины стафило-протейно-синегнойной адсорбированной, суспензии для подкожного введения должны быть валидированы в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики, обеспечивающие качество и безопасность ее применения и должны соответствовать требованиям ОФС «Вакцины и сыворотки».

Для производства вакцины используются штаммы:

*Pseudomonas aeruginosa* (продуцент экзотоксина А) для производства анататоксина синегнойной палочки;

*Рroteus mirabilis* для производства протеинового поливалентного антигена;

*Staphylococcus aureus* для производства цитоплазматического антигена стафилококка;

*Staphylococcus aureus* для производства стафилококкового анатоксина.

Производственные штаммы должны соответствовать требованиям по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам.

При работе со штаммами следует учитывать действующие требования на территории РФ, относящиеся к III - IV группе патогенности микроорганизмов. Депонированные штаммы хранятся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов, России при температуре от 2 до 8º С в лиофилизированном виде.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Гомогенная суспензия белого или слегка желтоватого цвета, разделяющаяся при отстаивании на прозрачную, разделяющаяся при отстаивании на прозрачную или опалесцирующую надосадочную жидкость и рыхлый осадок, полностью разбивающийся при встряхивании. Определение проводят визуально.

**Подлинность.** Должен обладать протективным эффектом в отношении тест-штаммов *P.aeruginosa* РА-7, *Р. mirabilis* № 40, *S.aureus* Б-243 Определение проводят биологическим методом по разделу «Специфическая активность».

**рН**. От 6,6 до 7,4. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Извлекаемый объем.** Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

**Проходимость через иглу.** Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8∙40. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

**Время седиментационной устойчивости.** После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева~~.~~

**Аномальная токсичность.** Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

**Специфическая безопасность.** Должен быть безопасным. Испытания проводят на двух морских свинках с массой тела от (300±30) г путем подкожного введения в оба бока 3 мл вакцины (по 1,5 мл в каждый бок). За животными наблюдают в течение 21 сут. Допускается снижение массы тела в пределах 10 % от исходной в течение первой недели после инъекции с последующей прибавкой массы тела к концу срока наблюдения, а также образование подкожных уплотнений на месте инъекции в виде узелка размером не более 15·15 мм.

В случае гибели морских свинок, появления очагов некроза на месте введения или снижения массы тела на 10 % и более испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле отмечается гибель хотя бы одной морской свинки, появление некроза или снижение массы тела на 10 % и более, препарат бракуют.

**Специфическая активность (иммуногенность).** Должен быть иммуногененным. Однократное введение вакцины белым мышам должно обеспечивать выживаемость не менее 70 % животных при заражении культурами *P.aeruginosa* РА-7 и *Р. mirabilis* и 50 % - при заражении культурой *S.aureus* Б-243.

Методика

Вакцину вводят однократно внутрибрюшинно 30 беспородным мышам массой (16±2) г в объеме 0,5 мл. Через 14 сут из мышей формируют 3 группы по 10 голов в каждой. Животных каждой группы заражают внутрибрюшинно с учетом предварительно определенной величины LD50 штамма.

Опыт проводят по следующей схеме

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Заражающий штамм | Срок заражения | Величина LD50(количество микробных клеток) | Число LD50 культуры для заражения |
| *P.aeruginosa* | 14 сут | (8±4)106 | 3-4 |
| *Р. mirabilis* | 14 сут | (150±50)106 | 2-3 |
| *S.aureus* | 14 сут | (3±1)106 | Не менее 2 |

Для установления дозы заражения дважды проводят контроль вирулентности (определение LD50) каждого тест штамма: предварительно за 5-7 сут перед заражением опытных мышей и повторно в день заражения на одной и той же партии мышей, которые были взяты для иммунизации.

Для заражения животных используют культуру второго пассажа каждого тест-штамма после восстановления лиофилизата.

В асептических условиях ампулу с сухой культурой вскрывают, добавляют 2-3 мл мясопептонного бульона (МПБ). Полученную взвесь переносят в пробирку с 5 мл МПБ и выращивают при температуре (37±1) ºС в течение (18±2) ч. Далее культуру пересевают петлей в пробирки с 2 % мясо-пептоновом агаром и выращивают по температуре (37±1) ºС в течение (18±2) ч. Выросшую культуру смывают 0,9 % раствором натрия хлорида. Готовят взвеси культур и определяют количество микробных клеток по стандартному образцу мутности (СО) (эквивалент дозы 1·109 микробных клеток (МК) в 1 мл). Для определения LD50 каждую культуру разводят так, чтобы получить в 0,5 мл следующие дозы микробных клеток:

- для штамма *P.aeruginosa* РА-7 – 31,2 ·106; 15,6 · 106; 7,8 ·106; 3,9 · 106;

- для штамма *Р. mirabilis* № 40 – 1·109; 0,5·109; 0,25·109; 0,125 · 109; 0,0625·109;

-для штамма *S.aureus* Б-243- 10·109; 5 · 109; 2,5· 109; 1,25 · 109; 0,625 · 109.

На каждое разведение используют 5 мышей, которым вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл соответствующей дозы суспензии.

Наблюдение за животными проводят в течение 5 сут. LD50 культур вычисляют по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева по формуле:

LgN – лагарифм максимальной заражающей дозы;

δ – лагарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей (кратность разведения);

Li –отношение числа животных, погибших от введения данной дозы к общему числу животных, которым эта доза была введена;

∑Li - сумма значений Li, найденных для всех испытанных доз.

С учетом результатов LD50 в день определения специфической активности вакцины, готовят микробные суспензии культур тест-штаммов второго пассажа, содержащие 3-4 LD50 штамма *P.aeruginosa* РА-7; 2-4 штамма *Р. mirabilis* № 40 и не менее 2 LD50 *S.aureus* Б-243, которые вводят иммунизированным животным однократно внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл.

**Алюминий.** От 0,8 до 1,2 мг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение алюминия в биологических лекарственных препаратах».

**Формальдегид.** Не более 100 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

**Масса (объем) содержимого упаковки.** Испытания проводят в соответствии с ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

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

**Транспортирование и хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Замораживание не допускается.