

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вакцина брюшнотифозная

ФС.3.3.1.0012.15

Взамен ГФ X, ст.724,

Ви-полисахаридная

ФС 42-60ВС-87

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину брюшнотифозную Ви-полисахаридную, представляющая собой раствор капсульного полисахарида, извлеченного из супернатанта культуры *Salmonella typhi*.

Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная предназначена для профилактики брюшного тифа.

ПРОИЗВОДСТВО

Производственный штамм *Salmonella typhi* должен отвечать следующим требованиям:

- на плотной питательной среде образовывать круглые, гладкие, выпуклые, блестящие колонии (S-формы);
- на висмут-сульфитном агаре образовывать черные блестящие колонии;
- в мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные палочки с закругленными концами;
- должен ферментировать глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кислоты без газа;
- должен продуцировать сероводород;
- не должен ферментировать лактозу и сахарозу;
- не должен образовывать индол;

– LD₅₀ производственного штамма должна быть не более 20 микробных клеток при внутрибрюшинном введении в 5 % мушине третьего типа белым беспородным мышам массой 16 – 20 г.

Технология получения вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной предусматривает культивирование производственного штамма (штамма-продуцента) в жидкой синтетической питательной среде; получение биомассы и ее дезактивацию; выделение из полученной биомассы капсульного неочищенного Ви-полисахарида и его лиофилизацию; очистку Ви-полисахарида и лиофилизацию очищенного Ви-антигена; получение готовой формы препарата.

На этапе культивирования используют синтетическую питательную среду. Полученную биомассу контролируют на бактериологическую чистоту и типичность морфологии. Инактивацию проводят фенолом, по окончании процесса оценивают специфическую стерильность биомассы методом посева селективные питательные среды.

Полученную инактивированную культуральную жидкость центрифугируют, супернатант подвергают концентрированию и диализу. Концентрат Ви-антигена лиофилизируют, полученный после лиофилизации неочищенный Ви-полисахарид контролируют по массе и определяют Ви- и О-специфическую активность. Этап очистки предусматривает очистку от нуклеиновых кислот, балластных белков и диализ Ви-антигена.

Лиофильно высушенный препарат очищенного Ви-антигена представляет собой субстанцию для приготовления готовой формы препарата.

СУБСТАНЦИЯ ОЧИЩЕННОГО Ви-АНТИГЕНА

Описание. Белый аморфный порошок.

Подлинность. Оценивается в реакции преципитации в геле по Оухтерлони с монорецепторной Ви-сывороткой (подраздел «Подлинность» раздела «Испытания»). Линия преципитации 0,01 % раствора субстанции должна быть идентичной линии преципитации стандартного образца (СО).

Белок. Не более 1,0 %. Определение проводят по методу Лоури без предварительного осаждения белка в соответствии с ОФС «Определение белка» и ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5,0 мг/мл.

Нуклеиновые кислоты. Не более 2,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1,0 мг/мл.

О-ацетильные группы. Не менее 2,0 мкмоль/мг. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение О-ацетильных групп в полисахаридных вакцинах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1,0 мг/мл.

Молекулярные параметры. Не менее 50 % полисахарида должно элюироваться в объеме до коэффициента распределения $K_d = 0,25$. Определение проводят методом гель-фильтрации с использованием сефарозы. Через колонку длиной около 0,4 м, с внутренним диаметром 9 мм, уравновешенную 0,2 М раствором натрия хлорида пропускают около 0,9 мг полисахарида в объеме 0,5 мл и элюируют со скоростью около 14 мл/ч. Фракции регистрируют с помощью ультрафиолетового детектора при длине волны 206 нм. Выход полисахарида оценивают по площади пиков до и после $K_d = 0,25$.

Калибрование колонки. Определяют полный (V_t) и свободный (V_0) объемы колонки с помощью калибровочных растворов голубого декстрана и натрия азида в условиях, описанных выше.

Вычисляют объем выхода фракций в мл (V_e), соответствующий $K_d = 0,25$ по формуле:

$$V_e = V_0 + 0,25(V_t - V_0),$$

где V_0 – свободный объем колонки (объем выхода голубого декстрана), мл;
 V_t – общий объем колонки (объем выхода натрия азида), мл;

0,25 – коэффициент распределения вещества (K_d).

Рассчитывают значение V_e в мм по формуле и находят на хроматограмме:

$$V_e = \frac{V_e(\text{мл}) \cdot V_t(\text{мм})}{V_t(\text{мл})}$$

Пики, элюирующиеся до и после $K_d = 0,25$ (значение V_e на хроматограмме, мм), интегрируют вручную.

Содержание полисахарида (А) в субстанции вакцины, элюированного до $K_d = 0,25$, выраженное в процентах, определяют по формуле:

$$A = \frac{S_1}{(S_1 + S_2)} \cdot 100 \%,$$

где S_1 – площадь пика, элюировавшегося до $K_d = 0,25$;

S_2 – суммарная площадь пиков, элюировавшихся до и после $K_d = 0,25$.

Определение молекулярных параметров можно проводить с помощью валидированного метода эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» раздел «Эксклюзионная хроматография».

Примечания.

1. Приготовление испытуемого раствора. Растворяют $0,9 \pm 0,050$ мг полисахарида в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида. Полученный раствор перемешивают на шейкере в течение 2 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

2. Приготовление 0,1 % раствора натрия азида. Растворяют 1 мг натрия азида в 1мл 0,2М раствора натрия хлорида. Раствор перемешивают на шейкере в течение 1 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

3. Приготовление 0,5 % раствора голубого декстрана. Растворяют 0,5 мг голубого декстрана в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида, перемешивают на шейкере в течение 1 мин, прибавляют 40 мкл 0,1 % раствора натрия азида и снова перемешивают на шейкере.

Растворы для калибрования хроматографической колонки готовят непосредственно перед использованием.

4. Приготовление 0,2 М раствора натрия хлорида. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 500 мл воды очищенной, прибавляют 11,7 г натрия хлорида, доводят объём раствора водой до метки. Раствор

перемешивают на магнитной мешалке в течение 5 мин и хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

Специфическая активность. Содержание Ви-антигена в субстанции должно быть от 70 до 130 %. Испытания проводят методом ракетного иммуноэлектрофореза (подраздел «Специфическая активность» раздела «Испытания»).

Пирогенность. Субстанция должна быть апиrogenной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест - доза 0,025 мкг/мл в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на 1,0 кг массы животного.

Аномальная токсичность. Субстанция должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Готовят раствор субстанции в концентрации 100,0 мкг в 1,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Тест-доза для морских свинок – 1,0 мл испытуемого раствора подкожно, для мышей – 0,5 мл испытуемого раствора внутривенно.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с запахом фенола. Определение проводят органолептически.

Подлинность. Подлинность препарата вакцины оценивают в реакции преципитации в геле по Оухтерлони. Вакцина брюшнотифозная полисахаридная должна давать дугу преципитации, идентичную СО Ви-антигена, с монорецепторной Ви-сывороткой (приготовление сыворотки указывают в нормативной документации).

Для постановки реакции пластиковую или стеклянную пластины размером 8,5 × 9,5 см заливают 12 мл 1 % геля агарозы, приготовленном на 0,9 % растворе натрия хлорида. В застывшем слое геля с помощью пробойника и специального трафарета делают лунки: одну центральную, остальные – на периферии. Диаметр лунок – 0,4 см, расстояние между ними должно быть 0,4 см. В центральную лунку вносят 15 мкл раствора монорецепторной Ви-сыворотки (титр не ниже 1:800), в периферические – по

15 мкл СО и испытуемой вакцины, а также 0,9 % раствор натрия хлорида в качестве отрицательного контроля. Затем пластину помещают во влажную камеру на 24 – 48 ч. Вакцину считают подлинной, если линия преципитации вакцины в отношении монорецепторной Ви-сыворотки идентична линии преципитации СО.

Прозрачность. Прозрачная или опалесцирующая жидкость не более эталона I. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Бесцветная жидкость. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

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

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

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

Стерильность. Вакцина должна быть стерильна. Испытания проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Вакцина должна быть апиrogenной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Готовят разведение испытуемого образца с помощью апиrogenного 0,9 % раствора натрия хлорида до конечной концентрации 0,025 мкг/мл. С этой целью к 0,1 мл испытуемого образца прибавляют 1,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивают, затем отбирают 0,1 мл разведенного образца и прибавляют 9,9 мл 0,9 % натрия хлорида. Вводят кроликам из расчета 1 мл испытуемого образца в концентрации 0,025 мкг/мл на 1 кг массы животного.

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза для морских свинок – 1,0 мл подкожно; для мышей – 0,5 мл внутривенно.

Специфическая активность. Одна доза вакцины должна содержать $(25 \pm 7,5)$ мкг Ви-антигена. Определение проводят методом ракетного иммуноэлектрофореза (РИЭФ).

В химическую пробирку с 16 мл расплавленного и охлажденного до температуры $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 % геля агарозы вносят 0,5 мл сыворотки против Ви-антигена *S.typhi* (титр не ниже 1:800) и перемешивают. Содержимое пробирки выливают на стеклянную пластинку размером 6×12 см, установленную на горизонтальной поверхности. Пластинка должна покрыться гелем агарозы равномерно и полностью. Толщина геля должна составлять $(1,0 \pm 0,1)$ мм. После застывания геля агарозы пластинку накладывают на трафарет и пробивают лунки пробойником диаметром 4 мм, после чего удаляют гель из лунок с помощью вакуумного насоса или иглы.

В катодную и анодную части электрофоретической камеры заливают по 800 мл разведенного трис-боратного буферного раствора (раствор 2) и охлаждают заполненную буферным раствором камеру до температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в холодильной установке. Охлажденную камеру вынимают и помещают в нее пластину таким образом, чтобы край пластины с лунками находился у анодной части.

Электродные мостики для соединения гелевой пластины с буферным раствором готовят из 4 слоев фильтровальной бумаги размером 6×12 см. С их помощью соединяют поверхность агарозы с трис-боратным буферным раствором. Расстояние от края мостика до лунок должно быть не менее 15 мм. В лунки последовательно вносят по 15 мкл раствора СО Ви-антигена с концентрацией 5; 10; 15; 20 мкг/мл для построения калибровочного графика и испытуемый образец вакцины, предварительно разведенный в 5 раз. Проводят электрофорез при напряжении 180 –200 В при постоянной силе

тока 10 мА в течение 4 ч. Каждую пробу вносят в 2 лунки. Время от начала нанесения образцов до включения прибора не должно превышать 10 мин. Пластинку переносят в кювету с 0,9 % раствором натрия хлорида и выдерживают 15 – 20 ч при температуре 18 – 20 °С для отмывания от сыворотки. После этого пластинку вынимают, накрывают фильтровальной бумагой, прокалывают бумагу иглой над лунками и сушат на воздухе при температуре 18 – 20 °С. После высушивания геля агарозы пластинку с гелем переносят в кювету с красителем на 20– 25 мин, а затем в кювету с раствором для обесцвечивания окрашенных гелей на 15–20 мин, далее промывают в водопроводной воде и сушат при температуре 18 – 20 °С.

По окончании процедуры измеряют высоту пика (h) от края лунки до внешнего края пика. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрации Ви-антигена, а по оси ординат – высоту пика («ракеты») СО. По калибровочной кривой находят концентрацию Ви-антигена в испытуемом образце с учетом предварительного разведения. Содержание Ви-антигена (X) в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 100}{50},$$

где: С – концентрация Ви-антигена в испытуемом образце, найденная по калибровочному графику, с учетом предварительного разведения, мкг/мл;

50 – среднее номинальное значение содержания Ви-антигена в 1 мл анализируемой вакцины, мкг/мл.

Построение калибровочного графика. СО Ви-антигена разводят, исходя из аттестованного значения, до концентрации 20 мкг/мл в соответствии с инструкцией по применению. К 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 мл прибавляют воду очищенную до конечного объема 0,4 мл (концентрация Ви-антигена в полученных растворах 5; 10; 15; 20 мкг/мл соответственно). В пробирку, содержащую 0,4 мл раствора СО, воду очищенную не добавляют. Растворы используют свежеприготовленными.

Примечания.

1. Приготовление испытуемого раствора. Испытуемый образец анализируемой вакцины разводят в 5 раз. Для этого к содержимому ампулы добавляют 2,0 мл трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, рН 8,6 – 8,8 (раствор 3). Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

2. Приготовление концентрированного трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, рН 8,6 – 8,8 (раствор 1). В мерной колбе вместимостью 1000 мл последовательно растворяют в воде очищенной 60,5 г трис(гидроксиэтил)аминометана, 6,0 г натрия эдетата (трилон Б), 19,0 г борной кислоты, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

3. Приготовление электродного разведенного трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, рН 8,6 – 8,8 (раствор 2). В мерную посуду вместимостью 2,0 л помещают 320 мл концентрированного трис-боратного буферного раствора, прибавляют 1280 мл воды очищенной и перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

4. Приготовление разведенного трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, рН 8,6 – 8,8 (раствор 3). В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 20,0 мл концентрированного трис-боратного буферного раствора (раствор 1), доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

5. Приготовление 1 % геля агарозы. В колбу вместимостью 250 мл помещают 2 г агарозы и растворяют в 198 мл 0,5-кратного трис-боратного буферного раствора и перемешивают. Колбу помещают в кипящую водяную баню, прикрыв горлышко ватно-марлевой пробкой, и выдерживают при постоянном перемешивании до полного расплавления агарозы (раствор становится прозрачным, без пузырьков воздуха) в течение 1,5–2 ч. Разливают полученную смесь по 16 мл в стеклянные химические пробирки вместимостью 20 мл, пробирки выдерживают до полного застывания геля 1,0–1,5 ч при комнатной температуре. Укупоренные пробирки хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 12 мес.

6. Приготовление красителя кумасси R. К 2 г кислотного синего 83 (кумасси бриллиантовый синий R250), помещенного в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 180 мл 96 % этилового спирта, 180 мл воды очищенной, 40 мл уксусной кислоты ледяной и перемешивают. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 12 мес.

7. Приготовление раствора для отмывки красителя. В колбу или градуированный стакан или цилиндр вместимостью 1 л помещают 450 мл 96 % этилового спирта, 100 мл уксусной кислоты ледяной, 450 мл воды

очищенной и перемешивают. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение – 12 мес.

Фенол. Не более 0,75 мг/доза. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Имунобиологические лекарственные препараты». На вторичную упаковку наносится предупредительная надпись: «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений».

Транспортирование. При температуре от 2 до 25 °С, допускается транспортирование при температуре 35 °С не более 14 сут.

Хранение. При температуре от 2 до 8 °С.