

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вакцина сибиреязвенная

ФС.3.3.1.0016.15

живая

Взамен ГФ X, ст. 713

ФС 42-3269-96

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину сибиреязвенную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения, представляющую собой лиофилизированную в стабилизирующей среде взвесь живых спор вакцинного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1.

Вакцина предназначена для профилактики сибирской язвы и обеспечивает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и генетические свойства; должен обладать остаточной вирулентностью для морских свинок (при введении 50 млн спор) и белых мышей (10 млн спор), должен вызывать гибель 50 – 70 % животных; быть специфически безопасным для кроликов при введении им 250 млн спор; индекс иммунитета для морских свинок должен быть не ниже 10000.

Перед приготовлением очередной серии вакцинного штамма проводят его анимализацию путем пассажа через организм морской свинки с последующим отбором типичных колоний, выросших на плотной питательной среде при посеве селезенки.

Технология производства вакцины сибиреязвенной живой состоит из получения посевной культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1; глубинного культивирования штамма *B. anthracis* СТИ-1 для получения нативной споровой культуры; приготовления концентрированной споровой взвеси с последующим розливом, замораживанием, сублимационным высушиванием, герметизацией и упаковкой препарата. В качестве вспомогательного вещества используют сахарозу, разрешенную для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов.

На стадиях приготовления посевной и нативных культур контролируют рН, концентрацию спор, спорообразование, отсутствие посторонней микрофлоры.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса серовато-белого или желтовато-белого цвета с коричневатым оттенком.

Подлинность. Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1. Определение проводят при микроскопии мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену. В мазках из препарата должны наблюдаться овальные споры розового цвета с красным ободком по периферии.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 5 мин в 1 мл воды очищенной или в 1 мл 30 % водного раствора глицерола при встряхивании. Восстановленный препарат – непрозрачная гомогенная суспензия серовато-белого или желтовато-белого цвета без посторонних включений. Определение проводят визуально.

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Размер частиц. Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

pH. От 6,8 до 8,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют содержимое 5 ампул (флаконов) препарата, разведенного в 30 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH ($7,1 \pm 0,1$).

Средняя масса и отклонения от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах (флаконах) должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» с использованием тиогликолевой среды.

Содержимое ампулы (флакона) ресуспендируют в 2 – 3 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. По 1 мл восстановленной вакцины и отдельно – использованного растворителя засевают в 2 пробирки с 20 мл тиогликолевой среды в каждой. Посевы инкубируют в течение 5 – 7 сут по одной пробирке из каждого образца при температуре (36 ± 1) °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов и по одной пробирке при температуре 20 – 22 °С для выявления грибов.

Через 5 – 7 сут из каждой пробирки производят пересев по 0,5 мл в 2 пробирки, содержащие по 10 мл тиогликолевой среды, и инкубируют при указанных выше температурах. Через 14 сут выращивания со дня первичного посева из всех пробирок делают мазки, окрашивают их по Граму, просматривают под микроскопом при увеличении $K 7 \times 40$.

Клетки сибиреязвенного микроба представляют собой неокрашенные споры и грамположительные палочки, различающиеся по размерам (мелкие,

средние и крупные) и по форме (продолговатые или раздутые), расположенные поодиночке или в виде коротких и длинных цепочек.

В случае обнаружения хотя бы в одном из 10 просмотренных полей зрения грамотрицательной микрофлоры или грамположительных кокков препарат считается загрязненным посторонней микрофлорой. Если в повторном испытании результат будет таким же, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Испытание проводят на 2 кроликах массой 2 – 2,5 кг. Животных взвешивают и измеряют температуру в течение 3 сут и за 30 мин до проведения испытания.

Вакцину вводят подкожно в область внутренней поверхности бедра в дозе 250 млн спор в объеме 1 мл. Наблюдение проводят в течение 10 сут. Вакцина не должна вызывать гибель животных и на месте введения не должен развиваться некроз или инфильтрат. Допускается потеря массы тела животного до 10 % от исходной величины в течение первых 8 сут и повышение температуры тела не более чем на 1 °С на 1 – 2 сут после введения вакцины.

При несоблюдении указанных требований проводят повторный контроль на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле результат будет таким же, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая активность

1. Общая концентрация спор. Общая концентрация (ОК) спор в зависимости от содержания в ампуле (флаконе) человеческих доз должна составлять 8 – 12 млрд спор/мл или 4 – 6 млрд спор/мл. Концентрацию спор определяют методом подсчета в камере Горяева. Содержимое ампулы (флакона) с вакциной ресуспендируют в 1 мл воды очищенной и делают последовательные десятикратные разведения в воде очищенной до

исчезновения в последней пробирке отчетливо видимой мутности. Взвесью спор из этого разведения заполняют камеру Горяева и через 5 – 10 мин с помощью микроскопа с фазово-контрастным устройством (объектив 40×, окуляр 7×) подсчитывают количество спор в 10 больших квадратах сетки. Число спор (ОК) в 1 ампуле (1 мл) исходной вакцины определяют по формуле:

$$\text{ОК} = 25000 \cdot n \cdot p,$$

где n – количество спор в 10 больших квадратах;

p – кратность разведения;

25000 – постоянная величина для камеры данного типа.

2. *Количество живых спор.* Количество живых спор должно составлять не менее 40 % от общей концентрации.

В исследованиях используют агар Хоттингера – аминный азот (230 ± 10) мг %, рН ($7,2 \pm 0,1$) – или мясопептонный агар (МПА), рН ($7,2 \pm 0,1$).

При определении содержания живых микробных клеток в вакцине используют концевые химически чистые пипетки и пробирки со стерильной водой очищенной.

Содержимое каждой из 3 ампул ресуспендируют в 1 мл стерильной воды очищенной, встряхивают до образования гомогенной взвеси. Содержимое каждой ампулы с помощью стерильных пипеток переносят в 3 стерильные колбы вместимостью 250 мл с 99 мл воды очищенной и фарфоровыми или стеклянными бусами и закрывают ватно-марлевыми пробками. Колбы помещают на шуттель-аппарат и выдерживают в течение 30 мин при температуре (20 ± 2) °С и скорости 50 покачиваний в минуту.

Исходя из общей концентрации спор, определенной в камере Горяева, взвесь спор десятикратно разводят водой очищенной до содержания примерно 1000 спор в 1 мл. Например, из взвеси спор, разведенной в колбе в 100 раз, делают 5 последовательных десятикратных разведений, используя

для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл, и получают последнее разведение 10^{-7} , в котором будет содержаться 1000 спор/мл.

Из разведения, содержащего около 1000 спор в 1 мл, высевают по 0,1 мл на 5 чашек Петри с питательной средой, равномерно распределяя материал на поверхности среды стеклянным шпателем или методом покачивания. Чашки переворачивают и инкубируют при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 – 36 ч, после чего подсчитывают количество выросших колоний на каждой чашке Петри.

Расчет концентрации живых спор (БК), выраженное количеством спор в 1 мл вакцины, проводят по формуле:

$$\text{БК} = \frac{2 \cdot n \cdot p}{3},$$

где 2 – коэффициент пересчета на 1 мл пробы;

n – общее количество колоний, выросших на 15 чашках при высевае 0,5 мл каждой из 3 исследуемых проб;

p – кратность разведения.

Процентное содержание живых спор вычисляют по формуле:

$$\% \text{ живых спор} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \cdot 100 \%.$$

3. *Иммуногенность для морских свинок.* Индекс иммунитета должен быть не менее 10000 (отношение величины LD_{50} заражающего тест-штамма *B. anthracis* 71/12 для иммунизированных животных к величине LD_{50} для неиммунизированных животных).

Иммунизируют испытуемой вакциной 20 морских свинок обоего пола массой (275 ± 25) г однократно подкожно в область внутренней поверхности бедра в дозе 50 млн спор в объеме 0,5 мл. Одновременно 20 контрольным морским свинкам вводят по 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Через 21 сут иммунизированных и неиммунизированных животных подкожно инфицируют тест-штабмом *B. anthracis* 71/12. Для заражения иммунизированных животных используют дозы 10^6 ; 10^7 ; 10^8 и 10^9 ,

разведенные из общего количества спор; для неиммунизированных животных используют дозы 10^2 ; 10^3 ; 10^4 и 10^5 , также разведенные из общего количества спор тест-штамма. Каждую заражающую дозу вводят в объеме 0,5 мл 5 иммунизированным и 5 неиммунизированным морским свинкам. За животными наблюдают в течение 10 сут. Погибших животных вскрывают и делают посевы путем отпечатков верхушек сердца на чашки Петри с питательной средой. Сибиреязвенную инфекцию подтверждают в случае обнаружения роста, характерного для сибиреязвенного микроба. Затем рассчитывают величины LD_{50} заражающей тест-культуры для иммунизированных и неиммунизированных животных и определяют индекс иммунитета.

При значении индекса иммунитета менее 10000 опыт повторяют по той же методике в сравнении со стандартным образцом. Если при повторном контроле результат будет таким же, препарат считают не выдержавшим испытание.

Растворители, выпускаемые в комплекте с препаратом. 30 % раствор глицерола в воде для инъекций.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование в течение 20 сут при температуре не выше 25 °С.