

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вакцина сибирезвенная	ФС.3.3.1.0017.15
комбинированная	Взамен ГФ X, ст.713
	ФС 42-3297-96

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину сибирезвенную комбинированную, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения, представляющую собой лиофилизированную в стабилизирующей среде смесь взвеси живых спор вакцинного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1 и концентрированного протективного сибирезвенного антигена (ПА), адсорбированного на геле алюминия гидроксида.

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; должен 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 изготовления вакцины сибиреязвенной комбинированной состоит из получения посевной культуры *B. anthracis* СТИ-1; глубинного культивирования посевной культуры *B. anthracis* СТИ-1 для получения нативной споровой культуры; приготовления концентрированной споровой взвеси; приготовления концентрированного протективного антигена (ПА) методом сепарирования нативной культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1 с последующим концентрированием и стерилизующей фильтрацией на установках ультрафильтрации или методом микрофильтрации; сорбции концентрированного ПА на геле алюминия гидроксида; стабилизации сорбированного ПА формальдегидом с последующей отмывкой 0,9 % раствором натрия хлорида; смешивания сорбированного концентрированного ПА с концентратом споровой культуры *B. anthracis* СТИ-1 с последующим розливом, замораживанием, сублимационным высушиванием, герметизацией и упаковкой препарата. В качестве стабилизатора используется сахароза, разрешенная для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов.

На стадиях приготовления посевной и нативных культур контролируют рН, концентрацию спор, отсутствие посторонней микрофлоры. Качество ПА определяют по следующим показателям: стерильность, рН, содержание общего азота, алюминия гидроксида и формальдегида.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса серовато-белого цвета.

Восстановленный препарат – гомогенная суспензия серовато-бежевого цвета без посторонних примесей и включений.

Подлинность. Определение подлинности вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 проводят микроскопическим методом. В мазках, окрашенных по Цилю-Нильсену, должны наблюдаться овальные споры

розового цвета с красным ободком по периферии.

Определение подлинности ПА проводят методом иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони с иммуноглобулином противосибирезвенным лошадиным. Методика изложена в разделе «Специфическая активность».

Время растворения. Вакцина должна полностью растворяться течение 5 мин в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида при встряхивании.

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 7,1 до 7,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют содержимое 5 ампул (флаконов) препарата, разведенного в 25 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7,1 ± 0,1).

Средняя масса и отклонение 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 в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Общий азот. Не более 0,4 мг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение общего азота с реактивом Несслера в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Алюминия гидроксид. Не более 2,7 мг/мл алюминия (III). Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Формальдегид. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Полнота сорбции антигена. Надосадочная жидкость должна содержать не более 25 ЕА/мл (единиц активности в мл). Содержимое ампулы (флакона) ресуспендируют в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают и отделяют осадок центрифугированием при 2000 об/мин в течение 30 мин. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и разводят в 2; 4 и 8 раз 0,2 М фосфатным буферным раствором, рН ($7,2 \pm 0,1$). Определение полноты сорбции антигена проводят в реакции иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони с иммуноглобулином противосибиреязвенным лошадиным. Приготовление агара, постановку реакции и расчет результатов анализа проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Полноту сорбции оценивают по максимальному разведению супернатанта, при котором еще образуется видимая линия преципитации с иммуноглобулином противосибиреязвенным, и выражают в единицах активности, содержащихся в 1 мл (ЕА/мл).

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Определение проводят, в соответствии с ФС «Вакцина сибиреязвенная живая».

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Вакцину растворяют в 5 мл 0,9 % натрия хлорида для инъекций. Испытание проводят по методике, описанной в ФС «Вакцина сибиреязвенная живая». Животным вводят вакцину подкожно в область внутренней поверхности каждого бедра в объеме 1,25 мл (общий объем – 2,5 мл).

Специфическая активность

1. Количество живых спор. Процент живых спор на плотной питательной среде должен составлять не менее 30 от расчетной концентрации. В 1 мл препарата после ресуспендирования расчетная концентрация составляет (100 ± 20) млн спор *B. anthracis* СТИ-1.

В каждую из 3 ампул (флаконов) вносят 5 мл воды очищенной, встряхивают до образования гомогенной взвеси. Далее определение проводят по методике в соответствии с ФС «Вакцина сибиреязвенная живая».

2. *Активность (ПА)*. Активность ПА должна быть не менее 50 ЕА/мл.

Определение проводят методом иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони с иммуноглобулином противосибиреязвенным лошадиным. Для приготовления агара к 1 л 0,1 М фосфатного буферного раствора, рН (7,8 ± 0,1) добавляют 1 % агара, 1 % желатина и 0,25 % раствор фенола. Агар стерилизуют 15 мин при температуре (115 ± 2) °С и в горячем виде осветляют центрифугированием при 2000 об/мин в течение 5 мин. Готовый агар разливают в чашки Петри, помещенные на строго горизонтальную поверхность, слоем толщиной 6 мм. Стерильным штампом-пробойником вырезают 1 центральную и 6 радиальных лунок, расстояние между центрами которых составляет 10 мм (можно выполнять этот этап по трафарету). Агар из лунок удаляют.

Вакцину последовательно разводят 0,2 М фосфатным буферным раствором, рН (7,2 ± 0,1), до разведений 1:2; 1:4; 1:6; 1:8. В центральную лунку вносят 0,04 мл цельного иммуноглобулина противосибиреязвенного лошадиного, а в радиальные лунки по часовой стрелке – все разведения вакцины, начиная с цельного неразведенного препарата. Чашки помещают в эксикатор, содержащий воду очищенную, при температуре (19 ± 1) °С в течение 3 сут. Предварительный учет результатов проводят через 24 ч, окончательный – на 3 сут.

Активность ПА оценивают по максимальному разведению вакцины, при котором образуется видимая линия преципитации с иммуноглобулином противосибиреязвенным, и выражают в единицах активности (ЕА/мл).

Расчет ПА (*A*) в ЕА/мл проводят по формуле:

$$A = \frac{T}{V},$$

где: T – разведение вакцины, при котором наблюдается видимая линия преципитации;

V – объем пробы, внесенный в лунку, мл.

3. *Иммуногенность для морских свинок.* Индекс иммунитета должен быть не менее 25000 (отношение величины LD_{50} заражающего тест-штамма *B. anthracis* 71/12 для иммунизированных животных к величине LD_{50} для неиммунизированных животных). В 4 образца с вакциной вносят по 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций, встряхивают до образования гомогенной взвеси. Иммунизирующую дозу в объеме 0,5 мл вводят морским свинкам подкожно в область внутренней поверхности бедра. Далее определение проводят в соответствии с ФС «Вакцина сибирезвенная живая».

4. *Иммуногенность для кроликов.* Препарат должен предохранять от гибели не менее 8 из 10 кроликов, привитых подкожно одной человеческой дозой вакцины, при подкожном инфицировании 100 LD_{50} вирулентного штамма сибирезвенного микроба.

Испытание проводят на кроликах обоего пола массой $(2,25 \pm 0,25)$ кг. Животных иммунизируют однократно подкожно в область внутренней поверхности бедра в объеме 0,5 мл (одна человеческая доза вакцины). Одновременно 3 контрольным кроликам вводят по 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида.

Для определения LD_{50} тест-культуры *B. anthracis* Ч-7 интактных кроликов инфицируют дозами 10^1 ; 10^2 ; 10^3 и 10^4 спор. Каждую дозу вводят не менее чем 3 кроликам подкожно в паховую область задней конечности в объеме 1 мл. Наблюдение за животными проводят в течение 10 сут. Рассчитывают LD_{50} по методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина.

Через 10 сут кроликов (10 иммунизированных и 3 контрольных – неиммунизированных) заражают 100 LD_{50} споровой культуры *B. anthracis* Ч-7. Наблюдение за животными проводят в течение 10 сут. Погибших животных вскрывают и делают посев 0,1 мл крови из сердца на чашки Петри

с агаром Хоттингера, рН ($7,2 \pm 0,1$). Сибирязвенную инфекцию подтверждают в случае обнаружения роста, характерного для сибирязвенного микроба. Зараженные контрольные (неиммунизированные) кролики должны погибнуть в течение 3 сут.

Растворители, выпускаемые в комплекте с препаратом. 0,9 % раствор натрия хлорида.

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

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8°C.