

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вакцина туляремийная живая

ФС.3.3.1.0019.15

Взамен ГФ X, ст. 716

ФС 42-3178-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину туляремийную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения, представляющую собой живую культуру вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, лиофилизированную в стабилизирующей среде.

Вакцина предназначена для профилактики туляремии и обеспечивает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 5 лет.

ПРОИЗВОДСТВО

Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и антигенные свойства; остаточная вирулентность (LD_{50}) вакцинного штамма для белых мышей массой (19 ± 1) г должна находиться в пределах от 10^2 до $2 \cdot 10^6$ живых микробных клеток (м.к.); штамм не должен вызывать гибель морской свинки при введении дозы, равной $5 \cdot 10^9$ м.к; при накожной иммунизации морских свинок дозами $5 \cdot 10^6$ и $5 \cdot 10^7$ м.к. должен вызывать появление инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм; при определении иммуногенности показатель ED_{50} для морских свинок должен быть не более 1000 микробных клеток.

Перед приготовлением производственной культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводят его пассаж через организм морской свинки с последующим отбором типичных иммуногенных (белых) колоний, образующихся на плотной питательной среде при посеве селезенки и регионарных лимфатических узлов.

Технология производства вакцины предусматривает получение посевных культур I, II и III генераций штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ; процесс накопления биомассы, необходимой для приготовления микробной взвеси определенной концентрации; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание; герметизацию и упаковку препарата. На стадиях приготовления посевных культур определяют pH, концентрацию микробных клеток, отсутствие посторонней микрофлоры.

В качестве стабилизаторов используются вещества, разрешенные для производства иммунобиологических лекарственных препаратов: сахароза, натрия глутамат, тиомочевина, желатин.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета.

Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Определение проводят иммунофлуоресцентным методом с использованием иммуноглобулинов туляремиальных диагностических флуоресцирующих в соответствии с инструкцией по применению. В мазках из препарата должно наблюдаться специфическое ярко-зеленое свечение по периферии микробных клеток.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении 1 мл воды для инъекций 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 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют 20 ампул, содержимое каждой ампулы растворяют в 1 мл воды для инъекций.

Потеря в массе при высушивании. Не более 4,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». Для испытания используют 6 образцов.

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

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Препарат должен представлять чистую живую культуру вакцинного штамма туляремиального микроба. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» с использованием тиогликолевой среды.

За один образец принимают содержимое двух ампул препарата. В ампулы вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают и по 1 мл каждого образца высевают в 2 пробирки, содержащие по 20 мл тиогликолевой среды. Одну пробирку из каждого образца инкубируют при температуре от 30 до 35 °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов, другую – при температуре от 20 до 25 °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 и микроскопируют при увеличении 90×10 .

В случае обнаружения хотя бы в одном из 10 просмотренных полей зрения грамположительных кокков или палочек препарат считается загрязненным посторонней микрофлорой.

При выявлении в мазках грамотрицательных палочек, отличающихся по морфологии от туляремиальных бактерий, из этого образца готовят 3 мазка, которые обрабатывают иммуноглобулинами туляремиальными диагностическими флуоресцирующими, и просматривают в каждой мазке не менее 10 полей с помощью люминесцентного микроскопа. Если не все бактерии, обнаруживаемые в препарате, специфически окрашиваются ярко-зеленым свечением по периферии микробных клеток - препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной и не вызывать гибель более одной морской свинки из 3.

Вакцина, введенная 3 морским свинкам массой (475 ± 25) г в объеме 1 мл подкожно в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к., полученной в соответствии со стандартным образцом (СО) мутности (10 МЕ), эквивалентным $5 \cdot 10^9$ м.к./мл туляремиальных бактерий, не должна вызывать гибель животных в течение 15 сут наблюдения. В месте введения возможен некроз тканей кожи и подкожной клетчатки.

В случае, если животные остаются живыми или наступает гибель одной морской свинки, препарат считают безопасным. В случае гибели 2 и более животных испытание повторяют на их удвоенном количестве. Если при повторном контроле наблюдается гибель аналогичного количества животных, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая активность

1. *Концентрация микробных клеток.* В препарате должно содержаться $(2 \pm 1) \cdot 10^{10}$ м.к. в 1 мл. Колебания результатов определений в

отдельных ампулах серии не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Определение проводят в трех образцах (один образец – содержимое двух ампул). В две ампулы с вакциной вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, рН (7 – 7,2), и после получения гомогенной суспензии объединяют содержимое ампул. Из каждого образца 0,5 мл суспензии используют для определения концентрации микробных клеток в 1 мл вакцины. Для этого по 0,5 мл каждого образца вакцины вносят в отдельные стандартные пробирки и добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида до соответствия СО мутности (10 МЕ).

Концентрацию микробных клеток (ОК) определяют по формуле:

$$\text{ОК} = \frac{(0,5 + V) \cdot 5 \cdot 10^9}{0,5},$$

где: V – объём 0,9 % раствора натрия хлорида, взятого на разведение пробы, мл;

0,5 – объём испытуемого образца, мл;

$5 \cdot 10^9$ – эквивалент туляремийного микроба, соответствующий СО мутности (10 МЕ), м.к./мл.

2. *Количество живых микробных клеток.* Количество живых микробных клеток должно составлять не менее 40 % от общего количества микробных клеток. Колебания результатов определений в образцах серии не должны превышать 20 % от средней арифметической величины.

При определении содержания живых микробных клеток в вакцине используют концевые химически чистые пипетки и пробирки с 0,9 % раствором натрия хлорида, охлажденные до температуры от 2 до 8 °С.

Для определения количества живых микробных клеток из приготовленных ранее образцов взвесей вакцины делают последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} (к 0,5 мл вакцины добавляют 4,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида) до 10^{-7} , используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Из последнего разведения по 0,1 мл взвеси отдельно для каждого образца высевают на 3 чашки Петри с

отконтролируемыми рыбно-дрожжевым питательным агаром с добавлением цистеина и глюкозы или ϵ питательной средой для выделения и культивирования туляремийного микроба (FT-агар).

Учет результатов определения количества живых клеток в вакцине проводят через 5 сут выдерживания посевов при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

За количество живых микробных клеток принимают среднюю арифметическую определений количества выросших колоний в 3 образцах. Полученную величину умножают на степень разведения культуры (10^{-7}) и увеличивают в 10 раз (для контроля используют 0,1 мл вакцины), получая количество живых туляремийных микробов, содержащихся в 1 мл вакцины.

Содержание живых микробных клеток в процентах (% живых м.к.) рассчитывают по формуле:

$$\% \text{ живых м. к.} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \cdot 100 \%,$$

где: БК – количество живых м.к. в 1 мл;

ОК – общая концентрация, м.к.

3. *Степень диссоциации.* Число SR иммуногенных «белых» колоний должно составлять не менее 80 % от общего количества выросших колоний.

Количество колоний определяют на тех же чашках Петри с посевами, на которых определяют содержание живых микробных клеток. После инкубации чашек Петри в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 5 сут их помещают на 24 ч в холодильник при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$. После этого подсчитывают число иммуногенных «белых» и неиммуногенных «серых» колоний и вычисляют их процентное соотношение.

4. *Количество накожных доз.* В ампуле должно содержаться от 15 до 50 накожных доз. Количество прививочных доз в ампуле устанавливается путем деления количества живых м.к. на $2 \cdot 10^8$ м.к., составляющих одну прививочную дозу.

5. *Прививаемость.* При накожной иммунизации морских свинок дозой $2 \cdot 10^7$ живых м.к. в объеме 0,1 мл у всех животных через 2 – 5 сут вокруг насечек должны образоваться инфильтрат и гиперемия диаметром от 5 до 15 мм.

В ампулу вносят воду для инъекций из расчета 0,1 мл на 1 накожную дозу. Полученную микробную взвесь разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в 10 раз до концентрации $2 \cdot 10^8$ живых м.к. в 1 мл и прививают 3 морских свинок массой (400 ± 25) г накожно методом скарификации в объеме 0,1 мл. На участок депилированной кожи, предварительно обработанной спиртом и эфиром (1:1), после испарения эфира наносят пипеткой 2 капли микробной взвеси на расстоянии 20 – 30 мм друг от друга. Через каждую каплю оспопрививательным пером делают по 2 параллельные некровоточащие насечки длиной 8 – 12 мм. Нанесенную на кожу взвесь тщательно втирают в течение 1 мин плоской стороной пера.

Если препарат не выдерживает испытание, контроль повторяют по той же методике на удвоенном количестве животных.

6. *Иммуногенность.* Не менее 8 из 10 морских свинок, привитых накожно дозой $2 \cdot 10^7$ живых м.к. в объеме 0,1 мл, должны быть предохранены от гибели при подкожном заражении 1000 Dcl (*Dosis certa letalis*) вирулентного штамма туляремиальных бактерий голарктической расы, 1 Dcl которого не должна превышать 5 м.к.

Иммунизируют 10 морских свинок массой (350 ± 50) г дозой $2 \cdot 10^7$ м.к. в объеме 0,1 мл накожно скарификационным методом, как при определении прививаемости.

Через 25 – 30 сут после иммунизации проводят заражение иммунизированных животных дозой 1000 Dcl, а 3 неиммунизированных (контрольных) животных заражают 1 Dcl вирулентного штамма *F. tularensis*. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 30 сут.

Все контрольные животные должны погибнуть от туляремии в срок до 15 сут. У них должны наблюдаться типичные патологоанатомические

изменения (плотный инфильтрат на месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение селезенки и печени). Всех павших животных вскрывают, органы и ткани высевают методом отпечатков на чашки Петри с рыбно-дрожжевым агаром с добавлением цистеина и глюкозы или FT-агаром с добавлением 5 % крови.

В случае гибели более 2 свинок из 10 иммунизированных и всех зараженных животных испытание повторяют по той же методике в сравнении со стандартным образцом вакцины туляремийной живой.

Если при повторном контроле погибли более 2 свинок из 10 иммунизированных и зараженных, а для стандартного образца эти показатели остались в пределах нормы – данную серию считают не выдержавшей испытание.

Термостабильность. Не менее 7 сут. Показатель термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50 % живых микробных клеток по отношению к первоначальному количеству) определяют в 3 образцах после хранения вакцины при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 14 сут.

Методика определения количества живых микробных клеток изложена в разделе «Специфическая активность».

Показатель термостабильности (t) в сут рассчитывают по формуле:

$$t = \frac{0,3 \cdot 14}{\lg A_0 - \lg A_n},$$

где $\lg A_0$ – логарифм первоначального количества живых м.к./мл;

$\lg A_n$ – логарифм количества живых м.к./мл через 14 сут хранения вакцины при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;

0,3 – постоянная величина;

14 – срок хранения вакцины при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, сут.

Растворители, выпускаемые в комплекте с вакциной. Вода для инъекций в ампулах по 5 мл.

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

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$.