

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вакцина холерная бивалентная	ФС.3.3.1.0020.15
химическая, таблетки,	
покрытые кишечнорастворимой	Взамен ГФ X, ст.719
оболочкой	ФС 42-426 ВС-94

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину холерную бивалентную химическую, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, которая представляет собой смесь холерогена-анатоксина и О-антигена, полученных из инактивированных штаммов классического биовара 569 В *V. cholerae* O1, серовара Инаба и М-41 серовара Огава.

Вакцина предназначена для профилактики холеры и вызывает развитие специфического иммунитета длительностью до 6 мес.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства вакцины используют штаммы *V. cholerae* O1 – гиперпродуценты холерного экзотоксина (холерогена), несущие гены, ответственные за синтез холерного токсина (ctx А, В) и О-антигена. Производственные штаммы *V. cholerae* O1 должны, иметь типичные культурально-морфологические, биохимические и антигенные свойства; обладать холерогенными, токсигенными и иммуногенными свойствами.

Технология производства вакцины холерной бивалентной химической предусматривает культивирование штаммов-продуцентов в жидких питательных средах (3 пассажа); инактивирование культур формалином; последующее выделение из полученной биомассы *V. cholerae* O1 сероваров

Инаба и Огава специфических фракций холерогена-анатоксина и О-антигенов; их очистка, концентрирование аммонием сернокислым; сублимационное высушивание; смешивание с разрешенными для использования в иммунобиологической промышленности наполнителями (сахароза, крахмал, тальк, кальция стеарат); таблетирование и покрытие таблеток кислотоустойчивой оболочкой из целлацефата (ацетилфталилцеллюлоза). В процессе производства вакцины проводят контроль чистоты и концентрации бактериальной культуры, контроль стерильности инаktivированной культуры, контроль диализа специфических фракций, контроль на отсутствие сульфат - ионов и ионов аммония.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетка – серовато-желтая компактная масса, покрытая светлой блестящей кислотоустойчивой оболочкой.

Подлинность. Одна таблетка должна содержать (100000 ± 20000) единиц связывания холерогена-анатоксина (ЕС) и иметь обратный показатель титра в РНГА О1-антигена штаммов *V. cholerae* не менее 2000 условных единиц. Методика определения изложена в разделе «Специфическая активность».

Распадаемость. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Средняя масса таблетки. От 0,285 до 0,315 г. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

рН растворенного препарата. От 6,7 до 7,4. Таблетку растворяют в 50 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %. На каждый из 2 параллельных анализов используют навеску из 3 измельченных таблеток. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при

высушивании».

Формальдегид. Не более 0,2 %. 2 таблетки предварительно растирают в ступке, добавляют 10 мл воды очищенной, перемешивают до получения суспензии, центрифугируют в течение 15 мин при 6000 об/мин. Отбирают 2 мл прозрачной надосадочной жидкости и доводят водой очищенной до 5 мл. Далее определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Микробиологическая чистота. В 1 таблетке допускается не более 1000 колоний непатогенных микроорганизмов. Вакцина не должна содержать патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

На испытание одного образца используют 5 таблеток. Определение проводят в соответствии с правилами асептики. Каждую таблетку берут пинцетом, ополаскивают стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида, рН ($7,2 \pm 0,1$), и помещают в фарфоровую ступку с пестиком, прикрытую марлевой салфеткой; вносят 20 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, тщательно растирают в течение 1 – 2 мин, переносят во флакон вместимостью 100 мл и перемешивают до образования гомогенной суспензии. По 0,2 мл суспензии высевают пипеткой на 10 чашек Петри с мясопептонным агаром (МПА), рН ($7,3 \pm 0,1$), на 5 чашек с МПА с добавлением 3 – 5 % дефибринированной бараньей крови и по 1 мл вносят во флакон с 50 мл 10 % желчного бульона, рН ($7,4 \pm 0,1$). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч. После инкубации по 0,2 мл из флакона с желчным бульоном высевают на 5 чашек с агаром Эндо и инкубируют в течение 48 ч при температуре (37 ± 1) °С.

Учет результатов. Подсчитывают число колоний, выросших на 10 чашках. Петри с МПА. Если при посеве на МПА выросло более 1000 колоний непатогенных микробов на 1 таблетку, препарат контролируют повторно на удвоенном количестве образцов. Если при повторном контроле число выросших колоний превысит 1000, серию вакцины бракуют.

Пример расчета: 5 таблеток одной серии восстановлены в 20 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, то есть 1 таблетка восстановлена в 4 мл; далее делают высев в объеме 0,2 мл на одну чашку Петри и, соответственно на 10 чашек Петри с МПА – 2 мл. Если сумма выросших колоний составляет 500, то на 1 таблетку приходится 1000 колоний непатогенных микробов.

Не допускается наличие колоний, дающих зону гемолиза, на МПА с дефибринированной бараньей кровью. На среде Эндо должны отсутствовать как бесцветные, так и красные с металлическим блеском колонии.

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксичной. Испытание проводят на беспородных белых мышах обоего пола массой (19 ± 1) г.

Соблюдая условия асептики, 2 таблетки от серии берут пинцетом, ополаскивают 0,9 % раствором натрия хлорида, помещают в фарфоровую ступку с пестиком, добавляют 160 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно растирают таблетки в течение 1 – 2 мин, содержимое переносят во флакон вместимостью 100 мл и тщательно перемешивают до образования гомогенной суспензии. Полученную суспензию в объеме 0,5 мл вводят подкожно в область спины вдоль позвоночника 10 животным. Животные должны оставаться живыми в течение 7 сут без видимых признаков заболевания. Масса каждого животного в день окончания наблюдения не должна быть меньше исходной. Если в течение периода наблюдения регистрируется гибель, уменьшение массы, заболевание, развитие некроза или абсцесса в месте введения хотя бы у 1 животного, испытание повторяют на удвоенном количестве белых мышей. Повторное испытание считается удовлетворительным, если препарат отвечает установленным требованиям.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть специфически безопасной.

Определение проводят на 2 кроликах массой $(2,75 \pm 0,25)$ кг со светлой кожей. За 24 ч до постановки испытания ножницами выстригают шерсть на

боковой поверхности тела размером 30×15 см, затем остатки шерсти удаляют кремом-депилятором.

Испытанию подлежит смесь из 3 таблеток. Таблетки пинцетом помещают в ступку и растирают в 75 мл 0,9 % раствора натрия хлорида до получения суспензии (разведение 1:25). Затем 1 мл суспензии вносят в пробирку, содержащую 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая разведение вакцины 1:250. Далее в ряд пробирок вносят по 1 мл этого разведения и добавляют 3; 5 и 7 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая разведения 1:1000; 1:1500 и 1:2000 соответственно. По 0,2 мл каждого разведения переносят в пробирки, добавляют к ним по 0,6 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая конечные разведения 1:4000; 1:6000; 1:8000, которые соответствуют 4000; 6000; 8000 ЕС анатоксина в 0,1 мл или соответственно 40 000; 60 000 и 80 000 ЕС/мл. Каждое разведение вводят 2 кроликам в объеме 0,1 мл внутрикожно на расстоянии 30 мм друг от друга, начиная с последнего разведения 1:8000.

Учет результатов проводят через 24 ч, измеряя размер папул линейкой. Вакцина специфически безопасна, если при внутрикожном введении в разведении не более 1:6000 (60000 ЕС/мл) не образуются или образуются папулы диаметром до 10 мм. Если размер папул хотя бы у 1 кролика больше 10 мм, испытание повторяют на том же количестве животных. Если при введении вакцины в разведении 1:8000 наблюдаются папулы диаметром 5 мм и более, серию вакцины бракуют.

Специфическая активность

1. Антигенная активность по анатоксинсвязыванию. Одна таблетка должна содержать (100000 ± 20000) единиц связывания анатоксина (ЕС). Испытание проводят на 2 кроликах массой $(2,75 \pm 0,25)$ кг со светлой кожей. Подготовка боковой поверхности кожи кролика изложена в разделе «Специфическая безопасность». В испытании используют стандартные

образцы (СО) холерного тест-токсина сухого (далее тест-токсин) и сыворотки антихолерогенной сухой (далее сыворотка).

Разведение СО сыворотки антихолерогенной сухой. Содержимое ампулы СО сыворотки антихолерогенной сухой растворяют в 1 мл воды очищенной, переносят во флакон объемом 100 мл и разводят водой очищенной до получения разведения сыворотки 80 АЕ/мл.

Разведение СО холерного тест-токсина сухого. В ампулу СО холерного тест-токсина сухого вносят 1 мл воды очищенной, переносят во флакон объемом 100 мл и разводят водой очищенной до получения 20 опытных доз в 1 мл раствора.

Определение ЕС проводят в смеси из 3 таблеток. Таблетки растирают в ступке, добавляют 75 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и растворяют до получения гомогенной суспензии (разведение 1:25). Затем 1 мл переносят в пробирку и добавляют 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая разведение 1:250. Далее делают ряд последовательных разведений 1:1000; 1:1500; 1:2000; 1:2500; 1:3000 и 1:3500 в 0,9 % растворе натрия хлорида. По 0,2 мл каждого разведения переносят в пробирки и добавляют по 0,2 мл сыворотки, содержащей 80 АЕ/мл, получая разведения вакцины от 1:2000 до 1:7000. Пробирки выдерживают в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. После инкубации в каждую пробирку добавляют по 0,4 мл 20 опытных доз/мл тест-токсина, получая разведения от 1:4000 до 1:14000. Пробирки встряхивают и выдерживают при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. По 0,1 мл содержимого каждой пробирки вводят внутрикожно на расстоянии 30 мм 2 кроликам в депилированный участок кожи, начиная с разведения 1:14000.

Одновременно на тех же кроликах определяют 1 АЕ сыворотки. В ряде пробирок готовят разведения антитоксической сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида, содержащие 80; 60; 40; 30 и 20 АЕ в 1 мл. По 0,2 мл каждого разведения сыворотки переносят в пробирки и добавляют по 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и по 0,4 мл из разведения тест-токсина,

содержащего 20 опытных доз/мл, получая содержание в сыворотке 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5 АЕ. Пробирки выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 30 мин. После инкубации по 0,1 мл каждого разведения вводят внутривенно 2 кроликам, начиная с 2 АЕ (контрольный ряд).

Учет результатов. Учет результатов проводят через 24 ч. Положительной реакцией в опытных рядах при введении разведений 1:8000; 1:10000; 1:12000 считают зону отека диаметром от 5 до 10 мм. Размер папулы в опытном ряду должен быть равен размеру папулы в контрольном ряду, где 1 опытная доза тест-токсина связала 1 АЕ сыворотки.

Принимая во внимание значительные колебания индивидуальной чувствительности кожи кроликов, расчет антигенной активности по ЕС проводят по одному из 4 вариантов:

1 вариант – положительная реакция в контрольном ряду наблюдается с сывороткой 1; 0,75 и 0,5 АЕ и отсутствует в разведениях 2 и 1,5АЕ; следовательно, 1 опытная доза тест-токсина связала 1 АЕ сыворотки. Наибольшее разведение вакцины, при введении которой наблюдается положительная кожная реакция у 2 кроликов в опытном ряду, например, 1:8000, следовательно, в 0,1 мл вакцины содержится 8000 ЕС или 80000 ЕС в 1 мл (в 1 таблетке).

2 вариант – положительная реакция в контрольном ряду наблюдается в разведениях сыворотки 0,75 и 0,5 АЕ; следовательно, 1 опытная доза тест-токсина связала 1,25 АЕ (2 АЕ – 0,75 АЕ) сыворотки. Наибольшее разведение вакцины, при введении которого наблюдается положительная кожная реакция у 2 кроликов в опытном ряду, например, 1:8000. Так как токсин связал 1,25 АЕ, расчет количества ЕС в препарате проводят путем умножения $1,25 \cdot 8000$, следовательно, в 0,1 мл содержится 10000 ЕС или 100000 ЕС в 1 мл (в 1 таблетке).

3 вариант – положительная реакция в контрольном ряду наблюдается в разведениях сыворотки 1,5; 1; 0,75 и 0,5 АЕ и отсутствует только с

разведением 2 АЕ; следовательно, 1 опытная доза тест-токсина связала 0,5 АЕ (2 АЕ – 1,5 АЕ) сыворотки. Например, наибольшее разведение вакцины, при введении которой наблюдается положительная кожная реакция у 2 кроликов в опытном ряду, 1:8000. Так как токсин связал 0,5 АЕ, расчет количества ЕС в препарате проводят следующим образом: $0,5 \cdot 8000$, следовательно, в 0,1 мл содержится 4000 ЕС или 40000 ЕС в 1 мл (в 1 таблетке).

4 вариант – если положительная реакция в контрольном ряду наблюдается хотя бы у 1 кролика при разведении 0,5 АЕ или во всех разведениях сыворотки – 2; 1,5; 1; 0,75 и 0,5 АЕ, то учет результата не проводят и постановку испытания повторяют на 2 кроликах. Повторное испытание считается удовлетворительным, если препарат отвечает установленным требованиям по вариантам 1, 2 или 3.

2. **Содержание О-антигена.** Одна таблетка должна содержать не менее 2000 условных единиц О-антигена вакцинных штаммов *V. cholerae* O1 (обратный показатель титра в РНГА).

Для испытания используют 3 таблетки. Каждую таблетку тщательно растирают в отдельной ступке, добавляют 10 мл воды очищенной. Содержимое каждой ступки переносят в отдельные флаконы вместимостью 100 мл и оставляют для осаждения на 10 – 15 мин при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$. По 5 мл надосадочной жидкости из каждого флакона переносят в пробирки и добавляют по 2 капли 40 % раствора натрия гидроксида; выдерживают на водяной бане при температуре $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 2 мин, охлаждают водопроводной водой до температуры $(19 \pm 1) ^\circ\text{C}$ и добавляют пастеровской пипеткой по капле 0,5 % раствор розоловой кислоты до окрашивания растворов в ярко-розовый цвет. Далее в пробирки добавляют по каплям (2 – 4 капли) ледяную уксусную кислоту до перехода окрашивания растворов в желтый цвет. Затем по каплям (от 2 до 7 капель) вносят 10 % раствор натрия углекислого до появления бледно-розового окрашивания. Для

постановки реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА) каждую пробу вакцины дополнительно разводят 1:3 и 1:7. Для постановки РНГА используют неразведенную (цельную) пробу и полученные разведения.

Постановка РНГА (микрометод). Постановку РНГА проводят на 3 полистироловых планшетах с круглодонными лунками. В 8 лунок 6 рядов каждого планшета вносят по 0,025 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. В первые лунки каждого ряда вносят по 0,025 мл следующих образцов: в 1 – 2 ряды – цельной пробы, в 3 – 4 ряды – разведение 1:3, в 5 – 6 ряды – разведение 1:7; и делают последовательные двукратные разведения до восьмой лунки (из восьмой лунки 0,025 мл удаляют в емкость с дезинфицирующим раствором), получая разведения: в 1 – 2 рядах – от 1:2 до 1:256, в 3 – 4 рядах – от 1:6 до 1:768, в 5 – 6 рядах – от 1:14 до 1:1792. После этого в лунки всех рядов добавляют по 0,025 мл 50 % взвеси формализированных эритроцитов барана, разведенных в 50 раз. Содержимое лунок перемешивают покачиванием планшетов, оставляют на 15 мин при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ и затем во все лунки вносят по 0,05 мл сыворотки холерной О1 агглютинирующей адсорбированной в разведении 1:2. Планшеты оставляют при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 24 ч.

Постановка контроля формализированных эритроцитов барана. В контрольную лунку вносят 0,025 мл взвеси разведенных в 50 раз эритроцитов барана и добавляют 0,075 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Учет результатов РНГА. Результат считают положительным при наличии гемагглютинации (эритроциты выпадают на дно лунки равномерным слоем в виде «зонтика», занимая не менее $\frac{2}{3}$ сферической поверхности лунки; в ряде случаев может наблюдаться фестончатое оплывание краев агглютината).

Результат считают отрицательным при отсутствии гемагглютинации (эритроциты выпадают на дно лунки в виде темно-коричневой полусферы

или узкого колечка с ровным краем – «пуговики»). В контрольных лунках результат должен быть отрицательным.

Последние лунки ряда, в которых наблюдается положительная гемагглютинация, учитывают как показатели титров в РНГА, определяющие разведения вакцины. Рассчитывают среднее арифметическое значение обратных показателей титров в РНГА 3 разведений (в 2 повторностях) и умножают на 10 (разведение таблетки). Обратная величина титра РНГА соответствует содержанию О1-антигена вакцинных штаммов *V. cholerae* в условных единицах в 1 таблетке. Колебания результатов обратных показателей титров в РНГА в таблетках не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Иммуногенность. ED₅₀ должна быть не более 1/20000 части таблетки. Для испытания используют 2 таблетки, которые растирают в стерильной ступке и добавляют 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (в 0,5 мл – 1/10 часть таблетки). Затем делают десятикратные последовательные разведения в 0,9 % растворе натрия хлорида, получая в 0,5 мл от 1/100 до 1/1000 части таблетки. После чего делают последовательные пятикратные разведения в 0,9 % растворе натрия хлорида, содержащие в 0,5 мл от 1/5000 до 1/125000 части таблетки. Таким образом, получают 4 иммунизирующие дозы, содержащие 1/1000, 1/5000, 1/25000 и 1/125000 часть таблетки в объеме 0,5 мл каждая. Каждую дозу вводят в объеме 0,5 мл однократно внутрибрюшинно 16 беспородным белым мышам обоего пола массой (11 ± 1) г.

Через (13 ± 1) сут по 8 иммунизированных животных заражают дозой 300 LD₅₀ (допускается доза от 50 до 500 LD₅₀) внутрибрюшинно взвесью 3 – 4-часовых агаровых культур *V. cholerae* О1 биовара Эльтор, серовара Инаба и *V. cholerae* О1 биовара Эльтор, серовара Огава в объеме 0,5 мл.

Подготовка штаммов для заражения описана в нормативной документации производителя. Для контроля берут по 10 белых мышей на

каждый штамм для заражения, вводят им ту же дозу LD_{50} , что и иммунизированным животным.

Учет результатов. Наблюдение за животными ведут в течение 3 сут. В группах иммунизированных и заражённых животных для определения ED_{50} подсчитывают количество выживших. В группе зараженных белых мышей для определения 1 LD_{50} подсчитывают количество павших животных. В контрольной группе животных, зараженных 300 LD_{50} , допустимо выживание от 1 до 3 белых мышей для каждого штамма.

По методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина подсчитывают ED_{50} и LD_{50} для каждого заражающего штамма. Если величина ED_{50} хотя бы одного из заражающих штаммов будет выше допустимого значения, контроль повторяют на том же количестве животных. Если при повторном испытании величина ED_{50} вновь превысит допустимый предел, серию бракуют.

Если при расчете величины заражающей дозы будет установлено, что она содержит менее 50 или более 500 LD_{50} , контроль повторяют на том же количестве животных. Если в контрольной группе животных, зараженных 300 LD_{50} , выживет более 3 белых мышей, контроль повторяют на том же количестве животных.

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

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