

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вакцина жёлтой лихорадки

ФС.3.3.1.0030.15

живая сухая, лиофилизат для

приготовления раствора

для подкожного введения

Взамен ФС 42-3686-98

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Вакцину жёлтой лихорадки живую сухую (лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения), представляющую собой лиофилизированную очищенную центрифугированием тонкоизмельченную ткань куриных эмбрионов, свободных от специфической патогенной микрофлоры (specific pathogen free – SPF), зараженных аттенуированным штаммом 17Д вируса желтой лихорадки.

Вакцина предназначена для профилактики желтой лихорадки.

Вакцина не содержит консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Для приготовления вакцины применяется культивирование вируса в куриных эмбрионах, свободных от специфической патогенной микрофлоры (SPF). Куриные эмбрионы должны быть получены из сертифицированных хозяйств.

Производство вакцины желтой лихорадки должно быть организовано при соблюдении условий установленных требований организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека. В соответствии с требованиями ВОЗ, должна строго выполняться система посевных серий, должно соблюдаться строгое ограничение количества пассажей вируса в

процессе приготовления вакцины (не более 2 пассажей от основного посевного вируса).

Для получения готовой лекарственной формы вакцины перед лиофилизацией в препарат добавляют (содержание расчётное) вспомогательные вещества, повышающие стабильность вакцины (стабилизаторы) при хранении и транспортировании в течение срока годности. Вспомогательные вещества поступают на производство с сертификатами качества и контролируются в соответствии с требованиями, предъявляемыми к ним нормативной документацией. Наименование и количество вспомогательных веществ (стабилизаторов) указывают в нормативной документации.

В состав препарата не должны вноситься в качестве стабилизатора альбумин человека или сыворотка крови человека.

Состав. Одна доза вакцины содержит: активный компонент – вирус желтой лихорадки, штамм 17Д - 1000LD₅₀ или 1600 БОЕ вируса, может содержать вспомогательные вещества (содержание расчётное) предусмотренные нормативной документацией.

Производственный штамм. Аттенуированный штамм 17Д вируса желтой лихорадки.

Первичная посевная серия № 213/77 в лиофилизированной форме предоставляется референс-лабораторией ВОЗ. Условия хранения при температуре минус 70 °С.

Вторичную посевную серию (рабочий посевной вирус) готовят из первичной посевной серии, которая представляет собой лиофилизированную суспензию тонкоизмельчённой ткани куриных эмбрионов, свободных от специфической патогенной микрофлоры. Вторичную посевную серию производственного штамма получают в условиях одного производственного цикла, т.е. однократного пассирования первичной посевной серии вируса.

Вторичная посевная серия штамма 17Д применяется непосредственно для получения вакцины, должна быть аттестована и соответствовать следующим требованиям:

- быть стерильной (не содержать бактерий, грибов, микоплазм, микобактерий туберкулеза и посторонних вирусных агентов);
- обладать специфической активностью, определяемой в одной из культур клеток: первично-трипсинизированных фибробластах эмбрионов кур (ФЭК), или перевиваемых линиях клеток – клетки почек эмбриона свиньи (PS), или клетки почек зеленой мартышки (*Vero*); или на лабораторных животных мышах линии Balb/c или CBA 4–6 недельного возраста, массой 10–12 г;
- титр вируса должен быть не менее 10000 LD₅₀/мл при испытании на мышах или 16000 БОЕ/мл при испытании в культуре клеток;
- должна быть подлинной, т.е. нейтрализоваться специфической иммунной сывороткой к вирулентному штамму «Дакар» вируса желтой лихорадки с индексом нейтрализации не менее 1,0 lg;
- должна быть специфически безопасной при заражении обезьян *Macaca mulatta* (макака резус) или *Macaca fascicularis* (макака циномольтус) или другого вида обезьян чувствительного к вирусу желтой лихорадки. Обезьяны не должны иметь в крови вируснейтрализующих антител к вирусу желтой лихорадки до введения посевного вируса.

Нейротропные, висцеротропные и иммуногенные свойства вторичного посевного вируса контролируют на группе не менее чем 10 обезьян. Параллельно на таком же количестве обезьян проводят испытания первичной посевной серии вируса, которая в данном случае используется в качестве препарата сравнения.

Испытуемая доза, содержащая не менее, чем 5000 LD₅₀ (8000 БОЕ) и не более, чем 50000 LD₅₀ (80000 БОЕ), вводится во фронтальную долю мозга

каждой обезьяне под анестезией. Обезьяны после заражения должны наблюдаться в течение 30 сут.

Нейровирулентность вторичной посевной серии вируса считается удовлетворительной при отсутствии статистически достоверных отличий в гистологической оценке изменений, вызванных у обезьян после введения в мозг вторичной посевной серии вируса, по сравнению с аналогичными показателями изменений вызванных первичной посевной серией вируса.

Вторичная посевная серия вируса штамма 17Д должна быть висцеротропной (вызывать вирусемию). Выявление вируса проводят в сыворотках обезьян на 2, 4 и 6 сут после заражения по методике, применяемой для теста «Специфическая активность».

Содержание вируса в 0,03 мл сыворотки обезьяны должно быть не менее 100 LD₅₀ (160 БОЕ) и не более 500 LD₅₀ (800 БОЕ).

Вторичная посевная серия вируса штамм 17Д должна быть иммуногенна для обезьян, т.е. вызывать образование вируснейтрализующих антител к штамму 17Д вируса желтой лихорадки не менее, чем у 90% обезьян в течение 30 сут после введения испытуемой дозы. Наличие вируснейтрализующих антител в сыворотках крови подопытных обезьян устанавливают в реакции нейтрализации вируса желтой лихорадки в культурах клеток.

Вторичная посевная серия должна быть не токсичной для мышей и морских свинок (раздел «Аномальная токсичность»).

При параллельном испытании препарата сравнения – первичной посевной серии должны быть получены аналогичные результаты.

При изготовлении новых вторичных посевных серий (рабочий посевной вирус) необходимо подтверждение генетической стабильности методом сиквенирования.

Производственный штамм – вторичный посевной вирус должен храниться в лиофилизированном виде при температуре минус 70 °С.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса светло-розового цвета, гигроскопична. Испытание проводят визуально.

Восстановленный препарат – опалесцирующая жидкость желтовато – розового цвета.

Подлинность. Аттenuированный вирус жёлтой лихорадки, штамм 17Д, содержащийся в вакцине, должен нейтрализоваться специфической иммунной сывороткой к штамму «Дакар» вируса жёлтой лихорадки. Индекс нейтрализации не менее 1,0 lg.

Определение проводят биологическим методом в реакции нейтрализации в одной из культур клеток: первично-трипсинизированные фибробласты эмбрионов кур (ФЭК); перевиваемой культуре клеток почек эмбрионов свиньи (PS); перевиваемой культуре клеток почек зеленой мартышки (*Vero*) или в реакции биологической нейтрализации на мышях линий Balb/c или CBA 4–6 недельного возраста массой 10–12 г (если в нормативной документации нет иных указаний).

Постановка реакции нейтрализации в культурах клеток

Приготовление смеси вируса вакцины и специфической иммунной сыворотки. Используют 2 ампулы вакцины. Содержимое ампул разводят в растворителе – вода для инъекций, содержащем 2 % сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре $56 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 мин (для исключения возможности присутствия ингибиторов вируса желтой лихорадки). Используют 0,5 мл растворителя на одну дозу вакцины. Восстановленную вакцину выдерживают при температуре от 18 до 25°C в течение 15 – 20 мин. Затем содержимое двух ампул объединяют и готовят последовательные разведения вакцины 1:5 и 1:50 в растворе натрия хлорида 0,9 %, содержащем 2 % сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре $56 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Каждое разведение вакцины в объёме 1,0 мл смешивают с равным объёмом рабочего

разведения иммунной кроличьей сыворотки к штамму «Дакар» вируса желтой лихорадки и не иммунной кроличьей сыворотки, получая, таким образом, конечные разведения вакцины 1:10 и 1:100.

Иммунная кроличья сыворотка к штамму «Дакар» вируса желтой лихорадки в рабочем разведении должна нейтрализовать 100 – 300 БОЕ в 0,1 мл вируса желтой лихорадки, штамм 17Д. В реакции нейтрализации необходимо использовать то же разведение неиммунной кроличьей сыворотки, что и иммунной.

Смеси вирус-сыворотка выдерживают при температуре 37 ± 1 °С в течение 1 ч.

Постановка реакции нейтрализации. Используют одну из указанных выше культур клеток.

Перед внесением на монослой культуры клеток смеси вирус-сыворотка, ростовую среду сливают и монослой промывают один раз раствором Эрла. Смесь вирус-сыворотка вносят в объёме 0,2 мл в каждые 3 флакона с ФЭК или в каждые 3 лунки планшетов с клетками PS или *Vero*.

Флаконы с ФЭК или планшеты с PS или *Vero* помещают в термостат при температуре 36 ± 1 °С на 2 ч., периодически обкатывают монослой клеток смесью вирус – сыворотка путем покачивания флаконов или планшетов через каждые 15 – 20 мин.

После адсорбции вируса, на клеточный монослой наносят питательный агар, пригодный для данной культуры клеток.

Учёт результатов. Учёт результатов проводят на 5 сут при титровании в культуре клеток ФЭК или PS, или на 6–7 сут при титровании вируса в культуре клеток *Vero*. Подсчитывают количество бляшек отдельно в каждой лунке или флаконе. Затем вычисляют среднее количество бляшек из 3 лунок планшета или 3 флаконов, соответственно для каждого разведения вируса. Титр вируса с иммунной и не иммунной сыворотками подсчитывают, как

описано в разделе «Специфическая активность» и выражают в десятичных логарифмах БОЕ (бляшкообразующих единиц).

Индекс нейтрализации (подлинность вируса желтой лихорадки) представляет собой разницу lg титров вируса с не иммунной сывороткой и иммунной сывороткой и должен быть не менее 1,0 lg.

Время растворения. Не более 5 мин при добавлении 0,5 мл растворителя (вода для инъекций) на одну дозу вакцины. Определение проводят визуально.

Цветность. Восстановленный препарат – жидкость желтовато-розового цвета. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Прозрачность. Восстановленный препарат – опалесцирующая жидкость желтовато-розового цвета. Оптическая плотность не более 0,6. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 3 мм. В качестве контроля используют воду.

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

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Белковый азот. Не более 0,25 мг/доза. Определение проводят колориметрическим методом с реактивом Нesslerа в соответствии с ОФС «Определение белкового азота с реактивом Нesslerа с предварительным осаждением белкового материала в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Овальбумин. Не более 5,0 мкг/ доза. Определение проводят методом ИФА в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Стерильность. Должна быть стерильной. Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Присутствие микоплазм. Не должна содержать микоплазм. Определение проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

Бактериальные эндотоксины. Не более 5 ЕЭ/доза. Определение проводят методом геле-тромб тест в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксична. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза: морским свинкам – 1 доза вакцины подкожно, белым мышам по 1 дозе вакцины внутрибрюшинно.

Специфическая активность. Должна содержать в одной дозе не менее 1600 БОЕ вируса или 1000 LD₅₀. Определение проводят биологическим методом.

Определяют титр вируса в одной из культур клеток: первично-трипсинизированных фибробластах эмбрионов кур (ФЭК); перевиваемой культуре клеток почек эмбрионов свиньи (PS); перевиваемой культуре клеток почек зеленой мартышки (*Vero*) или на мышах Balb/c или СВА 4–6 недельного возраста массой 10–12 г (если в нормативной документации нет других указаний).

Для титрования используют по 3 ампулы вакцины отдельно. Содержимое каждой ампулы растворяют в растворителе (вода для инъекций), содержащем 2 % сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре 56 ± 1 °С в течение 30 мин (для исключения возможности присутствия ингибиторов вируса желтой лихорадки). Используют по 0,5 мл растворителя на одну прививочную дозу.

Восстановленную вакцину выдерживают при температуре 18- 20 °С в течение 15 – 20 мин. Затем проводят титрование (раздел «Подлинность»).

Каждое испытание специфической активности вакцины желтой лихорадки должно проводиться с использованием стандартного образца (СО) вакцины желтой лихорадки, откалиброванного по Международному стандарту вакцины желтой лихорадки. Одну ампулу стандартного образца титруют три раза для подтверждения достоверности каждого количественного определения активности.

Определение специфической активности вакцины (титр в БОЕ).
Определение специфической активности (титр в БОЕ) вакцины проводят путем титрования вируса методом бляшек в культурах клеток ФЭК, PS или *Vero*.

Готовят последовательные разведения вакцины: 1:10; 1:100; 1:000; 1:10000 в 0,9 % растворе натрия хлорида с 2 % раствором сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре 56 ± 1 °С в течение 30 мин (для исключения возможности присутствия ингибиторов вируса желтой лихорадки). Каждое разведение в объёме 0,1 мл вносят в три флакона вместимостью 100,0 мл с полностью сформировавшимся монослоем клеток ФЭК или в три лунки 6-ти или 12-ти луночных планшетов с полностью сформировавшимся монослоем культур клеток *Vero* или PS.

Инфицированные клетки во флаконах или планшетах помещают на 2 ч в термостат при температуре 37 ± 1 °С. Через каждые 15–20 мин проводят «обкатывание» монослоя клеток вируссодержащей жидкостью путем покачивания флаконов или планшетов. По истечении периода адсорбции вируса в каждый флакон (или лунку планшета) наносят агаровое покрытие и инкубируют (раздел «Подлинность»).

Учёт результатов. Определение титра вируса желтой лихорадки проводят на 5 сут при титровании в культурах клеток ФЭК или PS, и на 6 -7 сут при титровании в культуре клеток *Vero*.

Подсчитывают количество бляшек отдельно в каждом флаконе (лунке), после чего определяют среднее количество бляшек для каждого разведения вируса и определяют концентрацию вируса в одной прививочной дозе вакцины (0,5 мл). Титр вируса (А) выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ/0,5 мл) и вычисляют по формуле:

$$A = \left[\frac{(X \cdot Y)}{0,1} \right] \cdot 0,5,$$

где: X – среднее количество бляшек из 3 флаконов или 3 лунок;

Y – разведение вакцины, мл;

0,1 – объём инокулята, внесенного в один флакон или одну лунку, мл;

0,5 – объём одной дозы вакцины, мл.

Титр вируса в СО желтой лихорадки должен соответствовать аттестационному значению.

Термостабильность. Титр вируса вакцины после прогревания при температуре от 36 до 38 °С в течение 2 недель не должен снижаться более, чем на 1,0 lg и должен быть не менее 1000 LD₅₀ или 1600 БОЕ в одной дозе.

Для испытания используется не менее 6 ампул вакцины от каждой испытуемой серии. 3 ампулы хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение 2 недель, 3 ампулы подвергают воздействию температуры 37 ± 1 °С в течение 2 недель. Затем проводят одновременное определение титра вируса во всех 6 ампулах в одной из культур клеток ФЭК, PS, *Vero* по методике, изложенной в разделе «Специфическая активность». Разница титра вакцины не прогретой и титра вакцины прогретой составляет показатель термостабильности препарата.

Упаковка и маркировка. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Дополнительная информация: На внешней упаковке (пачке с ампулами вакцины) указывают: «Стерильно», «Препарат не содержит консервантов и антибиотиков», «Хранить в недоступном для детей месте», «Для лечебно-

профилактических и санитарно-профилактических учреждений», «Для культивирования вируса используются куриные эмбрионы SPF – категории».

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