

## ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

**Вакцина полиомиелитная**

**ФС.3.3.1.0037.15**

**пероральная 1, 2, 3 типов,**

**раствор для приема внутрь**

**Взамен ФС (т) 42-0022-00**

---

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину полиомиелитную пероральную 1, 2, 3 типов, раствор для приема внутрь, предназначенную для профилактики полиомиелита.

Вакцина полиомиелитная пероральная типов 1, 2, 3, раствор для приема внутрь, представляет собой препарат из живых аттенуированных штаммов Сэйбина вируса полиомиелита: тип 1 (LSc 2ab), тип 2 (P712 Ch 2ab), тип 3 (Leon 12 a<sub>1</sub>b), выращенных на первичной культуре клеток почек африканских зеленых мартышек (КПЗМ) или на первичной культуре КПЗМ с одним пассажем на перевиваемой культуре клеток линии *Vero*. Вакцина может содержать 1 тип или любую комбинацию из 3 типов штаммов вируса Сэйбина и выпускаться в лекарственной форме, пригодной для приема внутрь.

Препарат предназначен для профилактики полиомиелита.

### ПРОИЗВОДСТВО

Производство основано на системе посевных серий вируса пероральной полиомиелитной вакцины и клеточных линий для размножения и определения активности вируса полиомиелита. Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблюдением установленных требований правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека.

## **Состав**

*Действующие вещества* (количество инфекционных единиц (ИЕ) вируса, выраженное в тканевых цитопатогенных дозах (ТЦД<sub>50</sub>)) - вирус полиомиелита, аттенуированные штаммы Сэйбина:

- тип 1 – не менее  $10^{6,0}$ ТЦД<sub>50</sub>;
- тип 2 – не менее  $10^{5,0}$ ТЦД<sub>50</sub>;
- тип 3 – не менее  $10^{5,5}$ ТЦД<sub>50</sub>.

*Вспомогательные вещества:*

- магния хлорид – стабилизатор;
- канамицин – антибиотик в качестве консерванта;
- гидролизат лактальбумина в растворе Эрла (рН 7,5) – среда.

## **Производственные штаммы**

Используются производственные штаммы Сэйбина вируса полиомиелита: тип 1-LSc 2ab, тип 2 – Р 712 ch 2ab, тип 3 – Leon 12 a<sub>1b</sub>. Рабочие посевные серии вируса полиомиелита используют для производства вакцины на первичной культуре КПЗМ или на первичной культуре КПЗМ с 1 пассажем на перевиваемой культуре клеток линии *Vero*. Рабочие посевные серии готовят из основных посевных вирусов с использованием не более 3 пассажей для вирусов типов 1, 2 и не более 2 пассажей для вируса типа 3. Основные (прототипные) штаммы предоставляются ВОЗ.

Основные и рабочие посевные серии должны быть стерильны, иметь титр не менее  $10^7$  ИЕ в 1 мл, быть типоспецифичны, иметь характеристику по генетическому маркеру rct/40, соответствующую аттенуированным штаммам, авирулентны.

Рабочие посевные вирусы должны проходить испытания на соответствие требованиям не реже, чем 1 раз в год по основным показателям: стерильность, специфическая активность, генетический признак rct/40.

Вакцина может выпускаться в виде монопрепаратов (тип 1; тип 2; тип 3). Требования, предъявляемые к моновакцине аналогичны требованиям к

вакцине полиомиелитной пероральной 1, 2, 3 типов, изложенным в настоящей фармакопейной статье.

*Стандартные образцы.* В качестве стандартных образцов для количественного определения вируса полиомиелита типов 1, 2, 3 используют стандартные образцы производства, аттестованные в соответствии со стандартами ВОЗ соответствующих типов. Стандартный образец должен использоваться в каждом испытании.

*Субстрат для культивирования вируса.* Субстратом для производства полиомиелитной вакцины являются клетки почек обезьян (*Cercopithecus aethiops* и др.). Животных, используемых для получения клеточной суспензии, получают из питомников, где они содержатся в карантинных группах в течение 6 недель перед использованием. Животных осматривают на наличие герпетических поражений, конъюнктивита, проверяют на отсутствие туберкулезной инфекции, цитомегаловирусов, ретровирусов и др. Сыворотки обезьян исследуются на отсутствие антител к вакуолизирующему вирусу обезьяны 40 (SV<sub>40</sub>), к вирусу иммунодефицита обезьян и к спумавирусам. Взятие почек осуществляют, соблюдая требования асептики, материал подвергают трипсинизации методом измельчения или перфузии. Далее клетки суспендируют в питательной среде ГЛАХИ с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота (СКРС), предварительно проверенной на отсутствие посторонних вирусов и антител к вирусу SV<sub>40</sub>.

Клеточную взвесь контролируют на стерильность и разливают во флаконы. Культуру клеток инкубируют при температуре (35 ± 1) °С в течение 6 сут.

При использовании в качестве субстрата перевиваемой культуры клеток линии *Vero* создают рабочий банк клеток. Из ВОЗ получают посевной банк клеток линии *Vero* (*Vero* WHO) на уровне 134 пассажа. Рабочий банк клеток используют на уровне 139 – 140 пассажей. Посевной и рабочий банки клеток должны быть охарактеризованы в соответствии с требованиями, предъявляемыми к клеточным банкам, и храниться при температуре минус

196 °С. Размораживание и дальнейшее культивирование клеточной культуры проводится в питательной среде с добавлением СКРС.

Перед заражением производственных культур КПЗМ на отсутствие посторонних вирусов контролируют культуральную жидкость – в культурах почечных клеток обезьян и кроликов и диплоидных клеток человека; незараженные культуры – с пассажем в культуры почечных клеток обезьян и кроликов.

Перед заражением производственной культуры клеток линии *Vero* на отсутствие посторонних вирусов контролируют культуральную жидкость – в культуре клеток линии *Vero*, в культурах почечных клеток кроликов и диплоидных клеток человека; незараженные культуры – с пассажем в культуру клеток 4647 и в культуру клеток почек кролика. Монослой клеточной культуры, предназначенный для заражения штаммом вируса полиомиелита, не должен иметь признаков спонтанной дегенерации. Партии культур-продуцентов линии *Vero* контролируют на видовую идентичность клеткам рабочего банка *Vero*.

*Вирусный посевной материал.* Производство полиомиелитной пероральной вакцины основано на системе посевных вирусов.

Основные (прототипные) посевные вирусы, изготовленные из оригинальных аттенуированных штаммов вируса полиомиелита типа 1, 2 и 3, предоставляются ВОЗ.

Рабочие посевные вирусы полиомиелита (тип 1; тип 2; тип 3) готовят из прототипного посевного вируса в первичной культуре КПЗМ с использованием не более 3 пассажей для полиовирусов типа 1 и 2 и не более 2 пассажей для вируса типа 3.

При изготовлении рабочего посевного вируса необходимо определить его титр, идентифицировать как вирус данного типа с помощью нейтрализации вируса в культуре клеток при использовании специфических антител и контролировать:

- отсутствие посторонних вирусов в культуре клеток почек обезьян и кроликов, и в культуре диплоидных клеток человека;
- стерильность;
- отсутствие микоплазмы;
- отсутствие агентов, патогенных для кроликов;
- нейровирулентность на обезьянах;
- генетическую стабильность (rct/40 – признак).

*Контроль на нейровирулентность для обезьян.* Рабочий посевной вирус должен выдержать испытание на нейровирулентность. Контроль проводят на клинически здоровых обезьянах путем введения испытуемого материала в спинной или головной мозг. Испытание проводят на обезьянах рода *Macaca* или *Cercopithecus* массой не менее 1,5 кг. Сыворотки, взятые у обезьян перед заражением, не должны содержать в разведении 1:4 нейтрализующих антител к 3 типам вируса полиомиелита. Количество вируса типов 1, 2, 3, взятого для реакции нейтрализации, не должно превышать 1000 ИЕ.

После окончания периода клинического наблюдения всех выживших животных тотально обескровливают под глубоким наркозом.

*Заражение обезьян в головной мозг.* При введении испытуемого материала в область зрительных бугров головного мозга содержание вируса типов 1, 2, 3 должно быть не менее  $10^{7,0}$  БОЕ или ТЦД<sub>50</sub> в 1 мл.

Обезьян (по 10 в каждой группе) под наркозом заражают неразведенной и разведенной 1:10 вирусной суспензией, для чего используют иглу диаметром 0,6 мм и длиной 2,3 – 2,5 см. Испытуемый материал инокулируют в область зрительных бугров правого и левого полушария по  $(0,5 \pm 0,01)$  мл в каждый. Для этого иглу вводят под острым углом в трепанационные отверстия, сделанные на коронарном шве, отступив 4 – 5 мм от точки его пересечения с сагиттальным швом.

Ежедневно в течение 28 сут оценивают состояние мышечного тонуса

конечностей зараженных животных. Изменения двигательной активности у зараженных обезьян, развивающиеся в первые 72 ч после инокуляции, относят к травматическим. Развивающаяся в последующие дни наблюдения неврологическая симптоматика относится к специфической.

Обезьян, выживших в течение 24 ч, но павших до окончания периода клинического наблюдения, подвергают аутопсии с дальнейшим гистологическим исследованием ЦНС для установления причины смерти. Животных, погибших по причинам, не связанным с полиомиелитом, исключают при учете результатов контроля.

Если у обезьян обнаруживают патологические изменения, характерные для полиомиелита, таких животных следует учитывать при обработке результатов опыта даже при отсутствии травматических изменений, связанных с введением иглы.

*Требования.* При интраталамическом способе заражения допускается испытание на остаточную нейровирулентность смеси 2 или 3 моновакцин одного типа при условии, что титр каждой моновакцины не менее  $10^{7,5}$  ТЦД<sub>50</sub> в мл.

Если после введения смеси моновакцин хотя бы у 1 из обезьян были отмечены клинические проявления полиомиелита, подтвержденные гистологическим исследованием, осуществляют отдельное испытание каждой моновакцины, входившей в состав смеси. При появлении клинических признаков полиомиелита, подтвержденных гистологически хотя бы у 1 животного после введения монопрепарата, допускается повторное заражение обезьян соответствующими монопрепаратами. В случае появления клинических признаков полиомиелита при повторном заражении вакцина использованию не подлежит.

Для получения достоверных результатов в опыте должно быть учтено не менее 80 % животных.

*Гистологическое исследование обезьян, зараженных в головной мозг.* Тщательно выделенные головной и спинной мозг фиксируют целиком в 10 %

растворе формалина в течение 10 сут, затем промывают в проточной воде не менее 12 ч. Вырезку образцов ткани производят из следующих участков головного мозга: коры больших полушарий в области передней средней извилины, зрительных бугров, среднего мозга, мозжечка, продолговатого мозга на 2 уровнях. Из шейного отдела спинного мозга вырезают образцы из 1 – 6 сегментов, из поясничного отдела – из 2 – 5 сегментов.

Полученные образцы маркируют и последовательно обрабатывают этиловым спиртом повышающейся концентрации (70 , 80 %) по 10 ч, дважды 96 %, дважды абсолютным спиртом (по 10 и 12 ч), смесью абсолютного спирта и хлороформа (1:2) 1,5 – 2 ч, дважды хлороформом по 30 мин и смесью хлороформа и парафина (1:1) в течение 4 ч при температуре ( $37 \pm 1$ ) °С. После этого материал выдерживают в парафине 3 раза по 60 мин и заливают смесью парафина и воска в соотношении 10:1. Резку блоков проводят на микротоме. Толщина срезов от 5 до 8 мкм.

Оценку безопасности препарата проводят на основании микроскопического изучения наличия специфических для полиомиелита патоморфологических изменений (ПМИ), их тяжести и распространенности в каждом исследуемом участке головного и спинного мозга. Срезы окрашивают галлоционином или по методу Ниссля.

При интрацеребральном способе заражения оценку проводят по четырехбалльной системе:

0 – отсутствие морфологических изменений;

+ – гибель единичных нервных клеток, единичные (1 – 2) васкулиты и мелкие очаги лимфогистиоцитарной инфильтрации в сером веществе спинного мозга; повреждение 1 ядра головного мозга или единичный очаг поражения в двигательной зоне коры; очаговая инфильтрация лимфогистиоцитарными элементами мягких мозговых оболочек, стромы сосудистых сплетений, субэпендимарные зоны желудочков;

++ – гибель до 40 % нервных клеток, развитие 3 и более васкулитов и

очагов лимфогистиоцитарной инфильтрации в сером веществе спинного мозга; повреждение 2 – 3 ядер головного мозга или 2 – 3 очага поражения в двигательной зоне коры;

+++ – гибель от 40 до 90 % нервных клеток, множественные васкулиты, крупноочаговая или диффузная лимфогистиоцитарная инфильтрация серого вещества спинного мозга; поражение более 3 ядер головного мозга или более 3 очагов поражения в двигательной коре;

++++ – субтотальная и тотальная гибель нервных клеток в различных отделах спинного и головного мозга.

Исследованная объединенная вирусная суспензия (моновакцина) и полиомиелитная вакцина, содержащая все 3 серотипа вирусов, считается прошедшей испытания, если:

– ни в одном из отделов головного мозга не обнаружены изменения на ++++ балла;

– изменения на +++ отмечаются только в месте введения и в других отделах головного мозга, но не более чем у 2 обезьян;

– изменения на ++ в спинном мозге отмечаются не более чем у одной трети обезьян.

Если отмеченные изменения превышают вышеуказанные пределы, то возможно проведение повторного контроля. При развитии в повторном опыте характерных для полиомиелита изменений, превышающих вышеприведенные пределы, вакцина использованию не подлежит.

*Заражение обезьян в спинной мозг.* Испытуемый материал и соответствующий гомотипичный международный эталонный препарат вводят обезьянам в поясничный отдел спинного мозга. При этом концентрации вирусной суспензии в обоих препаратах должны быть максимально равнозначными и составлять от  $10^{5,5}$  до  $10^{6,5}$  ТЦД<sub>50</sub> в 0,1 мл.

Для заражения используют иглу диаметром 0,3 мм, длиной 2,5 см с коротким срезом. Объем введенного материала в поясничное утолщение



спинного мозга составляет 0,1 мл. Необходимо заразить такое число обезьян, чтобы при проверке вирусов типа 1 и 2 в группах, получивших испытуемую вакцину и эталонный препарат, было не менее 11 «положительных» животных («положительной» считается обезьяна, у которой в центральной нервной системе выявлены характерные для полиовируса поражения нейронов). При проверке вируса типа 3 должно быть не менее 18 обезьян с положительной реакцией на эталонный препарат и еще столько же – на испытуемую вакцину. Для того чтобы иметь 11 и 18 «положительных» обезьян, обычно вводят препараты 12 и 20 животным соответственно. Если проверка проводится в течение 2 рабочих дней, то вакцину и гомотипичный эталонный препарат следует вводить в каждый из дней равному числу животных.

Место инокуляции определяют 2 способами:

1. Проводят воображаемую линию, соединяющую левый и правый гребни подвздошной кости. От места пересечения этой линии с позвоночником отсчитывают 4 остистых отростка тел позвонков по направлению к голове. Введение вирусной суспензии осуществляют в межпозвоночное пространство над 4 остистым отростком, соответствующее межпозвоночному промежутку между 1 и 2 поясничными позвонками.

2. Проводят воображаемую линию, соединяющую свободные концы двенадцатых ребер слева и справа. Иглу вводят в место пересечения этой линии с позвоночником. Эта точка должна совпадать с точкой, найденной первым способом.

Обезьяну укладывают на столе лицевым диском вниз. Иглу вводят в найденное межпозвоночное пространство перпендикулярно к позвоночнику, отступив 1 мм от его средней линии, и продвигают ее до тех пор, пока не возникнет резкое сокращение группы мышц одной или обеих нижних конечностей, что свидетельствует о прохождении острия иглы через твердую мозговую оболочку. Затем иглу продвигают вглубь мозга еще на 2 – 3 мм, после чего медленно вводят материал. Правильное введение испытуемого

материала сопровождается фибриллярными сокращениями мышц одной или обеих конечностей. Если вторичного моторного ответа (фибриляция мышц) не наблюдается, иглу извлекают и введение повторяют еще раз.

После окончания инокуляции иглу проводят до вентральной стенки позвоночного канала и извлекают.

Наблюдение за обезьянами проводится в течение 17 – 22 сут с выявлением симптомов, характерных для полиомиелита: мышечная слабость, парезы, параличи конечностей. Появление двигательных изменений в первые 72 ч после интраспинальной инокуляции относят к травматическим. Развитие неврологической симптоматики в последующие сроки следует относить к специфической и оценивать по четырехбалльной системе:

1 – мышечная слабость, 2 – легкий парез, 3 – парез средней тяжести, 4 – паралич.

Результаты испытания учитывают в случае, если не менее 80 % животных каждой группы остаются живыми в течение периода наблюдения.

*Гистологическое исследование ЦНС обезьян, зараженных в спинной мозг.* Всех выживших обезьян подвергают аутопсии с извлечением головного и спинного мозга.

Гистологическому исследованию подвергаются, как минимум, поясничный и шейный отделы спинного мозга, нижняя и верхняя части продолговатого мозга, мост, мозжечок, средний мозг, таламус и моторная часть коры головного мозга каждой обезьяны. Метод получения гистологических срезов соответствует описанному выше при введении вирусной суспензии в головной мозг. Срезы окрашивают галлоцианином. Допускается исследование срезов толщиной 8 – 15 мкм, окрашенных по методу Ниссля.

Исследуются следующие срезы:

– 12 срезов, сделанных на протяжении всего поясничного отдела спинного мозга;

- 10 срезов, сделанных на протяжении всего шейного отдела спинного мозга;
- 2 среза продолговатого мозга;
- 1 срез моста и мозжечка;
- 1 срез среднего мозга;
- по 1 срезу правой и левой частей таламуса и участков коры головного мозга.

Оценку нейровирулентной активности вируса проводят в полусферах спинного мозга и ствола мозга. Повреждения оцениваются следующим образом:

1. Клеточная инфильтрация без поражения нейронов.
2. Клеточная инфильтрация с минимальным поражением нейронов.
3. Клеточная инфильтрация с обширным поражением нейронов.
4. Массивное поражение нейронов с клеточной инфильтрацией или без нее.

Степень повреждений регистрируют в протоколе стандартной формы.

Реакция считается положительной, если на срезах обнаруживается поражение нейронов, но отсутствует след от введения иглы.

Реакция считается отрицательной, если на срезах есть след от введения иглы, но отсутствует поражение нейронов.

При учете результатов исключают срезы, в которых имеются поражения, обусловленные травмой, но отсутствуют специфические вирусные поражения.

Объединенная вирусная суспензия (моновакцина) считается прошедшей контроль, если требуемое количество животных дает положительную реакцию и клинические и гистологические данные свидетельствуют об отсутствии статистически достоверного различия между патогенностью вакцинного вируса и эталонного препарата.

*Генетическая стабильность (rct/40 – признак).* Объединенную

вирусную суспензию (моновакцину) проверяют в тесте *in vitro* на способность к размножению вируса в КПМЗ при 2 температурных режимах 34 и 40 °С в сравнении с гомологичным контрольным вирусом rct/40 – (стандартный образец) и гомологичным контрольным вирусом rct/40 + вирулентный штамм.

Объединенную вирусную суспензию считают прошедшей испытания, если ее титр и титр стандартного образца (СО) при температуре 40 °С снижен по сравнению с титром при температуре 34 °С не менее чем в 100000 раз. При этом титр контрольного вируса rct/40 + вакцинального штамма гомологичного типа при указанных выше 2 температурах не должен изменяться.

При получении разового сбора вирусосодержащей жидкости (суспензия одного типа вируса, собранная с культур клеток, выращенных за 1 производственный цикл) проводят испытания, указанные при описании как клеток-продуцентов КПЗМ, так и клеточной линии *Vero*.

При получении объединенной суспензии (смесь нескольких разовых сборов вируса одного типа) до и после фильтрации определяется титр вируса и проводятся контроли на:

- стерильность;
- отсутствие микоплазмы;
- отсутствие агентов, патогенных для кроликов;
- типоспецифичность;
- нейровирулентность на обезьянах;
- генетическую стабильность (rct/40 – признак).

Объединенную суспензию (моновалентная вакцина) стабилизируют магния хлоридом, проверяют на стерильность по содержанию бактерий и грибов и определяют ее специфическую активность.

При получении готовой вакцинной массы (суспензия, состоящая из объединенной суспензии каждого типа вируса полиомиелита) и ее розливе

необходимо провести контроль на контаминацию бактериями и грибами до и после розлива.

## ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Прозрачная жидкость от желтовато-красного до розово-малинового цвета без осадка и без видимых посторонних включений. Метод определения визуальный.

**Подлинность.** Вакцина должна быть типоспецифичной и содержать аттенуированные штаммы Сэйбина тип 1, тип 2, тип 3. Определение проводят в реакции нейтрализации цитопатогенной активности вакцинных штаммов соответствующими диагностическими сыворотками к вирусам полиомиелита всех 3 серотипов в культуре клеток *Hep-2* Цинциннати параллельно со СО как моно, так и трехвалентного препарата тест-вакцины. Определение проводят по методике, описанной в разделе «Специфическая активность». Титр вакцины в присутствии смеси гомотипичных диагностических энтеровирусных сывороток должен быть снижен не менее чем на 2 lg (т.е., не менее чем в 100 раз).

**Прозрачность.** Вакцина должна быть прозрачной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Вакцина должна быть от желтовато-красного до розово-малинового цвета. Метод определения визуальный. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкости».

**Извлекаемый объем.** Не менее номинального. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

**pH.** От 6,8 до 7,2. Метод определения потенциометрический. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Стерильность.** Вакцина должна быть стерильной и не содержать посторонних микроорганизмов – бактерий, в том числе микоплазм и грибов. Стерильность определяют методом прямого посева или мембранной

фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Специфическая активность.** Вакцина полиомиелитная пероральная типов 1, 2, 3 должна содержать в 1 прививочной дозе (0,2 мл) инфекционных единиц (ИЕ) вируса (ТЦД<sub>50</sub>) не менее: тип 1 –  $10^{6,0}$ ; тип 2 –  $10^{5,0}$ ; тип 3 –  $10^{5,5}$ . Определение специфической активности проводят на культуре клеток *Herp-2* (Цинциннати) по цитопатогенному действию (ЦПД) вируса в сравнении со СО трехвалентного препарата.

От каждой серии вакцины в опыте используют не менее трех флаконов, которые объединяют в один образец.

Исходные клетки *Herp-2* Цинциннати поддерживают многократным пассированием в питательной среде Игла МЕМ с добавлением 5 % сыворотки крови плодов коровы, содержащей гентамицина сульфат 40 мкг/мл.

При пассировании клеточных культур клетки снимают с поверхности стекла смесью растворов трипсина и Версена (1:1), подогретых до температуры 37 °С, и засевают в количестве от  $10^4$  до  $3 \cdot 10^4$  клеток на 1 см<sup>2</sup> площади одной из боковых сторон флакона и выращивают при температуре (37 ± 1) °С. Клеточный монослой формируется на 3 – 4 сут.

Титрование проводят в 96-луночных панелях для культивирования клеток фирмы Costar или других фирм аналогичного качества.

Содержание каждого типа вируса определяют в реакции нейтрализации путем нейтрализации 2 других типов вируса соответствующими им специфическими диагностическими энтеровирусными моновалентными сыворотками.

Рабочее разведение специфической сыворотки к каждому из 3 типов полиовакцины должно снижать титр вируса не менее чем на 2 lg (не менее чем в 100 раз). В каждое испытание наряду с исследуемым образцом включают одновременное титрование СО трехвалентной вакцины. Разведения вакцины и СО готовят на питательной среде Игла МЕМ, содержащей 2 %

сыворотки крови плодов коров кратностью  $1 \times 5$ . Диапазон разведений должен включать, по меньшей мере, 3 разведения препаратов, при которых вирус разрушает от 10 до 90 % зараженных клеток. В каждую лунку панели вносят по 0,1 мл смеси, содержащей 0,05 мл выбранных разведений вакцины или СО, и 0,05 мл смеси рабочих разведений нейтрализующих сывороток к 2 другим типам вируса (по 8 – 12 лунок на разведение), и инкубируют 3 ч при температуре  $(37 \pm 1)$  °С. Затем во все лунки панелей при титровании трехвалентной вакцины добавляют по 0,1 мл взвеси клеток в концентрации 100000 – 200000 клеток в мл. В контрольные лунки вносят по 0,1 мл клеточной суспензии и 0,1 мл питательной среды. Панели инкубируют в термостате при температуре  $(37 \pm 1)$  °С в газовой среде, содержащей 5 % СО<sub>2</sub>, в течение 7 сут. Клетки *Herp-2* в лунках панели просматривают в инвертированном микроскопе на наличие цитопатогенного действия на 3, 5 и 7 дни инкубирования. ТЦД<sub>50</sub> /мл вируса рассчитывают на 7 день по методу Рида и Менча.

Так как разведения вируса, взятые в опыт по определению титра в тривакцине, разводятся в 2 раза смесью антисывороток, значение титра 10-дозовой вакцины (0,2 мл/доза) должен быть увеличен на 0,6 lg. Титрование каждой серии полиомиелитной вакцины проводят не менее 2, но не более 4 раз.

Учитывают результаты только тех титрований, в которых значение (десятичного) логарифма титра СО титруемого одновременно с вакциной, не должно отличаться от значения титра СО, указанного в паспорте более чем на 0,5. Вычисляют среднюю арифметическую величину титра из результатов 2 титрований вакцины и делают заключение о соответствии или несоответствии вакцины требованиям, предъявляемым к специфической активности препарата. Повторные титрования забракованных серий вакцины не допускаются.

**Термостабильность.** Должна быть стабильна. Величина титра вируса после прогревания вакцины может снижаться не более чем на 0,5 lg. Не

менее 5 флаконов от каждой серии вакцины и СО прогревают при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 48 ч, другие 5 флаконов препарата и СО (контроль) хранят при температуре, указанной в нормативной документации. Вакцины и СО в прогретых и контрольных образцах титруют одновременно по методике, изложенной в разделе «Специфическая активность». Повторное титрование не допускается (титр определяют в одном опыте).

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

Предупредительные надписи: «Хранить в не доступном для детей месте», «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений», «Для выращивания вируса используется питательная среда с гидролизатом лактальбумина (0,5 %) в растворе Эрла».

**Транспортирование и хранение.** При температуре от 2 до 8  $^\circ\text{C}$ . Допускается одноразовое повторное замораживание до температуры минус 20  $^\circ\text{C}$ .