

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Иммуногенность коклюшной суспензии

ОФС.1.7.2.0005.15

и цельноклеточного коклюшного

компонента комбинированных вакцин

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения иммуногенности коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин путем сравнения с иммуногенностью референс-препарата коклюшной вакцины, откалиброванного в международных единицах (МЕ) по соответствующему международному стандартному образцу. Определение проводят на модели экспериментального менингоэнцефалита при внутримозговом введении иммунизированным мышам заражающей дозы тест-штамма *Bordetella pertussis* 18323 по методу Kendrick.

### Материалы

**Животные.** Здоровые мыши с массой тела (11±1) г чувствительной линии или аутбредные мыши, способные давать адекватный иммунный ответ. Используют мышей одного пола или самцов и самок, равномерно распределенных по группам. В 1 опыте различия массы тела отдельных животных не должны превышать 2 г. Перед проведением испытания за животными проводят наблюдение в течение 3 сут. При гибели более 10 % мышей данную партию не используют.

### Референс-препараты:

– стандартный образец иммуногенности коклюшной вакцины, калиброванный в МЕ по соответствующему международному стандартному образцу;

– стандартный образец мутности 10 МЕ, калиброванный в международных оптических единицах (МЕ).

**Тест-штамм.** *B. pertussis* 18323, хранят в лиофилизированном состоянии. Продолжительность хранения высушенного штамма не должна превышать 10 лет; биологические свойства лиофилизированного тест-штамма проверяют ежегодно.

**Среды.** Используют среды Борде-Жангу, казеиново-угольный агар (КУА), их модификации или другие среды, адаптированные к коклюшному микробу.

#### *Среда Борде-Жангу*

В 1500 мл воды очищенной последовательно растворяют ингредиенты:

- калий фосфорнокислый двузамещенный – 2,25 г,
- калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,75 г,
- калий хлористый – 1,5 г,
- магний сернокислый – 0,075 г,
- натрий хлористый – 7,5 г.

Полученный солевой раствор до внесения следующих ингредиентов должен иметь рН 7,4–7,5.

Затем в солевой раствор вносят:

- фильтрат картофельного отвара – 500 мл,
- агар зарубежных фирм «Дифко» (США) или «Мерк» (Германия) – 60 г.

Среду кипятят до полного растворения агара, устанавливают рН 7,1–7,2, разливают по (200 ± 5) мл в стерильные флаконы вместимостью 500 мл и стерилизуют при температуре 110 °С в течение 30 мин. Среду Борде-Жангу хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 3 мес.

#### Фильтрат картофельного отвара

В 1 л воды очищенной вносят 0,5 кг очищенного мелко нарезанного картофеля и нагревают до кипения. В момент закипания добавляют 40 мл глицерина и кипятят в закрытой посуде до полного разваривания картофеля

в течение 1,0–1,5 ч. Доводят объем водой очищенной до первоначального уровня и процеживают через двухслойную марлевую салфетку. Картофельный отвар используют свежеприготовленным.

Для получения среды Борде-Жангу с 30 % крови содержимое флакона нагревают до температуры 50–55 °С, вносят 60 мл дефибринированной крови человека, перемешивают и разливают в чашки Петри. Срок хранения среды с кровью – 10 сут при температуре от 2 до 8 °С.

Примечание.

Дефибринированную кровь получают на участках заготовки крови, где ее контролируют на отсутствие возбудителей инфекций, которые передаются при гемотрансфузиях, в соответствии с утвержденными уполномоченными органами РФ «Инструкцией по заготовке и консервированию донорской крови» и «Инструкцией по проведению донорского прерывистого плазмафереза». Срок хранения крови не более 2 сут.

*Среда КУА (казеиново-угольный агар)*

На 1 л среды добавляют:

- гидролизат казеина –  $(170 \pm 5)$  мл (берется из расчета, чтобы в готовой среде содержание аминного азота составляло от 150 до 160 мг%),
- дрожжевой диализат –  $(90 \pm 10)$  мл,
- калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,5 г,
- магний хлористый 6-водный – 0,4 г,
- крахмал растворимый – 1,5 г,
- кальций хлористый – 0,01 г или 1 % раствор – 1 мл,
- железо сернокислое 7-водное – 0,01 г или 0,5 % раствор – 2 мл,
- медь сернокислая 5-водная – 0,005 г или 0,2 % раствор – 2 мл,
- цистеин – 0,03 г или 1,5 % раствор – 2 мл,
- агар микробиологический – 30,0 г,
- уголь активированный – 2 г.

Содержание хлоридов в среде должно составлять  $(0,75 \pm 0,15)$  %, аминного азота  $(155 \pm 10)$  мг %; рН среды доводят до 7,0–7,1 с помощью 20

% раствора натрия гидроксида.

Среду разливают в матрацы по  $(250 \pm 10)$  мл, пробирки по  $(11 \pm 1)$  мл и флаконы вместимостью 500 мл по  $(200 \pm 5)$  мл, стерилизуют 30 мин при температуре  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  и хранят при температуре от 2 до  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  не более 1 мес. Для получения среды с 10 % крови содержимое флакона растапливают, охлаждают до температуры  $50\text{--}55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , вносят 20 мл дефибрированной крови человека и перемешивают. Срок хранения среды с кровью 10 сут при температуре от 2 до  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### Гидролизат казеина:

- казеин (сухой) – 2000 г,
- хлористоводородная кислота концентрированная – 1000 мл,
- вода очищенная – 500 мл.

Степень расщепления белка – не менее 93 %. Аминный азот  $850\text{--}1000$  мг %, общий азот  $910\text{--}1080$  мг %, натрия хлорид 4–6 %. Среду стерилизуют 30 мин при температуре  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Среду используют свежеприготовленной (при добавлении 0,5 % хлороформа срок хранения 1 год при температуре от 2 до  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

#### Дрожжевой диализат:

- дрожжи хлебопекарные – 1000 г,
- вода очищенная – 1000 мл,
- хлороформ – 4 мл.

Аминный азот – не менее 0,54 мг/мл. Срок хранения 3 мес при температуре от 2 до  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 1 % раствор гидролизата казеина

Гидролизат казеина – 10 мл (аминный азот  $8,5\text{--}10,0$  мг/мл), натрий хлористый – 6,0 г (до концентрации хлоридов 0,6 %), вода очищенная – до 1000 мл. С помощью 20 % раствора натрия гидроксида pH доводят до  $(7,1 \pm 0,2)$ . Среду стерилизуют 15 мин при температуре  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Срок хранения 6 мес. Каждую серию гидролизата казеина проверяют на безвредность путем

внутричерепного введения 5 мышам по 0,03 мл. Животные должны оставаться живыми и здоровыми в течение 3 сут.

### **Метод исследования иммуногенной активности коклюшной вакцины**

Мышей распределяют в группы по 18–20 животных в каждой: по 2 группы для испытуемого и референс-препаратов. Одновременно для контроля вирулентности заражающего штамма *B. pertussis* 18323 (определение LD<sub>50</sub> культуры) из этой же партии животных формируют 4 группы по 10 мышей в каждой.

Необходимо соблюдать принцип случайного распределения животных по группам, случайными должны быть и расположение клеток на полках, и порядок введения разрешающей дозы.

#### Иммунизация мышей

Готовят по 3 пятикратных разведения испытуемого и референс-препаратов. В качестве растворителя используют 0,9 % раствор натрия хлорида, рН (7,1 ± 0,2). В интервале используемых разведений каждого образца должна содержаться средняя эффективная доза ED<sub>50</sub>.

В ампулу с референс-препаратом вносят стерильный растворитель из такого расчета, чтобы в 1 мл содержалась 1 МЕ (разведение I). Из разведения I делают 2 последующих пятикратных разведения по схеме (табл. 1).

**Таблица 1– Пример разведения референс-препарата**

Разведение	Объем вносимого разведения I референс-препарата, мл	Объем вносимого растворителя, мл	Разведения референс-препарата (в 0,5 мл)	Иммунизирующая доза– 0,5мл	
				Количество исходного референс-препарата, мл	Количество МЕ
I	15	0	1:60	0,0167	0,5
II	2,5	10,0	1:300	0,0033	0,1
III	0,5	12,0	1:1500	0,00066	0,02

Образец испытуемой вакцины разводят в 14 раз (разведение I). Из разведения I делают 2 последующих пятикратных разведения по схеме (табл. 2). Если полученное в опыте значение ED<sub>50</sub> испытуемой вакцины будет

больше значений использованных доз, необходимо изменить разведение I (например, 1:10). Последующие 2 разведения делают по вышеприведенной схеме.

Приготовленные разведения вакцины и референс-препарата хранят при температуре от 2 до 8 °С и используют в течение не более 4 ч.

Таблица 2 – Пример разведения испытуемой вакцины

Разведение	Объем вносимого I разведения вакцины, мл	Объем вносимого раствора, мл	Кратность разведений исходной вакцины (в 0,5 мл)	Иммунизирующая доза в объеме 0,5 мл	
				Количество исходной вакцины, мл	Количество МЕ (предполагаемое содержание)
I	14	0	1:28	0,0357	0,5
II	2,5	10,0	1:140	0,0071	0,1
III	0,5	12,0	1:700	0,00142	0,02

Каждой мышке в каждой группе внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл одного из разведений испытуемой вакцины или референс-препарата. К моменту введения заражающей дозы не менее 94 % иммунизированных мышек должно остаться в живых и без признаков заболевания. Если гибель животных превышает указанную величину, то опыт не подлежит учету.

Приготовление заражающей суспензии тест-штамма *B. pertussis* 18323

Бактериальную суспензию *B. pertussis* 18323, используемую для заражения, готовят из 20–24-часовой культуры второго–третьего пассажа, выращенной на среде Борде-Жангу, с кровью человека или КУА с кровью человека или на других, адаптированных к коклюшному микробу средах.

Выросшую культуру контролируют путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму. Микробные клетки *B. pertussis* 18323 должны быть морфологически однородны. Посторонняя микрофлора должна отсутствовать.

Готовят бактериальную суспензию микробных клеток с концентрацией, соответствующей 10 МЕ по стандартному образцу мутности

(разведение  $1_A$ ). Все дальнейшие разведения микробной суспензии делают в 1% растворе гидролизата казеина, содержащего 0,6% раствор натрия хлорида, рН ( $7,1 \pm 0,2$ ).

Полученную суспензию разводят последовательно так, чтобы получить заражающую дозу, содержащую 100000 микробных клеток (рабочая суспензия) в объеме 0,03 мл ( $100-1000 LD_{50}$ ). Из рабочей суспензии готовят разведения 1/10, 1/50, 1/250 и 1/1250 для определения  $LD_{50}$  тест-штамма и проверки жизнеспособности микробов в суспензии (табл. 3).

Таблица 3 – Пример разведения тест-штамма *B. pertussis* 18323

Номер пробирки	Кратность разведения	Объем переносимой суспензии из предыдущей пробирки в последующую, мл	Объем внесенного растворителя, мл	Полученная суспензия содержит в 0,03 мл (эквивалентно)	Назначение
1	$1_A : 3$	1	2	100 млн	
2	$1_I : 10$	0,5	4,5	10 млн	
3	$1_2 : 10$	0,5	4,5	1 млн	
4	$1_3 : 10$	2	18	100000	Разливают в 3 пробирки для заражения – рабочая суспензия
5	$1_4 : 10$	0,5	4,5	10000	Для определения $LD_{50}$ штамма
6	$1_5 : 5$	1,0	4,0	2000	
7	$1_6 : 5$	1,0	4,0	400	
8	$1_7 : 5$	1,0	4,0	80	

Из пробирки 8 сразу после приготовления разведения делают посев по 0,1 мл на 3 чашки Петри со средой Борде-Жангу или КУА с кровью с целью подсчета количества содержащихся в ней живых клеток, выраженного в колониеобразующих единицах (КОЕ). Культуру помещают в термостат с температурой ( $36 \pm 0,5$ ) °C на 3–4 сут. Для определения количества КОЕ в 30 мкл проводят подсчет выросших колоний на 3 чашках и полученное значение делят на 10. В 0,03 мл разведения из пробирки 8 должно быть не более 50 КОЕ.

При разведении и в процессе заражения суспензию хранят в холодной водяной бане (вода со льдом). Продолжительность работы с микробной суспензией не должна превышать 2,5 ч с момента приготовления смыва культуры.

Если в испытании используют высокочувствительную к коклюшным антигенам линию мышей, то заражающую дозу тест-штамма 18323 следует уменьшить до содержания 100–1000 LD<sub>50</sub> в объеме 0,03 мл.

#### Заражение иммунизированных животных

Мышам, иммунизированным испытываемой вакциной и референс-препаратом, через 14–17 сут интрацеребрально вводят по 0,03 мл рабочей суспензии живой культуры тест-штамма *B. pertussis* 18323 (пробирка 4) путем прокола лобной кости в точке, расположенной в 2 мм от средней линии и на 2 мм выше глаза. Для заражения используют туберкулиновые шприцы с ценой деления 0,01 мл, используя иглу № 27, имеющую короткий срез и муфту; длина свободного конца иглы от края муфты до среза должна составлять от 3 до 4 мм. Для определения величины LD<sub>50</sub> разведения заражающей дозы (пробирки 5, 6, 7, 8) вводят контрольным мышам соответствующих групп интрацеребрально по 0,03 мл.

Мышей, погибших в течение 3 сут после заражения, исключают из опыта (неспецифическая гибель); в каждой клетке оставляют по 16 мышей.

За зараженными животными наблюдают 14 сут с ежедневной регистрацией их гибели. В день учета результатов (14-е сут) в число погибших включают также всех парализованных мышей.

Вычисление величины LD<sub>50</sub> (табл. 4) культуры тест-штамма производят по формуле Кербера:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \delta(\sum Li - 0,5),$$

где D<sub>N</sub> – максимальная из испытываемых доз;

δ – логарифм кратности разведения (отношение большей дозы к следующей за ней меньшей дозе);



$L_i$  – отношение числа животных, погибших при введении данной дозы культуры, к общему числу животных, которым эта доза была введена;

$\sum L_i$  – сумма значений  $L_i$ , найденных для всех испытанных доз.

Таблица 4 – **Пример расчета величины  $LD_{50}$  культуры тест-штамма *B. pertussis* 18323**

Доза культуры (число микробных клеток) 0,03 мл	Число зараженных животных	Число погибших (парализованных) из общего числа зараженных животных	Значения $L_i$	$LD_{50}$	Кол-во колоний в заражающей дозе 80 клеток
$10^4$	10	9/10	0,9	648	23
$2 \cdot 10^3$	10	7/10	0,7		
$4 \cdot 10^2$	10	4/10	0,4		
80	10	2/10	0,2		

$$\sum L_i = 2,2$$

$$\lg LD_{50} = \lg 10^4 - \lg 5 \cdot (2,2 - 0,5) = 4,0 - 0,699 \cdot 1,7 = 2,8117$$

$$LD_{50} = 648 \text{ микробных клеток.}$$

В заражающей дозе ( $10^5$  микробных клеток) содержится  $648 = 154 LD_{50}$

### **Оценка иммуногенной активности испытываемой вакцины**

Расчет иммуногенной активности испытываемого препарата проводят по методу Вильсона и Вустера с использованием таблиц Национального института здоровья США (для  $n=16$ ) или статистическим методом с помощью программы Probit-analysis. Для проведения расчета в таблице Вильсона-Вустера (табл. 5) по вертикальной оси отмечают величину, равную сумме выживших мышей от всех 3 доз препарата (А), по горизонтальной оси – разницу между числом мышей, выживших от наибольшей и наименьшей доз, взятых в опыт (В). В месте пересечения прямых, проведенных от соответствующих величин А и В, находят  $ED_{50}$  (верхняя цифра) и её стандартные отклонения, выраженные в процентах (нижние цифры). Найденное значение соответствует  $ED_{50}$  для средней иммунизирующей дозы, равной 100 мл. Для определения величины  $ED_{50}$  в опыте, найденную в таблице величину  $ED_{50}$  делят на 100 и умножают на значение средней иммунизирующей дозы в данном опыте. Результаты опыта считают

достоверными, если стандартное отклонение средней иммунизирующей дозы не ниже 64 % и не выше 157 % от найденного значения ED<sub>50</sub>.

Примеры расчета количества МЕ в 1 мл по методу Вильсона и Вустера приведены в табл. 6.



Таблица 6 – Пример расчета иммуногенной активности вакцины

Препарат	Доза препарата в 0,5 мл			Количество выживших мышей/общее число зараженных в группе	Величины А/В и ED <sub>50</sub> по таблице	ED <sub>50</sub> (стандартные отклонения в опыте)
	Разведение	Количество исходного препарата, мл	Количество МЕ в иммунизирующей дозе			
Референс-препарат	1:60	0,0167	0,5	14/16	27/11 71,3 72–139	0,0023 (0,00327– 0,00169)
	1:300	0,0033	0,1	10/16		
	1:1500	0,00066	0,02	3/16		
Вакцина	1:28	0,0357		13/16	23/11 111,75 72–139	0,0079 (0,011– -0,0057)
	1:140	0,0071		8/16		
	1:700	0,00142		2/16		

Средняя иммунизирующая доза референс-препарата, выраженная в мл (0,0033 мл), содержит 0,1 МЕ (табл. 6). При определении ED<sub>50</sub> референс-препарата используют значение средней иммунизирующей дозы, выраженное в МЕ.

$$ED_{50\text{референс}} = \frac{71,3 \cdot 0,1}{100} = 0,0713 \text{ МЕ},$$

$$ED_{50\text{макс.}} = \frac{0,0713 \cdot 139}{100} = 0,0991 \text{ МЕ},$$

$$ED_{50\text{мин}} = \frac{0,0713 \cdot 72}{100} = 0,0513 \text{ МЕ},$$

$$ED_{50\text{вакцины}} = \frac{111,75 \cdot 0,0071}{100} = 0,0079 \text{ мл},$$

$$ED_{50\text{макс.}} = \frac{0,0079 \cdot 139}{100} = 0,011 \text{ мл},$$

$$ED_{50\text{мин}} = \frac{0,0079 \cdot 72}{100} = 0,0057 \text{ мл}.$$

Количество МЕ в 1 мл вакцины определяют по формуле:

$$X = \frac{ED_{50\text{референс}}}{ED_{50\text{вакцины}}},$$

$$X = \frac{0,0713}{0,0079} = 9,0 \text{ МЕ/мл}.$$

Доверительный интервал значения иммуногенности (МЕ/мл) препарата рассчитывают по формулам:

$$R_{\text{мин}} = \frac{R}{K};$$

$$R_{\text{макс}} = R \cdot K,$$

где  $R$  – количество МЕ в 1 мл препарата;

$R_{\text{мин}}$  – нижний предел доверительного интервала;

$R_{\text{макс}}$  – верхний предел доверительного интервала;

$K$  – доверительный коэффициент.

$$K = \text{анти}lg \sqrt{(S_1^2 + S_2^2)},$$

где  $S_1 = (\lg ED_{50})_{\text{макс}} - \lg ED_{50}$  для более иммуногенного препарата при избранном уровне существенности различия – 95 или 99%;

$S_2 = \lg ED_{50} - (\lg ED_{50})_{\text{мин}}$  для менее иммуногенного препарата.

Для примера:

$$K = \text{анти}lg \sqrt{[-2,4855 - (-2,6289)]^2 + [-2,1007 - (-2,2441)]^2} =$$

$$\text{анти}lg \sqrt{0,0206 + 0,0206} = \text{анти}lg \sqrt{0,0412} = \text{анти}lg 0,203.$$

$$K=1,6$$

Отсюда:

$$R_{\text{мин}} = \frac{R}{K}; \text{ т. е. } \frac{9,0 \text{ МЕ}}{1,6} = 5,6 \text{ МЕ}$$

$$R_{\text{макс}} = R \cdot K; \text{ т. е. } 9,0 \text{ МЕ} \cdot 1,6 = 14,4 \text{ МЕ}$$

Таким образом, в 1 мл вакцины содержится 9,0 МЕ с доверительным интервалом от 5,6 до 14,4 МЕ.

Если в первом опыте активность препарата не соответствует установленным требованиям, опыт повторяют. В этом случае при вычислении количества МЕ в 1,0 мл препарата учитывают результаты всех достоверных опытов (не более 3). Используют расчет средней геометрической (Хгеом.) величины значения по формуле:

$$X_{\text{геом.}} = \sqrt[n]{\Pi_x},$$

где  $\Pi_x$  – произведение усредняемых величин;  
 $n$  – число определений.

Критерии достоверности теста:

- ED<sub>50</sub> референс-препарата и испытуемой вакцины лежит в интервале между наибольшей и наименьшей иммунизирующими дозами;
- LD<sub>50</sub> не превышает 1000 микробных клеток;
- заражающая доза микробных клеток содержит не менее 100 и не более 1000 LD<sub>50</sub>;
- в 0,03 мл разведения из пробирки 8 содержится не более 50 КОЕ.