

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Испытание вирусных вакцин
на присутствие посторонних агентов**

**ОФС.1.7.2.0006.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы обнаружения посторонних агентов в вирусных вакцинах для медицинского применения.

Для производства вирусных вакцин допускается использовать только субстраты, одобренные национальными регулирующими органами. Если для приготовления иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) используются ткани животных или эмбрионы птиц, а также приготовленные на их основе клеточные культуры, то животные и эмбрионы должны поступать из изолированных, постоянно контролируемых хозяйств, свободных от специфической патогенной флоры (SPF), если в нормативной документации нет других указаний.

На присутствие посторонних агентов должны быть испытаны:

- контрольные клеточные культуры (клетки, отобранные из производственного пула клеточных культур до внесения вакцинного штамма);
- объединенный вирусный сбор вакцинного и посевного вирусов для живых и инактивированных вакцин;
- объединенный вирусный сбор (полуфабрикат вакцины до добавления вспомогательных веществ) каждой серии живых вирусных вакцин.

Учитывая специфические особенности производства ИЛП, в нормативную документацию на них могут быть введены дополнительные

требования.

1. Испытание контрольной клеточной культуры

1.1. Исследование в клеточных культурах

Испытанию подвергается не менее 500 мл незараженной клеточной суспензии в концентрации, используемой для посева клеточных культур-продуцентов вакцины.

Отобранную в качестве контрольной клеточную суспензию разливают во флаконы, клетки оставляют незараженными и инкубируют в тех же условиях, что и клетки, используемые для производства вакцины. За контрольной клеточной культурой наблюдают до времени последнего сбора вирусов с культур-продуцентов вакцины, но не менее 14 сут. В конце периода наблюдения все флаконы с контрольными клеточными культурами исследуют с помощью светового микроскопа на наличие цитопатических изменений. Во время культивирования контрольных клеток не должно выявляться признаков специфической дегенерации.

По истечении срока наблюдения (после изучения монослоя под микроскопом) не менее 25 % контрольных клеточных культур проверяют на наличие феномена гемадсорбции с 0,25 % эритроцитами морской свинки, кур и человека I(0) группы, если нет других указаний в нормативной документации. Материал инкубируют в течение 30 мин сначала при температуре от 2 до 8 °С, а затем при температуре от 20 до 25 °С. Взвесь эритроцитов сливают, клеточный монослой трижды отмывают раствором Хенкса или 0,9 % раствором натрия хлорида и просматривают под микроскопом на наличие гемадсорбции.

Из оставшихся флаконов с контрольными культурами отбирают по 10 мл культуральной жидкости. Если на протяжении срока инкубации контрольных культур производят сливы вирусосодержащей жидкости из производственных культур, то в те же сроки берут пробы культуральной жидкости из флаконов с контрольными культурами и сохраняют их при температуре не выше минус 20 °С. В конце наблюдения пробы

культуральной жидкости из контрольных клеточных культур объединяют и вносят по 10 мл в 3 клеточные культуры: гомологичную, приготовленную из другой партии производственного субстрата (например, фибробласты куриных или перепелиных эмбрионов), человека или обезьяны (например, диплоидные клеточные культуры человека или клетки *Vero*) и наиболее чувствительную для выявления вирусов - возможных контаминантов используемого субстрата (для птичьего субстрата – почки эмбриона кур). От каждой вновь испытываемой клеточной культуры оставляют по одному интактному (незараженному) контрольному флакону. Все культуры выдерживают при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 14 сут. По окончании срока наблюдения все контрольные культуры проверяют на наличие цитопатических изменений и феномена гемадсорбции, как указано выше.

Пробы считают прошедшими испытание, если в опытных и контрольных культурах отсутствуют цитопатические изменения и гемадсорбция.

Если при исследовании контрольных клеточных культур в одном из испытаний обнаружены цитопатические изменения или феномен гемадсорбции, то вирусный сбор, полученный в производственных культурах, не должен быть использован для приготовления вакцины.

1.2. Обнаружение группо-специфического (ГС) антигена вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса птиц (Cofal-test)

Если для производства и контроля вакцин используют субстраты, приготовленные на основе эмбрионов кур или других птиц (например, перепелов), то для обнаружения группоспецифического антигена лейкозно-саркоматозного комплекса птиц (ГС-антиген) проводят реакцию связывания комплемента (РСК) (Cofal-test) по общепринятой методике.

Испытуемый антиген готовят из той же партии контрольных клеточных культур, используемых при производстве вирусных вакцин.

Клетки засевают в три флакона (по 150-160 тыс. клеток на мл) и

инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в смеси равных объемов питательных сред Игла и 199 с добавлением 5 % телячьей сыворотки. Через 5-7 сут после образования монослоя клетки субкультивируют не менее двух раз в течение 14 сут. По окончании инкубации культуральную жидкость из флаконов сливают, добавляют 4,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, затем клетки разрушают трехкратным замораживанием и оттаиванием и используют в РСК.

В качестве положительного контроля антигена возможно использование

10 % суспензии опухоли вируса саркомы Рауса в 0,9 % растворе натрия хлорида. При обнаружении в испытуемой культуре ГС-антигена вакцину бракуют.

Обнаружение ГС-антигена (после приготовления как указано выше) возможно также в ИФА и ПЦР в соответствии с инструкциями по применению тест-систем после валидации методик.

2. Исследование вирусосодержащего материала

Испытанию подлежит объединенный вирусный сбор, полученный в процессе приготовления вакцинного штамма и посевного вируса. При необходимости для определенных вирусных вакцин испытанию также подлежит объединенный вирусный сбор, полученный в процессе приготовления полуфабриката вакцины до добавления вспомогательных веществ, что должно быть указано в нормативной документации.

Контроль проводят в клеточных культурах, на животных и куриных эмбрионах (если в нормативной документации нет других указаний). Если образцы исследуют в течение первых 24 ч, то до проведения контроля их сохраняют при температуре от 2 до 8 °С. При проведении контроля в более поздние сроки образцы замораживают и хранят при температуре не выше минус 20 °С. Размораживание материала в процессе контроля разрешается проводить не более одного раза.

2.1 Исследование в клеточных культурах

Если испытуемый материал вызывает в культуре цитопатогенное или гемадсорбирующее действие, используют предварительную нейтрализацию вируса иммунной сывороткой. Для получения иммунной сыворотки используют животных, ткани которых не применяют при приготовлении клеточных культур-продуцентов вакцины. Антиген для иммунизации животных готовят в клеточных культурах, не используемых для проведения контроля. Сыворотка не должна оказывать ингибирующего/токсического действия на ход анализа.

Испытуемый материал (не менее 50 мл вирусосодержащей жидкости, если в нормативной документации нет других указаний) смешивают с иммунной сывороткой, взятой в количестве, достаточном для полной нейтрализации содержащегося в пробе вируса. Смесь инкубируют при заданной температуре в течение времени (обычно 1-2 ч), необходимого для нейтрализации вакцинного штамма вируса (если нет других указаний в нормативной документации), затем вносят во флаконы с тремя указанными выше видами клеточных культур. Для каждого вида культуры клеток оставляют один контрольный флакон с незараженной клеточной культурой.

Культуры клеток выдерживают при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 14 сут со сменой среды на 4 - 6 сут (если это необходимо). По истечении 14 сут опытные и контрольные клеточные культуры просматривают под микроскопом на наличие цитопатических изменений, трижды замораживают и оттаивают, после чего производят пассаж на одноименной культуре, внося в нее не менее 25 мл неосветленной культуральной жидкости. Разведение вносимого материала поддерживающей средой не должно превышать четырехкратного. Если для испытания используют перевиваемую клеточную линию, то по истечении указанного срока инкубации возможно проведение субпассажа клеток.

После проведения пассажа опытные и контрольные культуры клеток инкубируют при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 14 сут со сменой среды на

4 - 6 сут, периодически просматривая их под микроскопом на наличие цитопатических изменений. По истечении срока наблюдения культуры проверяют в реакции гемадсорбции, как указано выше. Материал считают прошедшим контроль, если в опытных и контрольных культурах отсутствуют цитопатические изменения и гемадсорбция.

2.2. Испытание на животных

Испытанию подлежит объединенный вирусный сбор, полученный в процессе приготовления вакцинного штамма, посевного вируса и полуфабриката вакцины до добавления вспомогательных веществ, что должно быть указано в нормативной документации. Используют здоровых животных, на которых ранее не проводили какие-либо испытания. Если содержащийся в контролируемом материале вакцинный штамм вируса патогенен для животных, используемых для контроля, его предварительно нейтрализуют иммунной сывороткой, приготовленной, как было указано выше. Испытания на животных проводятся в том случае, если в нормативной документации нет других указаний.

2.2.1. Испытание на взрослых мышах

Используют от 10 до 20 мышей массой 15 - 20 г. Каждому животному вводят по 0,03 мл испытуемого материала интрацеребрально и по 0,5 мл - интраперитонеально. За животными наблюдают от 21 до 28 сут. Все мыши, которые погибают позже 24 ч после введения материала, или с признаками заболевания, должны быть вскрыты и исследованы макроскопически. Если при макроскопическом исследовании не были выявлены признаки заболевания, из внутренних органов (печень, почки, селезенка, легкие, головной мозг) готовят 10 % суспензии на 0,9 % растворе натрия хлорида и вводят их интрацеребрально и интраперитонеально не менее чем 5 мышам, в дозах, указанных выше. За животными наблюдают 21 сут.

Материал считается прошедшим контроль, если на протяжении периода наблюдения остаются здоровыми не менее 80% инокулированных

животных и ни у одного из них не выявляют признаки, указывающие на присутствие в вакцине посторонних агентов.

2.2.2. Испытание на новорожденных мышах

Используют не менее 20 новорожденных мышей не старше 24 ч (два-три помета). Каждому животному вводят по 0,01 мл испытуемого материала интрацеребрально и по 0,1 мл — интраперитонеально. За животными наблюдают 14 сут. Все мыши, которые погибают позже 24 ч наблюдений, или у которых наблюдаются признаки заболевания, должны быть вскрыты и исследованы макроскопически на наличие спонтанной патологии, не связанной с введением препарата. При отсутствии патологии, из внутренних органов (печень, почки, селезенка, легкие, головной мозг) мышей готовят 10 % суспензии на 0,9 % растворе натрия хлорида и вводят интрацеребрально и интраперитонеально не менее чем 5 новорожденным мышам в дозах, указанных выше. За животными наблюдают 14 сут. Материал считается прошедшим контроль, если на протяжении периода наблюдения остаются здоровыми не менее 80% инокулированных животных и ни у одного из них не выявляются признаки, указывающие на присутствие в вакцине посторонних агентов.

2.2.3. Испытание на морских свинках

Используют не менее 5 морских свинок массой 300 - 350 г. Каждому животному вводят по 0,1 мл испытуемого материала интрацеребрально и по 5,0 мл — интраперитонеально. За животными наблюдают 42 дня. Все животные, которые погибают позднее 24 ч после введения материала или с признаками заболевания, должны быть вскрыты и исследованы макроскопически, а внутренние органы (печень, селезенка, легкие, сердце) исследуются микроскопически. Материал считают прошедшим испытание, если не менее 80 % инокулированных животных остаются здоровыми к концу периода наблюдения и ни у одного из них не наблюдается признаков вирусной или туберкулезной инфекции, связанной с введением вакцинного препарата.

3. Испытание на куриных эмбрионах

Если содержащийся в контролируемом материале вакцинный штамм вируса патогенен для куриных эмбрионов, его необходимо предварительно нейтрализовать иммунной сывороткой, как было указано выше. Испытуемый материал вводят трем группам эмбрионов (по 10 шт. в каждой группе).

Первой группе куриных эмбрионов 9-10 дневного возраста материал вводят по 0,2 мл в аллантоисную полость. Эмбрионы инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 6-7 сут, затем аллантоисную жидкость исследуют в реакции гемагглютинации со смесью эритроцитов морской свинки, петуха и человека I (0) группы. С этой целью готовят 5-6 последовательных двукратных разведений аллантоисной жидкости от каждого инокулированного эмбриона, добавляют равные объемы 0,5 % суспензии эритроцитов (в 0,9 % растворе натрия хлорида), инкубируют 30-40 мин при температуре от 20 до 25 $^\circ\text{C}$ и учитывают результаты.

Материал считают прошедшим испытание, если в течение срока наблюдения не менее 80 % инокулированных эмбрионов остаются живыми и ни в одной пробе аллантоисной жидкости не выявлено гемагглютинирующих агентов.

Второй группе куриных эмбрионов 5-6 дневного возраста материал вводят по 0,2 мл в желточный мешок. Эмбрионы инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 10-12 сут. Материал считается прошедшим испытание, если к концу указанного срока инкубации остаются живыми не менее 80% инокулированных эмбрионов, а в мазках ткани желточных мешков, окрашенных гематоксилин-эозином по Романовскому-Гимзе, не выявляются элементарных телец.

Третьей группе куриных эмбрионов 10-11 дневного возраста материал вводят по 0,2 мл на хорионаллантоисную оболочку, после чего их инкубируют при $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 6-7 сут. По истечении указанного срока оболочки извлекают и просматривают в проходящем свете на черном фоне на наличие патологических изменений. Материал считается

прошедшим испытание, если к концу указанного срока инкубации остаются живыми не менее 80% инокулированных эмбрионов и на хорионаллантоисных оболочках всех эмбрионов отсутствуют изменения, видимые невооруженным глазом.

4. Испытание на присутствие микоплазм

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм». Контролю подлежат: культуральная жидкость контрольных клеточных культур, объединенный вирусный сбор, полученный в процессе приготовления вакцинного штамма, посевного вируса и полуфабриката вакцины до добавления вспомогательных веществ, живых и инактивированных вирусных вакцин.

При наличии роста микоплазм хотя бы в одной пробирке материал бракуют.

5. Испытание на присутствие микобактерий туберкулеза

Испытание на присутствие микобактерий туберкулеза проводят высевом на питательные среды или методом ПЦР в соответствии с инструкцией по применению после валидации методики.

Если субстратом производства вакцины является культура клеток птиц, испытание на отсутствие микобактерий должно проводиться бактериологически на адекватной питательной среде.

Испытанию подлежат сливы с контрольных (не зараженных вирусом) флаконов с культурой клеток. Исследование проводят путем посева культуральной жидкости на среду Левенштейна-Йенсена. Перед посевом 20 мл исследуемого материала центрифугируют (при необходимости) в течение 15 мин при 4000 об/мин, надосадочную жидкость удаляют, а осадок ресуспендируют в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и высевают по 0,2 мл в 5 пробирок со скошенной средой Левенштейна-Йенсена. Учёт производят через 45 сут инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Колонии микобактерий должны отсутствовать.

Методы выявления контаминирующих агентов в ИЛП должны быть наиболее современными и информативными, применяться с учетом сложности технологического процесса приготовления этих препаратов и в соответствии с требованиями, изложенными в нормативной документации.