

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Требования к клеточным культурам - субстратам производства иммунобио- логических лекарственных препаратов	ОФС.1.7.2.0011.15  Вводится впервые
---	---

---

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает требования к первичным и перевиваемым (диплоидным и гетероплоидным) клеточным культурам (КК) человека и животных, применяемым в качестве субстратов производства и контроля вирусных вакцин. Применение КК для производства и контроля иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) основано на системе создания главного (ГБК) и рабочего (РБК) банков клеток.

### ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Клеточная линия (КЛ)** — популяция клеток с определенными характеристиками, полученная путем последовательного субкультивирования первичной ткани донора в системе *in vitro*.

**Посевной пул клеток (ППК)** — клеточная линия, полученная из одного вида ткани донора на определенном уровне пассажа и сохраняемая в контейнерах в равных частях однородного состава при температуре не выше минус 70 °С. Один или несколько контейнеров используются для создания главного банка клеток.

**Главный банк клеток (ГБК)** — запас клеток, полученных из одного посевного пула клеток, сохраняемых в контейнерах в равных частях однородного состава на определенном уровне пассажа при температуре не выше минус 70 °С. Предназначен для последующего создания рабочего банка клеток.

**Рабочий банк клеток (РБК)** — запас клеток однородного состава, полученных из ГБК на определенном уровне пассажа, сохраняемых в контейнерах в равных частях при температуре не выше минус 70 °С. Используются для получения производственной клеточной культуры.

**Производственная клеточная культура** — клетки, полученные из РБК и используемые для производства ИЛП.

**Первичные клеточные культуры (ПКК)** – культуры, полученные из клеток тканей или органов, взятых от одного или более организмов, которые выращиваются *in vitro* от начала субкультивирования.

**Диплоидные клеточные культуры (штаммы) (ДКК)** — морфологически однородная популяция клеток человеческого или животного происхождения с ограниченным сроком жизни, сохраняющая диплоидный кариотип, идентичный донору.

**Гетероплоидные клеточные культуры (ГКК)** — однородная популяция клеток человеческого или животного происхождения с неограниченным сроком жизни, сохраняющая стабильность биологических характеристик в течение установленного срока культивирования.

**Посторонние агенты** — бактерии (в том числе, микобактерии, риккетсии, микоплазмы), грибы, вирусы, прионы (в том числе, вызывающие трансмиссивные губчатые энцефалопатии крупного рогатого скота), и др. которые случайно попали в ИЛП в ходе производственного процесса.

**ДНК инфекционная** — вирусная ДНК, способная внедряться в клеточную ДНК и вызывать образование пролиферирующих клонов.

**Удвоение популяции** — удвоение количества клеток при митотическом делении.

**Онкогенность** — свойство биологических агентов (вирусов, нуклеиновых кислот, клеточного субстрата, химических веществ, субклеточных элементов и др.) вызывать онкогенную трансформацию клеток при введении животным (при этом опухоль состоит из клеток хозяина).

**Туморогенность** — способность клеток образовывать опухоли у чувствительных животных в месте введения, возможно с образованием метастазов (опухоль состоит из инокулированных клеток).

**Пассаж** — перенос клеток из одного культурального сосуда в другой для размножения и накопления необходимого количества клеточной массы.

**Эндогенный вирус (например, ретровирус)** — вирус, геном которого интегрируется в геном чувствительной клетки хозяина и наследуется ее потомками.

## 1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Использование в качестве субстрата для производства перевиваемых клеточных линий (ДКК и ГКК) возможно только при создании системы клеточных банков.

Процесс производства ИЛП в клеточных культурах основан на современной технологии, обеспечивающей высокую степень очистки получаемого продукта от клеточных компонентов и контаминирующих агентов, в том числе эндогенных вирусов, клеточной и инфекционной ДНК. Технологический процесс должен быть валидирован.

Клеточные культуры, используемые в производстве ИЛП, получаемые из тканей животных и птиц, должны быть стерильными, жизнеспособными, морфологически однородными, неонкогенными, нетуморогенными и не содержать посторонних агентов.

При производстве ИЛП путем культивирования клеточных культур должны использоваться культуральные питательные среды, сыворотки, трипсин и другие реактивы, разрешенные в производстве иммунобиологических препаратов.

Результаты, полученные при изучении и аттестации главных (ГБК) и рабочих (РБК) банков клеток, оформляют в виде паспорта и передают для рассмотрения вместе с протоколами исследований и материалами по контролю и аттестации в установленном порядке, в котором должны быть отражены следующие показатели:

1. Наименование клеточной культуры;
2. Коллекционный шифр (клеточной линии, ГБК, РБК);
3. История получения (происхождение) клеточной культуры и создания ГБК и РБК;
4. Запас клеток (количество сохраняемых контейнеров в банках клеток, количество клеток в емкости);
5. Номер пассажа и дата закладки клеток на хранение;
6. Условия криоконсервации, режим хранения и жизнеспособность клеток после размораживания;
7. Ростовые свойства (способ культивирования, питательная среда, посевная концентрация, метод снятия клеток, кратность посева, температура культивирования, частота пассирования);
8. Подлинность (морфология, кариологическая характеристика, молекулярно-генетические методы исследования);
9. Стерильность (отсутствие микробных агентов, в том числе микоплазм);
10. Присутствие посторонних вирусов, в том числе эндогенных;
11. Туморогенность (если применимо);
12. Онкогенность (если применимо);
13. Стабильность биологических свойств (количество рекомендованных для производства пассажей);
14. Сфера применения, чувствительность к производственному штамму вируса.

## **2. Первичные клеточные культуры (ПКК)**

Для приготовления первичных клеточных культур материал должен быть получен от животных, свободных от патогенной флоры, из предварительно обследованных хозяйств, если иное не предусмотрено нормативной документацией.

ПКК высоко чувствительны к различным вирусам. Однако наличие контаминации может приводить к изменению чувствительности ПКК к

вакцинным штаммам вирусов, что делает их менее пригодным субстратом по сравнению с перевиваемыми (диплоидными и гетероплоидными) клеточными линиями.

### **3. Диплоидные клеточные культуры (ДКК)**

ДКК получают из тканей или органов здорового донора (человека или животного), не имеющего в генеалогии онкологических, венерических и генетических заболеваний, врожденных аномалий, заболеваний гепатитами, туберкулезом и СПИД. ДКК получают общепринятыми методами дезинтеграции клеток. После формирования клеточного монослоя культуру периодически пассируют (один-два раза в неделю). В результате пассирования клетки становятся перевиваемыми линиями, сохраняющими диплоидный кариотип со структурой, идентичной донору. ДКК растут в богатых витаминами и минеральными солями питательных средах с содержанием 10-15 % сыворотки крови плодов крупного рогатого скота.

ДКК должны иметь ограниченный срок жизни, стабильный кариотип ( $2n$  не менее 75 %), не содержать посторонних агентов (бактерий, в том числе, микоплазм, грибов, простейших, вирусов), сохранять стабильность всех биологических свойств в фазе активного роста (первые две трети срока жизни клеточных культур), обладать высокой чувствительностью к заражению специфическими агентами. Как правило, у ДКК отсутствует онкогенная и туморогенная активность.

### **4. Гетероплоидные клеточные культуры (ГКК)**

ГКК могут быть получены при: серийном субкультивировании первично-трипсинизированных клеток опухолей человека или животных; трансформации нормальных клеток с ограниченным сроком жизни онкогенным вирусом (например, В-лимфоциты, трансформированные вирусом Эпштейна-Барр); серийном субкультивировании первично-трипсинизированных нормальных культур с выделением доминантной популяции спонтанно трансформированных клеток (например, *Vero*, ВНК-21,

СНО, MDCK); слиянии миеломных клеток с В-лимфоцитами, продуцирующими антитела (гибридомы).

Основными преимуществами ГКК являются: возможность получения полной характеристики клеточной линии, нетребовательность к составу питательной среды, возможность адаптации к росту в бессывороточной среде, получение больших объемов в биореакторах, на микроносителях или в суспензии.

ГКК должны иметь неограниченный срок жизни, типичную морфологию для данной линии, зимограмму и иммунологические маркеры, характерные для донора клеток, кариотип, определяющий видовую принадлежность клеточной культуры донора, обладать онкогенной и туморогенной безопасностью, высокой чувствительностью к заражению специфическим агентом, сохранять стабильность всех биологических свойств в течение срока, рекомендуемого для производства ИЛП.

Вместе с тем, ГКК могут содержать и экспрессировать эндогенные вирусы, в том числе онкогенные, что не исключает теоретический риск онкогенной и инфекционной опасности готового продукта, связанной с остаточной клеточной ДНК и/или трансформирующими белками. Поэтому возможность использования таких клеток для получения ИЛП должна быть обоснована. В этом случае вопрос об их применении в качестве субстрата оценивается решением польза/риск.

Препараты, изготовленные на гетероплоидных тканевых культурах, должны быть исследованы на содержание остаточной клеточной ДНК.

## **5. Криоконсервация**

Среда для криоконсервации обычно состоит из базовой питательной среды, криопротектора и источника белка и подбирается в зависимости от вида культуры. В качестве криопротектора широко применяются глицерин или диметилсульфоксид (ДМСО), которые быстро проникают в клетки и прочно связывают в ней воду. Возможно также использование других криопротекторов.

Для криоконсервации клетки ресуспендируют в смеси, состоящей из 80 % питательной ростовой среды, 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота, 10% глицерина (или ДМСО), разливают в ампулы, вместимостью 2,0 или 5,0 мл и замораживают в сосудах Дюара с жидким азотом. При замораживании температуру снижают постепенно на 1 °С в минуту до минус 25 °С, затем до минус 70 °С. Возможно использование других методов криоконсервации. Клеточные культуры могут храниться при температуре минус 196 °С в течение 10 и более лет.

После размораживания следует исследовать жизнеспособность клеток, определяя их количество путем подсчета живых и погибших клеток после окрашивания. Для определения физиологического состояния клеток «сохранные/«поврежденные» широко применяется окрашивание 0,1 % раствором трипанового синего в гемоцитометрах.

## **6. Методы испытания клеточных культур**

### **Морфология**

Для морфологического изучения клеточные культуры выращивают на предметных или покровных стеклах в течение 48-72 ч, фиксируют 96 % этиловым спиртом или жидкостью Карнуа в течение 10 -15 мин при температуре от 20 до 22 °С, окрашивают гематоксилин-эозином или азур-эозином и просматривают в световом микроскопе. В нормативной документации могут быть указаны иные условия приготовления препаратов. Определяют тип роста клеток (эпителиоподобный или фибробластоподобный), гомогенность цитоплазмы, наличие эозинофильных включений, характерные особенности ядра, ядрышек и др. органелл.

Необходимо также описывать оптимальные условия и способ культивирования: стационарный, роллерный, суспензионный или псевдосуспензионный, на микроносителях (декстрановых, покрытых коллагеном или желатином, целлюлозных или полистироловых). Должны быть представлены: посевная доза, метод снятия клеток, кратность посева, частота пассирования.

Для изучения морфологии клеток применяют также метод электронной микроскопии, высокая разрешающая способность которого позволяет выявлять дифференцировку клеток, различать их тончайшие структуры и наличие многочисленных клеточных органелл.

### **Определение видовой идентичности**

В процессе пассирования клеточных культур возможна видовая и внутривидовая контаминация одних клеточных линий другими. Разработка методов идентификации клеточных культур предполагает определение и изучение стабильности клеточных признаков. С этой целью разработаны и применяются методы электрофореза, кариологического анализа хромосом и молекулярно-генетические методы (ПЦР).

Основными биохимическими маркерами, специфичными для данного вида донора, позволяющими определять внутривидовую и видовую контаминацию клеточных культур, является анализ полиморфизма изоферментов, обладающих одинаковой специфичностью к субстрату. Такими изоферментами являются глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г6ФДГ), лактат-дегидрогеназы (ЛДГ), нуклеозидфосфорилаза (НФ) и др.

Метод основан на сравнении электрофореграммы изоферментов исследуемой линии клеток с электрофореграммой изоферментов клеток известного вида донора. Каждому виду соответствует определенный набор изоферментов. Совпадение электрофоретической подвижности полос в опытном и контрольном (стандартном) образцах позволяет заключить, что исследуемые клетки принадлежат данному виду.

Изоферменты можно выявить при помощи электрофореза в полиакриламидном, агарозном гелях или на пленках из ацетата целлюлозы. В настоящее время используют в основном агарозные и полиакриламидные гели. Различные изоферменты мигрируют с различной скоростью и по окончании электрофореза могут быть выявлены окрашиванием с соответствующим хромогенным субстратом. Учет результатов на



окрашенных гелях (зимограммах) может быть проведен визуально или денситометрией зимограммы (или ее фотографии) (ОФС «Электрофорез»).

Видовая контаминация клеток может быть также выявлена при помощи гель-электрофорезной системы Authentikit, которая позволяет выявлять до 7 различных видов изоферментов.

### **Метод кариологического анализа хромосом**

Метод кариологического анализа хромосом предназначен для определения стабильности кариотипа культур клеток в соответствии с требованиями к кариологическим параметрам видовой идентификации клеток, основанной на сравнении кариотипа испытуемого образца со стандартным образцом с нормальным кариотипом известного вида. Совпадение по кариотипу испытуемого и стандартного образцов позволяет заключить, что испытуемый образец принадлежит данному виду.

Кариологический анализ хромосом проводят на фиксированных препаратах в период митотической активности клеток, используя методы дифференциального окрашивания (C, G, Q и R).

### **Получение препаратов для кариологического анализа хромосом.**

Испытуемые клетки в концентрации от  $1,5 \cdot 10^5$  до  $2,0 \cdot 10^5$  в 1,0 мл выращивают во флаконах при температуре  $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Через 36-48 ч после посева клеток во флакон вносят колхицин из расчета 0,1 мл 0,04 % раствора на 1 мл питательной среды и оставляют при температуре  $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Через 4-5 ч питательную среду сливают, клетки снимают с подложки 0,25 % раствором трипсина, центрифугируют в течение 5 мин при 1000 об/мин, надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспендируют в гипотоническом растворе калия хлорида и оставляют на 20 мин при температуре  $37 ^\circ\text{C}$ . Затем к клеткам добавляют смесь для фиксации, состоящую из 3 частей метанола и 1 части ледяной уксусной кислоты. Клетки фиксируют при температуре от 8 до  $10 ^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Смену фиксатора повторяют 2 - 3 раза с промежуточным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин.

Несколько капель суспензии в фиксаторе наносят на влажные и охлажденные до температуры от 8 до 10 °С предметные стекла и высушивают в струе теплого воздуха.

Для подсчета модального класса и полиплоидии хромосом клетки окрашивают 1 % раствором красителя азур-эозина по Романовскому-Гимзе.

Дифференциальное окрашивание С-методом применяют для выявления структурного гетерохроматина, локализованного в околоцентрических и центромерных районах хромосом, в коротких плечах акроцентрических аутосом и в длинном плече Y-хромосомы.

Дифференциальное окрашивание G-методом применяют при выявлении структурных перестроек и для идентификации маркерных хромосом. Метод позволяет идентифицировать каждую хромосому.

Дифференциальное окрашивание Q-методом применяют для идентификации Y-хромосомы и структурных перестроек. Он основан на окрашивании флюорохромами с двумя производными акрихина – акрихин-дигидрохлоридом и акрихин-ипритом с исследованием в люминисцентном микроскопе.

Дифференциальное окрашивание R-методом выявляет различия в окрашивании гомологичных G- или Q-негативных участков сестринских хроматид или гомологичных хромосом, что подтверждает специфичность и стабильность рисунка полос для каждой хромосомы.

Отбор клеток, находящихся в метафазе, для подсчета полиплоидии и выявления aberrаций хромосом, следует проводить по принципу общей цитологической пригодности.

Частоту полиплоидии ( $2n$ ,  $4n$  и т.д.) в популяции делящихся клеток определяют под микроскопом на основании подсчета в метафазных пластинках.

Точный подсчет хромосом и изучение структурных нарушений проводят с масляной иммерсией (объектив микроскопа 90x).

При цитогенетическом анализе, как правило, учитывают: число исследованных метафаз, число aberrаций, число aberrантных клеток, типы aberrаций и их частоту, распределение aberrаций по группам хромосом. Для изучения клеточных культур банка рабочих клеток необходимо исследовать как минимум 500 метафазных пластинок на уровне производственного или любого следующего пассажа на чистоту полиплоидии, провести точный подсчёт хромосом, определить частоту разрывов хромосом, структурных нарушений, деспирализацию или заметное ослабление первичных или вторичных перетяжек.

Для определения кариотипа отбирают метафазные пластинки для последующей компьютерной обработки препаратов.

### **Молекулярно-генетические методы идентификации клеточных культур**

Описанный выше метод является информативным и специфичным, однако длительность проведения анализа и необходимость в профессиональных навыках оператора делают его трудоемким для выполнения и сложным для интерпретации.

В настоящее время более широкое применение получил метод мультиплексной ПЦР с видоспецифическими праймерами.

Метод основан на выявлении видоспецифических участков митохондриальной ДНК (мтДНК) в области гена, кодирующего субъединицу 1 цитохром с-оксидазы (СОХ1) и цитохрома b с помощью видоспецифичных праймеров с детекцией результатов с помощью электрофореза и ПЦР в реальном времени. Реакция проводится в соответствии с инструкциями по применению тест-систем после валидации методики.

В последние годы широкое распространение получили молекулярно – генетические методы идентификации клеточных культур. Таким способом оценки генетического соответствия клеточной линии является секвенирование полноразмерного генома исследуемого образца с последующим сравнением с эталонным штаммом.

## **Иммунологические методы идентификации клеток**

Иммунологические методы идентификации клеток включают реакцию гемагглютинации, метод смешанной агглютинации, реакцию гемадсорбции, иммунофлуоресценции (РИФ), определение антигенов гистосовместимости и различия в чувствительности клеток разных видов животных к отдельным группам вирусов. Существует также ряд методов, основанных на применении специфического связывания антител с клеточной поверхностью: иммунный лизис (используют антитела к нежелательным клеткам, например фибробластам в популяции эпителиальных клеток), направленная доставка цитотоксина, сортировка клеток с активацией флуоресценции или на магнитных гранулах с иммобилизованными антителами.

## **Изучение туморогенности**

Для оценки туморогенной активности клеток используются две биологические системы — *in vivo* и *in vitro*. Испытанию подлежат клетки из ГБК или РБК, субкультивированные в течение не менее трех пассажей, превышающих рекомендованные для производства ИЛП.

В системе *in vivo* используют иммуносупрессированных или имеющих генетическую иммунную недостаточность животных (например, бестимусные мыши с мутацией по гену *nude*, мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (ТКИ) или с супрессией функции Т-клеток антитимоцитарным глобулином (АТГ), антитимоцитарной (АТС) или антилимфоцитарной (АЛС) сыворотками).

Наиболее подходящей моделью, позволяющей получать достоверные и стандартные результаты для выявления туморогенности клеток, являются взрослые мыши *nude*.

## **Изучение туморогенности в системе *in vivo* на бестимусных мышах**

Взрослым самкам мышей линии Balb/c с мутацией по гену *nude* (генотип *nu/nu*) массой 19 – 20 г (не менее 30 голов) подкожно или внутримышечно вводят по 1 млн клеток исследуемой клеточной культуры. Контрольной группе мышей (30 животных) вводят по 1 млн заведомо

туморогенных клеток (например, линии HeLa). Мышей содержат в специализированном кондиционированном виварии.

За животными опытной и контрольной групп наблюдают в течение 21 сут. Животных обследуют ежедневно путем пальпации места инокуляции клеток и лимфатических узлов (регионарных, аксиллярных и подколенных). Оценивают общее состояние мышей и отдельно фиксируют гибель животных, связанную с наличием иммунодефицита и появление опухолевого роста. Образовавшиеся узлы измеряют штангенциркулем (в мм) и вычисляют объем  $V_{cp}$  по формуле:

$$V_{cp} = a \cdot b \cdot c,$$

где:  $a$  – длина,  $b$  – ширина,  $c$  – высота опухоли

После окончания срока наблюдения проводят эвтаназию животных и при макроскопическом исследовании определяют наличие узлов в месте введения клеток, в лимфатических узлах, легких, почках, печени и селезенке. Все поражения, напоминающие опухоли, а также лимфатические узлы и органы всех животных исследуют гистологически.

Если изучаемые клетки являются заведомо туморогенными, следует определить уровень их туморогенности, основанный на расчете значения 50% туморопродуцирующей дозы (ТПД<sub>50</sub>). Для расчета ТПД<sub>50</sub> изучаемые клетки вводят экспериментальным животным в дозах  $10^7$ ;  $10^5$ ;  $10^3$  и  $10^1$  и данные выражают как 50 % доза опухолеобразования (ДОО<sub>50</sub>).

### **Изучение туморогенности в системе *in vitro* методом инвазивности в органную культуру**

Метод основан на внесении испытуемых клеток в органную культуру кожи куриного эмбриона и состоит из нескольких этапов:

- приготовление эмбрионального экстракта из мышечной ткани 7 сут куриных эмбрионов;
- приготовление питательной среды, состав которой состоит из 100 мл раствора Эрла, 20 mM HEPES, 4,0 мл куриного эмбрионального

экстракта, 4,0 мл сыворотки крови плода коровы, 10 мл 1% агара, разогретого до температуры 40 – 50 °С, и антибиотиков.

Среду разливают в лунки пластиковой панели, закрывают крышкой и оставляют при температуре 20 – 22 °С до застывания среды.

После этого в лунку со средой помещают фрагмент кожи (5-7 мм) 9 сут куриного эмбриона. Испытуемые клеточные культуры снимают с подложки общепринятым методом, ресуспендируют в питательной среде 199, и на три кожных фрагмента наносят по 1,0 мл испытуемой клеточной суспензии в виде капли в концентрации  $10^6$  кл/мл.

Таким же образом на 2 - 3 кожных фрагмента наносят суспензию клеток HeLa (положительный контроль). В качестве отрицательного контроля оставляют 2 - 3 неинокулированных фрагментов кожи.

Панель закрывают крышкой и инкубируют в атмосфере CO<sub>2</sub> при температуре 36 - 37 °С.

Через 72 ч инкубации готовят гистологические препараты фрагментов кожи толщиной по 5 – 7 микрон и окрашивают гематоксилин-эозином.

Опыт учитывают, если:

а) в контрольных фрагментах кожи не отмечено признаков деструкции органной культуры;

б) в положительном контроле имеются признаки инвазии испытуемых клеток в органные культуры кожи куриного эмбриона, т.е. проникновение и распространение пролиферирующих клеток в собственно дерму.

Клетки испытуемых клеточных культур рассматривают как туморогенные, если хотя бы в одном из образцов органной культуры наблюдается инвазивный рост.

### **Изучение онкогенности**

Онкогенная активность клеточного субстрата может быть обусловлена онкогенными компонентами, присутствующими в клетке (клеточной или вирусной ДНК, РНК или трансформирующими белками).

На наличие онкогенности исследуют клетки, субкультивированные в системе *in vitro* в течение не менее трех пассажей, превышающих рекомендованные для производства ИЛП.

Изучение онкогенности проводят в системе *in vivo*, как указано в разделе «Испытание туморогенности», вводя экспериментальным животным клеточный лизат.

Испытание проводят на:

- новорожденных бестимусных мышах (генотип Nu/Nu) не старше 24 ч;
- новорожденных крысах или хомяках (не старше 24 ч);
- новорожденных мышах линии NIH Swiss.

Для снижения риска потенциальной опасности остаточной ДНК необходимо:

- контролировать методом ПЦР количество гетерогенной ДНК в препаратах, вводимых парентерально;
- чтобы количество ДНК в одной человеческой дозе ИЛП составляло не более 10,0 нг;
- проводить валидацию методов инактивации и очистки инактивированных препаратов, которые должны обеспечивать дефрагментацию и снижение количества гетерогенной ДНК в ИЛП;

В препаратах, вводимых перорально, количество гетерогенной ДНК не определяют. Однако при разработке такого продукта следует учитывать особенности производственного процесса с целью уменьшения количества остаточной клеточной ДНК.

#### **Испытание клеточных культур на присутствие посторонних агентов**

Испытание ИЛП на присутствие посторонних вирусов проводят на клеточных культурах, лабораторных животных и куриных эмбрионах в соответствии с ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов».

Испытание клеточных культур на стерильность проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Если субстратом производства является культура клеток птичьего происхождения, испытание на присутствие микобактерий туберкулеза проводят на адекватных питательных средах. Исследуемый материал высевают на среду Левенштейна—Йенсена в соответствии с ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов».

Выявление микоплазм проводят микробиологическим и цитохимическим методами (ОФС «Испытание на присутствие микоплазм»). В качестве дополнительного метода может быть применена ПЦР.

Испытание на эндогенные ретровирусы проводят электронно-микроскопическим методом, с помощью ПЦР, а также методами иммунофлюоресценции или ИФА с использованием адекватных тест-систем в соответствии с инструкциями по применению после валидации методик.

Если в испытуемых клетках проявляется активность обратной транскриптазы, необходимо провести испытание на определение инфекционной способности, связанной с реплицирующимся вирусом.

Электронная микроскопия позволяет изучать ультратонкие срезы клеток и получать изображения вирусов-контаминантов.

Сыворотка крови крупного рогатого скота и трипсин, применяемые при культивировании клеточных культур, должны быть проверены на присутствие вирусов, бактерий (включая микоплазмы) и грибов. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов».

Для инактивации потенциальных вирусов-контаминантов возможно использовать  $\gamma$ -облучение. Если используется облучение, дозы должны быть достаточно низкими и не изменять биологические свойства облучаемых материалов.



Испытание сыворотки и трипсина на стерильность и присутствие микоплазм проводят с помощью методов, изложенных в ОФС «Стерильность» и ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

В качестве дополнительных методов для выявления вирусов (парвовируса свиней типа 1, цирковирусов свиней 1 и 2 типов, аденовирусов, вирусов, вызывающих гастроэнтериты, вирусов энцефалита свиней и др.) возможно использование иммуноферментного анализа (ИФА) и ПЦР в соответствии с инструкциями по применению после валидации методик.

Для инактивации потенциальных вирусов-контаминантов возможно использовать  $\gamma$ -облучение. Если используется облучение, его дозы должны быть достаточно низкими и не изменять биологические свойства облучаемых материалов.