

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вакцина бруцеллезная живая

ФС.3.3.1.0011.15

Взамен ГФ X, ст.718,

ФС 42-3177-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину бруцеллезную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения, представляющую собой культуру живых микробов бруцеллезного вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 ВА, высушенную методом лиофилизации в стабилизирующей среде. Вакцина предназначена для профилактики бруцеллеза и обеспечивает развитие иммунитета продолжительностью 10–12 мес, с сохранением максимальной напряженности иммунитета в течение 5–6 мес.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны гарантировать соблюдение установленных надлежащих правил, а также качества лекарственного препарата, гарантирующее его безопасность для человека.

Вакцинный штамм *Brucella abortus* 19 ВА, биовар I должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и антигенные свойства; не содержать бактериофага; остаточная вирулентность для белых мышей массой (19 ± 1) г должна быть в пределах инфицирующих доз (ID_{50}) от $5 \cdot 10^2$ до $5 \cdot 10^5$ микробных клеток (м.к.); быть безопасным: при подкожном введении белым мышам массой (19 ± 1) г дозы $2 \cdot 10^9$ м.к не вызывать их гибель в течение 6 сут наблюдения; при введении морским свинкам

подкожно дозы $2 \cdot 10^9$ м.к./мл через 14 сут должен определяться от $5 \cdot 10^2$ до $5 \cdot 10^4$ м.к./мл в 1 мл взвеси селезенки; быть иммуногенным: предохранять от заражения вирулентным штаммом *B. melitensis* 565 не менее 7 из 10 морских свинок, привитых подкожно $2 \cdot 10^9$ живых м.к./мл.

Перед приготовлением производственной культуры *B. abortus* 19 ВА проводят пассаж штамма через организм морской свинки с последующим отбором типичных колоний, выросших на плотной питательной среде из посевов селезенки или регионарных лимфатических узлов.

Технология производства вакцины бруцеллезной живой предусматривает получение посевных культур *B. abortus* 19 ВА I, II, III и IV генераций; процесс накопления биомассы, выращенной для приготовления микробной взвеси с необходимой концентрацией; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание, герметизацию и упаковку препарата. В зависимости от технологии приготовления вакцины в процессе производства используются стабилизаторы, разрешенные для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов: сахара, желатин, тиомочевина, натрия глутамат моногидрат.

На стадиях приготовления посевных культур определяют рН, концентрацию м.к., отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов, проводят контроль посевных культур на диссоциацию, отсутствие бактериофага и дифференциацию по чувствительности бруцелл к анилиновым красителям (тест бактериостатического действия анилиновых красок).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса белого или белого с желтоватым оттенком цвета.

Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого или белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма бруцеллезного микроба. Определение проводят иммунофлуоресцентным методом (РИФ) с помощью иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих бруцеллезных, меченных ФИТЦ, в соответствии с инструкцией по применению. В мазках из вакцины должно наблюдаться специфическое ярко-зеленое свечение по периферии микробных клеток.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 1 мин при добавлении 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

рН. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют 20 ампул, содержимое каждой ампулы растворяют в 1 мл воды для инъекций.

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Размер частиц. Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Средняя масса и отклонение от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. В препарате должна содержаться живая чистая культура вакцинного штамма бруцелл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева на тиогликолевую среду.

За 1 образец принимают содержимое 2 ампул с препаратом. В ампулы вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают и по 1 мл каждого образца высевают в пробирки, содержащие по 20 мл тиогликолевой среды. Одну пробирку из каждого образца инкубируют при температуре от 30 до 35 °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов, другую – при температуре от 20 до 25 °С для выявления грибов. Через 5 – 7 сут из каждой пробирки производят пересев по 0,5 мл в 2 пробирки, содержащие 10 мл тиогликолевой среды. Все пробирки выдерживают после посева при соответствующих температурных режимах до 14 сут со дня первичного посева. Через 14 сут из всех пробирок делают мазки, окрашивают по Граму, просматривают под микроскопом при увеличении 90×10.

В случае обнаружения хотя бы в 1 из 10 просмотренных полей зрения кокков или грамположительных палочек препарат считается контаминированным посторонней микрофлорой.

При выявлении в мазках грамтрицательных палочек, отличающихся по морфологии от бруцелл, из этого образца готовят 3 мазка, которые исследуют в реакции иммунофлуоресценции (РИФ), обрабатывая иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими бруцеллезными сухими, и просматривают в каждой мазке не менее 10 полей зрения с помощью люминесцентного микроскопа. Если не все бактерии, обнаруживаемые в препарате, дают в ультрафиолетовом спектре специфическое ярко-зеленое свечение по периферии клеток (при использовании сывороток, меченых ФИТЦ), образец считают контаминированным посторонней микрофлорой. В этом случае контроль повторяют на удвоенном количестве образцов. В случае обнаружения посторонней микрофлоры при повторном посеве хотя бы в 1 пробирке вакцину считают не выдержавшей испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Препарат, введенный подкожно белым мышам массой (19 ± 1) г в дозе $2 \cdot 10^9$ м.к., не должен вызывать их гибель в течение 6 сут наблюдения.

Вакцину разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации $4 \cdot 10^9$ м.к. в 1 мл. Полученную микробную взвесь вводят подкожно 5 белым мышам массой (19 ± 1) г в объеме 0,5 мл во внутреннюю поверхность бедра.

Если погибла хотя бы 1 мышь, испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле наблюдается гибель хотя бы 1 животного, вакцину считают не выдержавшей испытание.

Специфическая активность

1. Концентрация микробных клеток (ОК). В препарате должно содержаться $(7,0 \pm 3,0) \cdot 10^{10}$ бруцелл в 1 мл. Колебания результатов определений в отдельных ампулах серии не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Количество м.к. определяют в 3 образцах. В ампулу с препаратом вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают до получения равномерной суспензии. Вносят 0,1 мл разведенного испытуемого образца в пробирки и добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида до достижения концентрации стандартного образца (СО) мутности, эквивалентной 10 МЕ.

Концентрацию м.к. (ОК) определяют по формуле:

$$\text{ОК} = (0,1 + n) \cdot 10 \cdot 1,7 \cdot 10^9,$$

где: 0,1 – объем растворенной вакцины, мл;

n – объем 0,9 % раствора натрия хлорида, взятый для разведения пробы, мл;

10 – постоянная величина;

$1,7 \cdot 10^9$ – концентрация м.к./мл для бруцелл по СО мутности, эквивалентная 10 МЕ.

2. Количество живых микробных клеток. Количество живых м.к. должно составлять не менее 60 % от общего количества микробных клеток в ампуле. Колебания результатов определений в отдельных ампулах серии не должны превышать 20 % от средней арифметической величины.

При определении содержания живых м.к. в вакцине используют концевые химически чистые пипетки и бактериологические пробирки с 0,9%

раствором натрия хлорида, которые должны быть охлаждены до температуры $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Испытание осуществляют одновременно с определением количества живых м.к. в стандартном образце вакцины бруцеллезной живой.

Для определения количества живых микробных клеток из приготовленных ранее образцов взвесей вакцины делают последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-9} , используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Из разведений 10^{-8} и 10^{-9} высевают по 0,1 мл взвеси раздельно для каждого образца на 3 чашки Петри с эритрит-агаром или мясопептонным агаром.

После инкубации посевов в течение 5 сут при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ подсчитывают количество выросших колоний, вычисляют среднее количество колоний для каждого разведения. К полученному числу добавляют количество нулей, равное показателю степени взятого разведения, суммируют и делят на количество посеянных разведений, т.е. на 2. Данное число увеличивают в 10 раз и получают количество живых бруцелл, содержащихся в 1 мл вакцины.

За количество живых м.к. принимают среднюю арифметическую определений количества живых клеток в 3 ампулах.

Процентное содержание живых микробных клеток вычисляют для каждой ампулы, принимая за 100 % число м.к., исходя из показателя концентрации для данной ампулы по формуле:

$$\% \text{ живых м. к.} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \cdot 100 \%,$$

где: БК – количество живых м.к. в 1 мл;

ОК – общая концентрация м.к.

3. Количество подкожных доз. В ампуле должно содержаться от 4 до 10 подкожных доз. Количество прививочных доз в ампуле устанавливается

путем деления среднего (по 3 ампулам) количества живых м.к./мл на 10^{10} м.к., составляющих 1 накожную прививочную дозу.

4. **Иммуногенность.** Не менее 7 из 10 морских свинок, привитых подкожно дозой $2 \cdot 10^9$ живых бруцелл в 1 мл, должны быть предохранены от заражения 2 минимальными заражающими дозами вирулентного штамма *B. melitensis* 565. Одна минимальная заражающая доза *B. melitensis* 565 не должна превышать 10 м.к.

Иммунизируют подкожно дозой $2 \cdot 10^9$ живых м.к. в объеме 1 мл вакцины 10 морских свинок массой (350 ± 50) г любого пола. Через 28 – 30 сут иммунизированных и 3 неиммунизированных (контрольных) животных заражают подкожно путем введения 2 инфицирующих доз вирулентного штамма *B. melitensis* 565 в объеме 1 мл. Параллельно проверяют количество живых бруцеллезных бактерий в дозе для заражения, делая высев из разведения 10^{-7} по 0,1 мл на 3 чашки Петри с эритрит-агаром или мясопептонным агаром. Через 6 – 7 сут инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С на каждой чашке Петри должно вырасти не менее 2 колоний.

Иммунизированных и контрольных морских свинок через 28 – 30 сут подвергают эвтаназии и вскрывают. Печень, селезенку, лимфоузлы (паховые, парааортальные, шейные) помещают в стерильную чашку Петри. Каждый орган надсекают ножницами, берут уколом стерильной деревянной палочкой и вносят в пробирку со скошенным печеночным агаром или агаром Альбими, тщательно втирая материал в поверхность агара. Затем посевной материал вносят в пробирки с эритрит-бульоном. Для посева каждого органа используют отдельную палочку.

Выросшие колонии бруцелл петлей высевают на среды с анилиновыми красками. Через 7 сут инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С выделенные культуры дифференцируют по редуцирующей способности бруцелл к анилиновым краскам и образованию сероводорода. *B. abortus* растет только на средах с фуксином, *B. melitensis* – в присутствии фуксина и тионина.

При выращивании культуры бруцелл только в бульоне ее пересевают на питательный агар и затем идентифицируют.

Не менее чем у 7 морских свинок, иммунизированных вакциной, при высевах из органов не должно быть роста *B. melitensis*. У всех контрольных (неиммунизированные) морских свинок должно быть обнаружено инфицирование, т.е. выделение *B. melitensis* из паренхиматозных органов (печень, селезенка) и лимфоузлов. В случае если вакцина защищает меньшее количество морских свинок, опыт повторяют по той же методике и на том же количестве животных в сравнении со стандартным образцом вакцины бруцеллезной живой. Если при повторном контроле стандартный образец предохраняет от заражения при введении 2 минимальных доз вирулентного штамма *B. melitensis* 565 не менее чем 7 из 10 иммунизированных свинок, а испытываемая – меньшее количество морских свинок, препарат считают не выдержавшим испытание.

Термостабильность. Не менее 7 сут. Показатель термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50 % живых микробных клеток по отношению к первоначальному количеству) определяют в 3 образцах после хранения вакцины при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 14 сут.

Методика определения количества живых м.к. изложена в разделе «Специфическая активность».

Показатель термостабильности (t), выраженный в сут, рассчитывают по формуле:

$$t = \frac{0,3 \cdot 14}{\lg A_0 - \lg A_n},$$

где $\lg A_0$ – логарифм первоначального количества живых м.к./мл;

$\lg A_n$ – логарифм количества живых м.к./мл через 14 сут хранения вакцины при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;

0,3 – постоянная величина;

14 – срок хранения вакцины при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, сут.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС

«Иммунобиологические лекарственные препараты».

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