

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вакцина чумная живая

ФС.3.3.1.0022.15

Взамен ГФ X, ст. 713

ФС 42-3877-99

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину чумную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций, представляющую собой живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, высушенную методом лиофилизации в стабилизирующей среде.

Вакцина предназначена для профилактики чумы и вызывает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ должен обладать типичными морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами; содержать плазмиды pFra, пестициногенности (pPst) и кальций-зависимости (pCad) с молекулярными массами ≈ 60 , ≈ 6 и ≈ 47 MDa соответственно; не должен вызывать гибель морских свинок и потерю их массы при введении в дозе $15 \cdot 10^9$ микробных клеток (м.к.). Иммуногенность штамма по величине ED₅₀ при подкожном введении не должна превышать для морских свинок 10^3 м.к., для белых мышей – 10^4 м.к.

Перед приготовлением очередной серии вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ проводят его пассаж через организм морской свинки с последующим отбором типичных колоний, выросших на чашках Петри с

агаром Хоттингера из посевов селезенки и регионарных лимфатических узлов.

Технология изготовления вакцины предусматривает получение посевных культур *Y. pestis* EV линии НИИЭГ I, II и III генераций; процесс накопления биомассы, выращенной для приготовления вакцинной взвеси с необходимой концентрацией; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание, герметизацию и упаковку препарата. На стадиях приготовления посевных культур определяют рН, концентрацию микробных клеток и отсутствие посторонней микрофлоры.

В зависимости от технологии приготовления вакцины в процессе производства используются вспомогательные вещества, разрешенные для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов: сахароза, желатин, тиомочевина, декстрин, аскорбиновая кислота.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса серовато-белого цвета.

Подлинность. Вакцина должна содержать чистую культуру вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Определение проводят иммунофлуоресцентным методом с помощью иммуноглобулинов чумных диагностических флуоресцирующих, в соответствии с инструкцией по применению. В мазках из препарата микробные клетки должны светиться по периферии ярко-зеленым цветом.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Восстановленный препарат – гомогенная суспензия серовато-белого цвета без посторонних примесей и хлопьев. Определение проводят визуально.

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».

pH. От 6,8 до 7,8. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют 5 образцов.

Потеря в массе при высушивании. Не более 4,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». Для испытания используют 5 образцов.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах (флаконах) 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. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева на тиогликолевую среду.

В ампулу (флакон) с вакциной вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. По 1 мл каждого образца полученной взвеси засевают 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 по 10 мл тиогликолевой среды, и инкубируют при указанных выше температурах. Через 14 сут выращивания со дня первичного посева из всех пробирок делают мазки, окрашивают их по Граму, просматривают под микроскопом при увеличении К7×40.

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

При выявлении в мазках грамотрицательных палочек, отличающихся по морфологии от чумного микроба, готовят мазки, которые окрашивают иммуноглобулинами чумными диагностическими флуоресцирующими в соответствии с инструкцией по применению и просматривают в каждой мазке не менее 10 полей с помощью люминесцентного микроскопа. Если не все бактерии, обнаруживаемые в вакцине, дают специфическое ярко-зеленое свечение по периферии клеток, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Испытание проводят на морской свинке массой (275 ± 25) г.

Содержимое ампулы (флакона) растворяют в 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, определяют концентрацию по методике, описанной в разделе «Специфическая активность (концентрация микробных клеток)», разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации $15 \cdot 10^9$ м.к./мл и вводят подкожно в объеме 1 мл одной морской свинке во внутреннюю поверхность бедра.

На 6 сут морскую свинку взвешивают, подвергают эвтаназии, отмечают патологоанатомические изменения, обнаруживаемые при вскрытии. Печень, селезенку, легкие, регионарные лимфатические узлы, кровь и ткани из места введения высевают методом отпечатков на чашку Петри с агаром Хоттингера, pH $(7,2 \pm 0,1)$, с добавлением натрия сернистоокислого 0,25 г на 1 л среды и на чашку Петри с агаром Хоттингера, pH $(7,2 \pm 0,1)$, с добавлением генцианвиолета 0,05 г на 1 л среды. Посевы инкубируют при температуре (27 ± 1) °C в течение 3 сут.

Вакцина не должна вызывать у морской свинки потерю массы к 6 сут после введения больше чем на 20 %, не должна вызывать видимых патологоанатомических изменений в легких – кровоизлияний, очагов воспаления, гранулем, абсцессов; в посевах крови и легких не должно быть роста чумного микроба. В месте введения допускается развитие кровоизлияния и инфильтрата подкожной клетчатки, переходящих в некроз.

Во внутренних органах (селезенка и печень) допустимо развитие ограниченной узелковой реакции.

Специфическая активность

1. Концентрация микробных клеток. В препарате должно содержаться от $5 \cdot 10^{10}$ до 10^{11} м.к. в 1 мл. Определение проводят в 3 образцах для каждой серии. Колебания результатов определений в отдельных образцах не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Содержимое ампулы (флакона) растворяют в 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. В стандартную пробирку вносят 0,1 мл разведенного препарата и добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида до достижения концентрации стандартного образца (СО) мутности (10 МЕ). Объем 0,9 % раствора натрия хлорида, использованный при разведении, учитывают при расчете концентрации микробных клеток (ОК) по формуле:

$$\text{ОК} = (0,1 + n) \cdot 10,$$

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

n – объем 0,9 % раствора натрия хлорида, использованный при разведении пробы, мл;

10 – постоянная величина.

2. Количество живых микробных клеток. Количество живых микробных клеток должно составлять не менее 25 % от общего количества микробных клеток. Колебания результатов определения в отдельных образцах не должны превышать 20 % от средней арифметической величины.

При определении количества живых микробных клеток в вакцине используют концевые химически чистые пипетки и пробирки с 0,9 % раствором натрия хлорида, которые должны быть охлаждены до температуры от 2 до 8 °С.

Для определения количества живых микробных клеток из приготовленных ранее образцов взвесей вакцины делают последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-8} , используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Из пробирок с разведениями 10^{-7} и

10^{-8} высевают пипеткой по 0,1 мл взвеси на 2 чашки Петри с питательной средой для выделения и культивирования чумного микроба или с агаром Хоттингера со стимулятором роста (кровь гемолизированная до 1 % концентрации) или натрий сернистоокислый (0,25 г на 1 л среды).

Через 72 – 96 ч инкубации при температуре $(27 \pm 1) ^\circ\text{C}$ подсчитывают количество колоний для каждого образца, принимая за 100 % количество микробных клеток, высеянных, исходя из показателя общей концентрации микробных клеток для данного образца, определенной с помощью СО мутности (10 МЕ). За количество жизнеспособных микробных клеток для каждой серии принимают среднее арифметическое определений для 3 ампул (флаконов).

Исходя из количества жизнеспособных микробных клеток в ампуле (флаконе) с вакциной рассчитывают количество доз и объем растворителя каждой серии для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций.

Для достоверности полученных результатов параллельно используют стандартный образец вакцины чумной живой.

3. Иммуногенность. ED₅₀ вакцины для морских свинок не должна превышать 10^4 , для белых мышей – $4 \cdot 10^4$ живых микробных клеток. Испытание проводят на морских свинках массой (275 ± 25) г и на белых нелинейных мышах массой (19 ± 1) г. Вакцину разводят с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось 10^9 живых м.к. Исходя из заранее определенного количества живых м.к., вакцину разводят для иммунизации морских свинок до концентраций $2 \cdot 10^5$; $4 \cdot 10^4$; $8 \cdot 10^3$ и $16 \cdot 10^2$ м.к./мл; белых мышей – до концентраций $5 \cdot 10^5$; $1 \cdot 10^5$; $2 \cdot 10^4$ и $4 \cdot 10^3$ м.к./мл. Каждую дозу препарата вводят однократно 6 животным. Морских свинок иммунизируют подкожно во внутреннюю поверхность левого бедра в объеме 0,5 мл; белых мышей – в объеме 0,2 мл дозами $8 \cdot 10^2$, $4 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^5$ живых м.к.

Для определения фактического содержания живых микробных клеток в иммунизирующих дозах взвесь, содержащую $8 \cdot 10^3$ м.к./мл, используемую

при иммунизации морских свинок, или дозу $4 \cdot 10^3$ м.к./мл для иммунизации белых мышей, разводят до концентрации 10^3 м.к./мл. По 0,1 мл взвеси с концентрацией 10^3 м.к./мл (100 м.к.) высевают на 3 чашки Петри с одной из вышеперечисленных питательных сред и инкубируют при температуре (27 ± 1) °С в течение 48 ч. Количество выросших колоний на чашках учитывают при вычислении ED₅₀ испытуемой серии.

Подкожное заражение морских свинок проводят во внутреннюю поверхность правого бедра на 21 сут, мышей – в ту же область на 7 или 21 сут после иммунизации. Заражающая доза для иммунизированных вакциной животных составляет 200 Dcl (Dosis certa letalis = LD₁₀₀) вирулентного штамма чумного микроба, 1 Dcl которого не должна превышать 100 микробных клеток.

Подготовка заражающего штамма *Y. pestis* 231 должна быть указана в нормативной документации.

Для заражения неиммунизированных (контрольных) животных используют взвесь с концентрацией 50 м.к./мл в объеме 0,5 мл для морских свинок и 125 м.к./мл в объеме 0,2 мл для белых мышей, что соответствует 1 Dcl.

Для определения фактического содержания микробных клеток заражающего штамма по 0,1 мл взвеси культуры *Y. pestis* 231, содержащей 10^3 м.к./мл, высевают на 3 чашки Петри с агаром Хоттингера и равномерно распределяют по всей поверхности среды методом «обкатки» чашек. Посевы инкубируют при температуре (27 ± 1) °С в течение 48 ч, после чего подсчитывают количество выросших колоний.

Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 20 сут. Все контрольные животные должны погибнуть от чумы в течение 10 сут. Погибших животных вскрывают, берут органы и ткани (у морских свинок берут пробы из места введения, регионарных паховых лимфатических узлов, печени, селезенки, легких, верхушки сердца; у белых мышей – из селезенки), высевая их методом отпечатков на чашки Петри с агаром Хоттингера с

добавлением генцианвиолета и с агаром Хоттингера - с натрием сернистоокислым. Чашки Петри инкубируют при температуре $(27 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Учет результатов проводят через 24 – 48 ч.

Павшими от чумы считают только тех животных, из органов которых при высеве выделяется культура *Y. pestis*.

ED_{50} вычисляют по формуле:

$$\lg ED_{50} = \lg D_N - S \cdot (\sum L_i - 0,5),$$

где $\lg D_N$ – логарифм максимальной иммунизирующей (фактической) дозы;

S – логарифм кратности разведений;

L_i – отношение количества животных, выживших при иммунизации данной дозой, к общему количеству животных, которым эта доза была введена;

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

Если все контрольные животные выжили, или значение ED_{50} будет более допустимого, контроль повторяют на таком же количестве животных. Если при повторном испытании значение ED_{50} будет выше допустимого, препарат считают не выдержавшим испытание.

Термостабильность. Не менее 4 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 микробных клеток изложена в разделе «Специфическая активность». Показатель термостабильности (t) 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
«Имунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$.