

## ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

<b>Вакцина антирабическая</b>	<b>ФС.3.3.1.0025.15</b>
<b>культуральная концентрированная</b>	<b>Взамен ГФ X, ст.715,</b>
<b>очищенная инактивированная</b>	<b>ФС 42-3447-97</b>

---

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину антирабическую культуральную концентрированную очищенную инактивированную, которая представляет собой лиофилизированный препарат, содержащий производственный штамм «Внуково-32» фиксированного вируса бешенства, выращенный в первичной культуре клеток почек сирийских хомячков, концентрированный, очищенный и инактивированный УФ-излучением или УФ-излучением в сочетании с обработкой формальдегидом.

Одна прививочная доза вакцины должна содержать вируса бешенства антиген специфический инактивированный, имеющий специфическую активность не менее 2,5 Международных Единиц (МЕ).

Вакцина не содержит консервантов и антибиотиков.

Вакцину выпускают в комплекте с растворителем – водой для инъекций.

Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная предназначена для профилактики бешенства.

### ПРОИЗВОДСТВО

#### **Производственный штамм вируса бешенства**

Производство вакцины для профилактики бешенства должно быть основано на системе посевных материалов (seed lot system), включающей главный посевной материал и рабочий посевной материал производственного штамма «Внуково-32» фиксированного вируса бешенства.

Количество пассажей полностью охарактеризованного главного посевного вирусного материала для получения рабочего посевного вирусного материала, используемого для производства вакцины, не должно превышать 5.

Рабочий посевной вирусный материал должен отвечать следующим требованиям.

**Подлинность.** Производственный штамм вируса бешенства должен нейтрализоваться иммуноглобулином антирабическим из сыворотки крови лошади и не должен нейтрализоваться сывороткой крови крупного рогатого скота нормальной. Индекс нейтрализации – не менее 100.

Для испытания параллельно готовят 2 ряда разведений вируса в диапазоне (1:5) – (1:50000) с кратностью разведения 10. В качестве среды разведения используют 2 % раствор сыворотки крови лошади нормальной, приготовленный с применением стерильной воды очищенной или воды для инъекций. Сыворотку крови лошади нормальную предварительно инактивируют при температуре 56 °С в течение 30 мин. Для получения разведений вируса в первую пробирку каждого ряда, соответствующую разведению 1:5, вносят 0,4 мл среды разведения, в остальные пробирки ряда – по 0,45 мл среды разведения. В первую пробирку каждого ряда добавляют по 0,1 мл восстановленной суспензии вируса бешенства штамм «Внуково-32» и тщательно перемешивают содержимое пробирок. Далее готовят ряд последовательных разведений путем переноса 0,05 мл смеси из предыдущей пробирки в следующую пробирку, каждый раз используя новую пипетку. Из последней пробирки, соответствующей разведению 1:50000, удаляют 0,05 мл смеси. В результате конечный объем содержимого каждой пробирки составит 0,45 мл смеси.

В каждую пробирку первого ряда вносят по 0,45 мл иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади, в каждую пробирку второго ряда – по 0,45 мл сыворотки крови крупного рогатого скота нормальной, инактивированной при температуре 56 °С в течение 30 мин. В результате

получают 2 ряда разведений вируса бешенства штамм «Внуково-32» в диапазоне от  $10^{-1}$  до  $10^{-5}$ . Содержимое пробирок осторожно перемешивают путем встряхивания и инкубируют при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение  $(75 \pm 15)$  мин. Затем пробирки быстро охлаждают на льду до комнатной температуры и каждым разведением вируса бешенства в объеме 0,03 мл интрацеребрально заражают по 6 беспородных мышей массой 9–10 г. За животными наблюдают 14 дней. Мышей, павших в течение первых 4 дней, при расчетах не учитывают. Титр вируса, использованного для заражения каждой из 2 групп мышей, вычисляют по методу Рида и Менча. Индекс нейтрализации рассчитывают путем вычитания логарифма обратного разведения, соответствующего  $LD_{50}$  вируса в смеси с иммуноглобулином антирабическим из сыворотки крови лошади, из логарифма обратного разведения, соответствующего  $LD_{50}$  вируса в смеси с сывороткой крупного рогатого скота нормальной. Если полученная разница превышает 2, то индекс нейтрализации больше 100.

**Стерильность.** Не должен содержать бактерий, в том числе микобактерий туберкулеза, и грибов. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Испытание на отсутствие микобактерий туберкулеза проводят путем посева на среду Левенштейна-Йенсена.

**Присутствие микоплазм.** Не должен содержать микоплазм. Испытание проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

**Посторонние вирусные агенты.** Не должен содержать посторонних вирусных агентов по результатам испытания на 20 мышах-сосунках, испытания на 20 беспородных белых мышах массой 15–20 г, испытания на 5 морских свинках массой 350 – 500 г, испытания на культурах клеток.

Используют здоровых животных, на которых ранее не проводили какие-либо испытания. Мышам-сосункам вводят по 0,01 мл испытуемого образца интрацеребрально и по 0,1 мл интраперитонеально, период

наблюдения – 14 сут. Беспородным белым мышам вводят по 0,03 мл испытуемого образца интрацеребрально и по 0,5 мл интраперитонеально, период наблюдения – 28 сут. Морским свинкам вводят по 0,1 мл испытуемого образца интрацеребрально и по 5 мл интраперитонеально, период наблюдения – 42 сут.

**Инфекционный титр вируса.** Не менее  $10^{-6}$  LD<sub>50</sub>/мл при интрацеребральном заражении новорожденных беспородных белых мышей массой 6–8 г.

**Специфическая активность.** Не менее 1,0 МЕ. Определение проводят методом НИИ (раздел «Испытания готового продукта»).

### **Испытания культур клеток**

Для производства вакцины используют первичную культуру клеток почек сирийских хомячков. Почки для получения культуры клеток забирают у клинически здоровых хомячков.

При работе с культурами клеток запрещается использовать антибиотики группы пенициллинов.

Необходимо проводить испытания производственной культуры клеток на стерильность и на отсутствие посторонних вирусных агентов путем изучения феномена гемадсорбции и цитопатических изменений на чувствительных тест-системах: культуре клеток, используемой для производства вакцины, культуре клеточной линии из другого источника, культуре диплоидных клеток человека.

При наличии гемадсорбции и (или) цитопатических изменений в контрольных культурах опыт следует повторить в клеточной культуре другой партии.

Если при повторном исследовании контрольных клеточных культур в одном из испытаний обнаружены цитопатические изменения или феномен гемадсорбции, то вирус, полученный в соответствующих зараженных культурах, не должен быть использован для производства вакцины.

Все вещества животного происхождения, используемые для получения производственной культуры клеток и культивирования вируса бешенства, проверяют на отсутствие бактерий, грибов, микоплазм и посторонних вирусных агентов. Для размножений клеток не следует применять сыворотки человеческого происхождения.

### **Производство полуфабриката**

Все этапы производства должны быть валидированы.

Методы концентрации и очистки вируссодержащей жидкости указывают в нормативной документации. Допускается концентрация и очистка методом ультрафильтрации или концентрация методом ультрафильтрации с последующей очисткой методом гель-хроматографии.

Инактивацию проводят сразу после этапа очистки. При использовании физического метода инактивации отрабатывают режим инактивации: скорость подачи вируссодержащей жидкости, частоту вращения диска инактиватора, интенсивность излучения.

### **Вспомогательные вещества**

Запрещается использовать в производстве антибиотики после технологического этапа сбора вируссодержащей культуральной жидкости.

В качестве стабилизаторов используют разрешенные вещества, указанные в нормативной документации.

### **Испытания промежуточных продуктов**

Испытание полуфабриката на стерильность проводят на стадии получения объединенного полуфабриката после этапа концентрации и очистки (до инактивации), после этапа инактивации, после добавления в вакцину стабилизаторов (испытывают смесь для лиофилизации), в процессе розлива.

Испытание полуфабриката на отсутствие микоплазм проводят на стадии получения объединенного полуфабриката после этапа концентрации и очистки (до инактивации), после этапа инактивации.

При использовании дополнительного метода инактивации формальдегидом в полуфабрикate определяют остаточное количество формальдегида. Содержание формальдегида в полуфабрикate – не более 60 мкг/мл.

Испытание полуфабриката на содержание общего белка проводят до добавления стабилизаторов – сахарозы и желатина. Содержание общего белка в полуфабрикate должно быть от 4,7 до 5,0 мг/мл. Определение проводят методом Лоури в соответствии с ОФС «Определение белка».

По показателю «Герметичность» испытывают все ампулы серии. Для проведения испытания ампулы помещают в кассеты, заполненные водой, подкрашенной любым водно-растворимым красителем. Кассеты погружают таким образом, чтобы ампулы полностью находились в воде. Емкость герметично закрывают и создают в ней избыточное давление, по сравнению с атмосферным, –  $(100 \pm 20)$  кПа. Давление выдерживают не менее 15 мин, после чего устанавливают в емкости давление, равное атмосферному. Емкость открывают, кассеты с ампулами вынимают и просматривают на наличие в них подкрашенной воды. Ампулы, содержащие подкрашенную воду, считают не выдержавшими испытание.

## ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Пористая масса белого цвета, гигроскопична. Определяют визуально.

**Подлинность.** Вакцина должна вызывать специфический иммунитет к вирусу бешенства при иммунизации мышей. Испытание проводят одновременно с испытанием специфической активности. Определение проводят по разделу «Специфическая активность».

**Время растворения.** Должна полностью растворяться в течение 5 мин при внесении 1 мл растворителя (вода для инъекций) на 1 дозу вакцины. Определение проводят визуально.

**Прозрачность.** Прозрачная или слабо-опалесцирующая жидкость, не более эталона I. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Степень окраски жидкостей.** Не более эталона Y<sub>4</sub>. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**Механические включения.** Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

**pH раствора.** От 7,2 до 7,8. Определяют потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 2,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

**Альбумин бычий сывороточный (БСА).** Не более 0,5 мкг в 1 дозе. Определяют методом ракетного иммуноэлектрофореза в соответствии с ОФС «Определение бычьего сывороточного альбумина методом ракетного иммуноэлектрофореза в иммунобиологических лекарственных препаратах». В качестве антисыворотки допускается использовать сыворотку, преципитирующую белки сыворотки крови рогатого скота адсорбированную кроличью диагностическую для судебно-медицинских целей жидкую. Чувствительность сыворотки определяют предварительно и используют в концентрации, при которой с 0,5 мкг/мл БСА образуется четкая ракета с высотой пика не менее 1 мм.

**Стерильность.** Должна быть стерильной. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации на тиогликолевой среде в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Пирогенность.** Должна быть апиrogenной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Доза препарата для введения составляет 1 прививочную дозу, вводимую внутривенно в объеме 1 мл.

**Аномальная токсичность.** Должна быть нетоксичной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Морским свинкам вводят по 2 мл восстановленной растворителем вакцины подкожно, мышам – по 1 мл восстановленной растворителем вакцины внутривенно.

**Специфическая безопасность.** Вакцина не должна содержать живой вирус бешенства.

Для определения специфической безопасности проводят пассаж вакцины в первичной культуре клеток почек сирийских хомячков. В 2 флакона, содержащие питательную среду с гидролизатом лактальбумина (0,5 %) в растворе Хенкса для культур клеток, вносят по 200 мл клеточной взвеси, содержащей 300–600 тыс клеток/мл. В среду добавляют 10 % раствор сыворотки крови крупного рогатого скота жидкой.

В качестве контроля используют 2 флакона с незараженной первичной культурой клеток почек сирийских хомячков.

Объем и концентрация клеток, вносимых в опытные и контрольные флаконы, должны быть одинаковыми.

Культуру инкубируют в течение 5–6 сут при температуре  $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Затем отбирают флаконы с полностью сформировавшимся клеточным монослоем. Для испытания на специфическую безопасность от каждой серии отбирают по 25 ампул с препаратом. В каждую ампулу вносят по 1 мл растворителя. Восстановленную вакцину объединяют в одну емкость. Из отобранных флаконов с культурой клеток сливают культуральную жидкость. В каждый опытный флакон вносят по 12,5 мл растворенной вакцины, 2 незараженных флакона оставляют (контрольные). Все флаконы инкубируют при температуре  $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 90 мин, после чего в опытные и контрольные флаконы вносят по 200 мл питательной среды с гидролизатом лактальбумина (0,5 %) в растворе Хенкса для культур клеток. В поддерживающую среду добавляют 5 % СКРС и канамицин до конечной концентрации 100 мкг/мл или 4 % раствор для инъекций гентамицина

сульфата до конечной концентрации 80 мкг/мл. На –8 сут инкубации при температуре  $(32 \pm 1)$  °С из каждого опытного флакона отбирают по 5 мл культуральной жидкости, смешивают пробы и вводят в головной мозг по 0,03 мл смеси 10 беспородным мышам массой от 6 до 7 г.

Аналогично испытывают культуральную жидкость из контрольных флаконов.

За животными наблюдают 21 сут. За весь период наблюдения не должно регистрироваться ни одного случая смерти от бешенства животного, получившего культуральную жидкость из опытных флаконов. Диагноз устанавливают на основании результатов иммунофлуоресценции (РИФ).

В случае, если в опытной группе зарегистрирована неспецифическая гибель (в первые 4 сут наблюдения) более 2 мышей, испытание повторяют.

При появлении хотя бы у 1 мыши клинических признаков бешенства (тремор конечностей, атаксия, паралич) или при гибели более 2 мышей без клинических признаков заболевания, начиная с 5 сут наблюдения, головной мозг павших животных исследуют методом иммунофлуоресценции. При получении положительных результатов серию считают не выдержавшей испытания; при получении отрицательного результата проводят повторный контроль на удвоенном количестве образцов вакцины и удвоенном количестве мышей.

В случае отрицательного результата при повторном испытании считают, что вакцина не содержит живого вакцинного вируса бешенства. В случае регистрации при повторном контроле хотя бы у 1 мыши клинических признаков бешенства, подтвержденного иммунофлуоресценцией, испытываемую серию вакцины считают не выдержавшей испытания.

**Специфическая активность.** Не менее 2,5 Международных Единиц (МЕ) в 1 дозе.

Определение специфической активности проводят по методике Национального института здоровья США (НИИ). Специфическую активность испытываемой вакцины определяют в сравнении со стандартным образцом

(СО) специфической активности вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной, калиброванной по отношению к Международному стандарту антирабической вакцины. Для определения специфической активности от серии отбирают не менее 3 ампул на каждую иммунизацию.

В каждую ампулу вносят растворитель из расчета 1 мл на 1 дозу вакцины. Полученные растворы объединяют и готовят ряд разведений с пятикратным интервалом в соотношении 1:5; 1:25; 1:125; 1:625; 1:3125 на 0,9 % стерильном растворе натрия хлорида или на среде 199, содержащей 0,1 % альбумина. Разведения, используемые для иммунизации животных, указывают в нормативной документации.

Аналогичным образом готовят разведения стандартного образца, предварительно восстановленного водой для инъекций до содержания 1 МЕ в 1 мл.

Пробирки с разведенной вакциной и стандартным образцом хранят на льду в течение времени постановки опыта, но не более 4 ч.

Для иммунизации используют мышей линии Balb/c или беспородных мышей массой  $(12 \pm 2)$  г без различия пола. Каждым разведением вакцины и стандартного образца иммунизируют не менее 11 животных; 40 мышей из этой же партии (контрольная группа) содержат в отдельных клетках до проведения титрования фиксированного вируса бешенства штамм «CVS» (тест-штамм). Мышей иммунизируют внутрибрюшинно по 0,5 мл 2 раза с интервалом 7 сут. На 7 сут после второй иммунизации вводят фиксированный вирус бешенства штамм CVS интрацеребрально в объеме 0,03 мл шприцем вместимостью 1 см<sup>3</sup>. Для заражения всех иммунизированных животных применяют разрешающее (рабочее) разведение вируса бешенства, содержащее от 20 до 100 LD<sub>50</sub>/0,03 мл вируса.

Одновременно с заражением иммунизированных мышей на неиммунизированных мышах из контрольной группы проводят титрование

фиксированного вируса бешенства штамм CVS для определения точной дозы вируса, взятой в испытание. Для этого используют разрешающее (рабочее) разведение вируса ( $10^0$ ) и его десятикратные разведения ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ) на 2 % растворе сыворотки крови лошади нормальной, приготовленном с применением стерильной воды очищенной или воды для инъекций. Сыворотку крови лошади нормальную предварительно инактивируют при температуре  $56\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Каждым разведением вируса заражают не менее чем по 10 мышей интрацеребрально в объеме 0,03 мл.

За мышами наблюдают в течение 14 сут. При оценке результатов опыта учитывают мышей, заболевших или павших с 5 по 14 сут. Учет проводят ежедневно. Клиническими симптомами на разных стадиях развития заболевания могут быть: взъерошенная шерсть, замедленные и/или круговые движения, дрожание, парез, параличи.

После окончания опыта вычисляют точное количество вируса, содержащееся в 0,03 мл разрешающего разведения, по методу Рида и Менча.

Рассчитывают конечные разведения вакцины и стандартного образца, защищающие 50 % животных ( $KP_{50}$ ), по следующей формуле:

$$T = A + \frac{50 - B}{C - B} \cdot D,$$

где  $T$  – показатель степени десятичного логарифма;

$A$  – логарифм обратной величины разведения, при котором смертность животных ниже 50 %;

$B$  – показатель смертности животных ниже 50 %;

$C$  – показатель смертности животных выше 50 %;

$D$  – логарифм кратности разведения.

$$KP_{50} = 10^{-T}$$

Специфическую активность испытуемой вакцины ( $CA$ ) определяют в МЕ относительно специфической активности стандартного образца по формуле:

$$CA = \frac{K}{M} \cdot U \cdot 1,$$

где  $K$  – величина, обратная  $KP_{50}$  испытуемой вакцины;

$M$  – величина, обратная  $KP_{50}$  стандартного образца;

$U$  – количество МЕ в 1 мл восстановленного стандартного образца (1 МЕ);

1 – доза (1 мл).

В том случае, когда при проведении испытания специфическая активность вакцины менее нормативных требований, допускается проведение повторного испытания.

**Термостабильность.** Вакцина должна быть термостабильной. После инкубирования образцов при температуре 37 °С в течение 4 недель специфическая активность вакцины должна быть не менее 2,5 МЕ в 1 дозе (раздел «Специфическая активность»). Испытанию на «Термостабильность» подвергают не менее 2 серий вакцины ежегодно.

**Растворитель, выпускаемый в комплекте с препаратом.** В нормативной документации указывают растворитель и методику, по которой проводят испытания растворителя.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

**Транспортирование и хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».