

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вакцина гриппозная

ФС.3.3.1.0028.15

инактивированная

Взамен ВФС 42-265ВС-96

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину гриппозную инактивированную (вакцину цельновирионную, которая представляет собой цельный вирус; вакцину расщепленную (сплит-вакцину), которая состоит преимущественно из разрушенных вирусных частиц; вакцину субъединичную, которая содержит в основном поверхностные антигены вируса гриппа: гемагглютинин и нейраминидазу). Антигены получают из очищенного вируса или очищенных вирусов гриппа типов А и В, одного, двух или трех штаммов, выращенных отдельно в развивающихся куриных эмбрионах. Препарат вызывает формирование специфического иммунитета против гриппа, вызываемого соответствующими штаммами.

Вакцина предназначена для специфической профилактики гриппа.

Вакцина может содержать адъювант и консервант.

ПРОИЗВОДСТВО

Штаммовый состав вакцин ежегодно рекомендуется ВОЗ и национальной Комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам.

Куриные эмбрионы должны быть получены из птицеводческих хозяйств, благополучных по возбудителям, патогенным для человека. Качество поставляемых эмбрионов должно быть подтверждено ветеринарными свидетельствами.

Все производственные процессы, технологическое оборудование и методы контроля должны быть валидированы и должны осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека. Производство вакцины должно проводиться в помещениях, исключающих работу с другими патогенными микроорганизмами и антибиотиками. Не допускается производство препарата на территории, на которой расположены производственные здания по производству антибиотиков, если не соблюдены требования к защитным зонам, согласно действующим санитарным правилам. Обязательным условием технологического процесса производства вакцины является соблюдение поточности, исключающей возможность перекреста промежуточных продуктов и полуфабрикатов, получаемых на разных стадиях производства, и их контаминацию посторонними веществами, в первую очередь посторонней микрофлорой.

Работа с живым и инактивированным вирусом должна проводиться в разных помещениях. Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами (допустимо использование компонентов только фармакопейного качества). В состав вакцины должны входить вспомогательные компоненты, разрешенные к медицинскому применению и в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Производство вакцины включает ряд последовательных стадий с обязательным внутрипроизводственным контролем: получение посевного вируса; накопление вируса; очистку и концентрацию; расщепление вируса (при необходимости); производство препарата; маркировку; фасовку. На каждой стадии должны быть предусмотрены: система и схема анализа показателей качества в ходе технологического процесса и испытания

конечного продукта; хранение промежуточных и конечного продуктов, обеспечивающее стабильность качества в течение срока годности продукта.

На этапах производства необходимо контролировать:

– Качество сырья: 10-12-дневных развивающихся куриных эмбрионов (возраст развивающихся куриных эмбрионов должен быть указан в соответствующем разделе нормативной документации).

– Производственные штаммы: используются высокорепродуктивные реассортанты. Источник и история пассажей должны быть известны. Продукция вакцины основывается на системе посевных вирусов (seed-lot). Из штамма готовится маточный материал или главный посевной вирус, который должен храниться при температуре минус 70 °С в жидком виде или при температуре минус 20 °С в лиофильно высушенном виде. Штаммы и маточный материал должны быть проверены по всем биологическим свойствам в соответствии с регламентированными требованиями.

Из маточного материала готовят рабочий посевной вирус, который должен быть представлен не более чем 15 пассажем от соответствующего производственного штамма. Финальный сбор представляет собой первый пассаж от рабочего посевного вируса.

– Моновалентный вирусный сбор: Процесс инактивации должен обеспечивать инактивацию вируса лейкоза птиц и микоплазм. При использовании формальдегида его концентрация не должна превышать 0,2 г/л на любой стадии. Если используется бетапропилактон, его концентрация не должна превышать 0,1 % V/V. В сбор может быть добавлен антимикробный агент. Пенициллин или стрептомицин нельзя использовать ни на одной из стадий производства.

Для каждого нового штамма необходима валидация процесса расщепления вируса в моновалентном препарате сплит-вакцины и подтверждение наличия преимущественного содержания гемагглютиниона и нейраминидазы в субъединичных моновакцинах.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная или слегка желтоватая прозрачная жидкость, возможно наличие слабой опалесценции. Определение проводят визуально.

Подлинность. Каждый подтип и тип антигена должен нейтрализоваться гомологичной сывороткой. Титр с гетерологичной сывороткой должен быть ниже ее собственного титра, по крайней мере, в 4 раза. Определение проводят на стадиях получения полуфабрикатов: объединенного вирусного концентрата или моновакцины в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (макрометод). РТГА применяют для установления типа и подтипа вируса, т.е. специфичности, а также для определения нарастания титров специфических антител. Постановка РТГА включает следующие этапы: приготовление взвеси эритроцитов, определение гемагглютинирующего титра антигена в реакции гемагглютинации (РГА) и рабочей дозы вируса, постановка самой реакции. Для постановки реакции необходимы следующие ингредиенты:

- исследуемый антиген (вакцина, вирусосодержащая жидкость – аллантаисная или культуральная);
- иммунные сыворотки к различным типам (А и В) и субтипам типа А вируса гриппа;
- фосфатный буферный раствор $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$ (ФБР);
- суспензия куриных эритроцитов, 1 %.

1. Приготовление взвеси куриных эритроцитов. Для постановки РТГА используют эритроциты петухов. Кровь у петухов берут из сердца или подкрыльцевой вены.

Свежеполученную кровь от 3 – 5 петухов помещают во флакон со стеклянными бусами или с одним из антикоагулянтов (раствор Альсевра, 5 % раствор натрия цитрата). Дефибрирование крови проводят немедленно путем интенсивного встряхивания флакона в течение 5 – 7 мин при температуре (20 ± 2) °С до выпадения волокон фибрина.

Дефибрированную кровь фильтруют через 4 слоя марли, затем трехкратно отмывают ФБР путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин или 800 ± 200 об/мин в течение (15 ± 5) мин». Надосадочную жидкость удаляют. Из осадка, принимаемого за 100 %, готовят 1 % суспензию куриных эритроцитов по объему.

2. Определение гемагглютинирующего титра антигена. В лунках агглютинационного планшета готовят двукратные разведения антигена в объеме 0,4 мл на фосфатном буферном растворе, начиная с 1:10 до 1:1280. В каждую лунку вносят по 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием планшета и оставляют при температуре (20 ± 2) °С на 40 – 45 мин (до оседания эритроцитов в контроле).

Реакцию оценивают по «четырёхкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается отрицательным контролем на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. С этой целью в контрольную лунку того же агглютинационного планшета вносят 0,4 мл фосфатного буферного раствора и 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. При отсутствии спонтанной агглютинации на дне лунки выпадает гомогенный с ровными краями осадок эритроцитов (отрицательная реакция).

3. Приготовление рабочей дозы антигена. В РТГА рабочей дозой антигена является то разведение антигена, в 0,2 мл которого содержится 4 агглютинирующие единицы (4 АЕ). Для вычисления ее следует

установленную величину титра антигена разделить на 8. Полученная от деления цифра указывает во сколько раз нужно развести антиген, чтобы в 0,2 мл его содержалось 4 АЕ (рабочая доза).

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (4 АЕ). Для этого в пять лунок горизонтального ряда плексигласового планшета, начиная со второй, вносят по 0,2 мл фосфатного буферного раствора. В 1-ю и 2-ю лунки добавляют по 0,2 мл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания переносят 0,2 мл смеси из лунки в лунку, начиная со 2-й по 5-ю лунку, из 5-й лунки 0,2 мл удаляют. Затем в каждую лунку добавляют по 0,2 мл фосфатного буферного раствора и по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. В 6-й лунке ставят контроль на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ на 40–45 мин (до оседания эритроцитов в контроле).

При правильном выборе рабочей дозы полная (++++) агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в первых трех лунках. В 4-й и 5-й лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного выше, разведение антигена должно быть изменено путем добавления соответствующего количества антигена или фосфатного буферного раствора для получения необходимой рабочей дозы. При этом необходимо повторно проверить правильность приготовления рабочей дозы.

4. Постановка реакции торможения гемагглютинации. Для удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации перед постановкой РТГА сыворотки необходимо обработать нейраминидазой холерных вибрионов или RDE-реагентом (Примечания).

После удаления неспецифических ингибиторов готовят двукратные разведения сывороток в лунках плексигласовой доски, начиная с 1:10 до 1:640 и выше в объеме 0,2 мл. К каждому разведению сыворотки добавляют по 0,2 мл рабочей дозы антигена (4 АЕ). Смесь встряхивают и после контакта

антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 час) при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в каждую лунку добавляют по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. Смесь повторно встряхивают, оставляют при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 40 – 45 мин (до оседания эритроцитов в контроле), после чего производят учет результатов реакции.

При наличии в сыворотке специфических антител наступает задержка агглютинации эритроцитов. За титр сыворотки принимают предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации.

Задержка гемагглютинации указывает на соответствие типа антигена и взятой сыворотки; отсутствие задержки гемагглютинации свидетельствует о несоответствии типа взятой сыворотки антигену.

Примечания.

1. Удаление неспецифических ингибиторов гемагглютинации из иммунных сывороток с помощью нейраминидазы холерных вибрионов или RDE-реагентом. При наличии инструкции по применению коммерческого реактива необходимо следовать требованиям, изложенным в данном документе.

Метод основан на способности нейраминидазы холерных вибрионов, не действуя на специфические антитела, разрушать ингибиторы гемагглютинации к вирусам гриппа А и В в сыворотках крови человека, кур, крыс, кролика.

Добавить к 1 объему сыворотки 3 объема реагента нейраминидазы. К смеси, состоящей из 0,1 мл сыворотки и 0,3 мл реагента нейраминидазы, добавляют 0,6 мл фосфатного буферного раствора, чтобы получить разведение сыворотки 1:10. Смесь инкубируют при температуре $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 18 – 20 час и затем прогревают при температуре $(56 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

Сыворотка, обработанная нейраминидазой, может быть использована для РТГА в течение 2 недель при условии ее хранения при температуре $(5 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

2. Приготовление 0,1 М раствора фосфатного буферного (рН $7,2 \pm 0,2$).

Раствор 1. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 17,8 г натрия фосфата двузамещенного 2 – водного ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор 2. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 15,6 г натрия фосфата однозамещенного 2-водного ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 720 мл раствора 1, прибавляют 280 мл раствора 2 и перемешивают. Затем в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 100 мл приготовленного 0,1 М фосфатного буферного раствора доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают, прибавляют 8,5 г натрия хлорида и вновь перемешивают. pH полученного раствора должен быть $7,2 \pm 0,02$. Если показатель pH выше или ниже требуемого, его соответственно доводят 1 М раствором хлористоводородной кислоты или 1 М раствором натрия гидроксида.

Приготовление раствора Альсевера

Состав:

- 2,05 % глюкозы;
- 0,42 % натрия хлорида;
- 0,8 % натрия цитрата;
- 100,0 мл воды очищенной.

pH раствора доводят с помощью 5 % раствора лимонной кислоты до pH 5,6 (примерно 10 мл 5 % раствора лимонной кислоты на 1 л раствора Альсевера). Раствор стерилизуют фильтрацией или автоклавированием в течение 3 последовательных дней при температуре 100 °C и давлении 0,7 атм. Для консервирования добавляют на 1 мл крови 1,2 мл раствора Альсевера. В данном растворе эритроциты могут храниться при температуре (4 ± 2) °C в течение 1–2 нед. Перед использованием эритроциты необходимо трехкратно отмыть фосфатным буферным раствором с помощью центрифугирования при (800 ± 200) об/мин в течение 10 мин.

3. Приготовление консервирующего 5 % раствора натрия цитрата. 5 % раствор натрия цитрата перед использованием разводят в 2 раза 0,1 М фосфатным буферным раствором (pH $7,2 \pm 0,2$). К одной части полученного раствора натрия цитрата добавляют 2 части крови петухов. В данном растворе эритроциты могут храниться при температуре (4 ± 2) °C в течение 3 – 5 сут.

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (микрометод). Принцип метода, его учет и ингредиенты, те же, что и для проведения РТГА макрометодом. Отличие методов заключается в изменении концентрации и объемов ингредиентов.

Реакцию ставят в микропланшетах с «U»-образными лунками.

1. Приготовление 0,5 % взвеси куриных эритроцитов. Взвесь готовят из 1 % суспензии эритроцитов (см. макрометод) разведением ее в 2 раза фосфатным буферным раствором.

2. Определение гемагглютинирующего титра антигена. В каждую лунку микропланшета одного ряда вносят фосфатный буферный раствор в объеме 50 мкл. Затем в первую лунку вносят 50 мкл антигена в разведении 1:10 и далее проводят титрование по принципу двукратного разведения. Из последней лунки удаляют 50 мкл. Затем в каждую лунку вносят по 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 40–45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

Реакцию оценивают по «четырёхкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается постановкой отрицательного контроля на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. В качестве отрицательного контроля служат несколько лунок панели, в которые вместо антигена внесен фосфатный буферный раствор.

3. Приготовление рабочей дозы антигена. Рабочая доза антигена при постановке РТГА микрометодом равна 8 АЕ. Для её расчета и последующего приготовления гемагглютинирующий титр делят на 16. Полученное значение указывает во сколько раз необходимо развести антиген.

Пример: титр антигена равен 160. Разделив 160 на 16, получаем цифру 10, указывающую на то, что антиген необходимо развести в 10 раз.

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (8 АЕ). Для этого в шесть лунок микропланшета, начиная со второй, вносят по 25 мкл фосфатного буферного раствора. В 1 и 2 лунки добавляют по 25 мкл приготовленной рабочей дозы

антигена. После перемешивания 25 мкл смеси переносят из 2 лунки в 3, из 3 – в 4 и т.д. Из последней лунки панели 25 мкл удаляют. Затем во все лунки добавляют по 25 мкл фосфатного буферного раствора и по 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ на 40 – 45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

При правильном выборе рабочей дозы агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в четырех лунках микропланшета. В остальных лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного результата добавляют антиген или фосфатный буферный раствор для получения необходимой рабочей дозы.

4. Постановка реакции торможения гемагглютинации. Метод постановки реакции микрометодом соответствует таковому, описанному для макрометода, за исключением объемов используемых ингредиентов реакции.

Готовят двукратные разведения сыворотки в объеме 25 мкл, вносят рабочую дозу антигена (8 АЕ) в объеме 25 мкл и после контакта антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 ч) при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в каждую лунку панели вносят по 50 мкл 0,5 % взвеси эритроцитов. После оседания эритроцитов в контроле (как правило, через 40 – 45 мин) проводят учет результатов (макрометод).

За титр сыворотки принимают величину обратную ее разведению, при котором отсутствует агглютинация эритроцитов.

Прозрачность. Должна выдерживать сравнение с эталоном П. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Интенсивность окраски раствора не должна быть более эталона Y_5 . Определение проводят 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. От 7,0 до 7,6. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Герметизация Ампулы и флаконы должны быть герметичны. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Белок. Не более 100 мкг на дозу для цельновирионных и расщепленных вакцин для каждого из входящих в состав вакцины штамма. Не более 40 мкг на дозу для субъединичных вакцин за вычетом количественного содержания гемагглютинина для каждого из входящих в состав вакцины штамма. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка» по методу Лоури, если нет других указаний в нормативной документации.

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Не более 100 ЕЭ/доза. Определение проводят методом гель-тромб теста в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины». Чувствительность используемого ЛАЛ-реактива должна быть указана в нормативной документации.

Пирогенность. Должен быть апиrogenным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза - 0,1 мл вакцины на кг массы кролика. В нормативной документации могут быть указаны иные тест-дозы. Проведение теста не требуется при определении бактериальных эндотоксинов (методы являются взаимозаменяемыми).

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Доза для мышей и морских свинок 0,5 мл внутривнутрибрюшинно. В нормативной документации могут быть указаны иные тест-дозы.

Специфическая безопасность. Не должен содержать живого вируса гриппа.

Определение отсутствия живого вируса проводят путем заражения 10 куриных эмбрионов (10–12-дневных) по 0,2 мл препарата в аллантоисную полость. Через 48 час – для вируса гриппа типа А и через 72 час – для вируса гриппа типа В инкубации эмбрионов в термостате при температуре 35 – 37 °С аллантоисную жидкость проверяют на наличие гемагглютининов с эритроцитами петухов (1 % суспензия). Не менее 7 из 10 куриных эмбрионов должны остаться живыми. Собирают по 0,5 мл аллантоисной жидкости из каждого эмбриона, объединяя жидкость от всех групп. Затем заражают по 0,2 мл неразведенной смеси аллантоисной жидкости 10 эмбрионов. Эмбрионы инкубируют при тех же условиях, после чего определяют наличие гемагглютининов аллантоисной жидкости после второго пассажа. Результаты реакции после 2-го пассажа должны быть отрицательными. В том случае, если определяется наличие гемагглютининов в аллантоисной жидкости после 2-го пассажа, допускается проведение 3-го пассажа. Результаты реакции после 3-го пассажа должны быть отрицательными.

Специфическая активность. Должен содержать гемагглютинин вируса гриппа подтипов типа А и типа В не более 15 ± 2 мкг на дозу. Требование к количественному содержанию гемагглютининов в дозе формулируют на основании результатов клинических испытаний по иммуногенности. Специфическую активность определяют в реакции одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД).

Принцип метода. Гемагглютинин (ГА), диффундируя из лунок агарозного геля в радиальном направлении, реагирует со специфическими

антителами сыворотки, находящейся в агарозе, и образует в геле зону преципитации. Размеры окружающей лунку зоны преципитации находятся в прямой зависимости от количества антигена, внесенного в лунку.

1. Ингредиенты для проведения ОРИД:

- стандарт моноспецифической сыворотки к гемагглютнину вируса гриппа;
- стандартный антиген (гемагглютинин) вируса гриппа;
- агароза;
- детергент;
- краситель – кислотный синий 83 (Кумасси бриллиантовый синий R250);
- раствор для обесцвечивания агарозных гелей;
- фосфатный буферный раствор (ФБР): 0,01 М фосфатный буферный раствор рН 7,2, содержащий 0,15 М раствор натрия хлорида и 0,01 % раствор натрия азида. Вместо ФБР можно использовать 0,01 М буферный раствор трис(гидроксиметил)аминометана с хлористоводородной кислотой рН 7,2–7,3, содержащий 0,15 М раствор натрия хлорида и 0,01 % раствор натрия азида;
- 1–10 % растворы натрия азида.

2. Приготовление стандартных образцов реагентов для выполнения ОРИД.

2.1. Приготовление стандарта моноспецифической сыворотки к гемагглютнину вируса гриппа

Иммунизируют кролика или барана гемагглютинином, который должен содержать белок (не менее 100 мкг/мл), электрофоретически гомогенный при электрофорезе в полиакриламидном геле. Моноспецифические сыворотки получают иммунизацией животных очищенным белком гемагглютинина с равным объемом адьюванта Фрейнда. Первая иммунизация по 0,5 мл смеси в две точки, вторая и третья иммунизация – через 2 недели в том же объеме в две точки внутримышечно и по 0,1 мл гемагглютинина без адьюванта в четыре точки внутрикожно. Обескровливание животных проводится через 2

недели. Предварительно проводится отбор пробной партии крови. При необходимости проводят дополнительно введение антигена. Титр сыворотки в РТГА должен быть не ниже 1:5000.

Полученную сыворотку прогревают при температуре 56 °С, разводят ФБР в 2-4 раза в зависимости от ее активности (в соответствии с паспортом на сыворотку), разливают по 0,5 мл в ампулы и высушивают.

В ОРИД может быть использован международный стандарт моноспецифической сыворотки к гемагглютинирующему вирусу гриппа производства NIBSC (Великобритания) или TGA (Австралия).

2.2. Приготовление стандартного антигена (ГА) вируса гриппа. Стандарт гемагглютинирующего антигена (ГА) для ОРИД должен содержать 20–50 мкг ГА в 1 мл и не ниже 1:32000 АЕ.

Используют полуфабрикат инактивированной гриппозной вакцины с содержанием белка 25 – 400 мкг/мл. Соотношение экстинкции полуфабриката A_{260}/A_{280} должно быть 1,1 – 1,18. Содержание сахарозы – 5 – 7 % (в случае отсутствия сахарозы подбирают наполнитель для сушки). Жидкий препарат разливают по 1,0 мл в ампулы и подвергают лиофильной сушке (условия лиофильного высушивания препарата указывают в нормативной документации).

В ОРИД может быть использован международный стандарт гемагглютинирующего антигена вируса гриппа производства NIBSC или TGA.

3. Оборудование:

- стеклянные пластины 6×9 см;
- автоматические дозаторы регулируемые на 0-20 мкл, а также автоматические дозаторы объемом 100–1000 мкл;
- водяная баня (температура до 100 °С);
- прибор для измерения диаметра колец преципитации;
- горизонтальный предметный столик с уровнем;
- камера (влажная) для инкубации;

– пробойник из нержавеющей стали с внешним диаметром 3 или 4 мм.

4. Проведение ОРИД. Для реакции используют стеклянные пластины размером 6×9 см. Для этого пластины кипятят в воде с добавлением моющих средств, затем промывают водой, помещают на сутки в 1 М раствор натрия гидроксида и затем на сутки в смесь Никифорова, содержащую спирт этиловый и эфир наркотный в соотношении 1:1. Обезжиренные пластины промывают водой и высушивают.

Перед нанесением агарозы пластину равномерно протирают марлей, смоченной расплавленной горячей агарозой. Приготовленные заранее порции агарозы объемом по 12 мл расплавляют в кипящей водяной бане при температуре $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем охлаждают до температуры $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ в водяной бане в течение не менее 30 мин. При температуре $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ к агарозе добавляют предварительно подогретую моноспецифическую сыворотку в объеме, указанном в инструкции к стандарту. Агарозу с сывороткой тщательно перемешивают, не допуская образования пузырьков воздуха, и быстро и равномерно наносят на пластины, помещенные на ровную горизонтальную поверхность предметного столика с «уровнем», и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Приготовленные пластины с сывороткой можно хранить во влажной камере при температуре $4 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 – 7 сут.

В застывшей агарозе пробойником из нержавеющей стали с внешним диаметром 4 мм делают 6 рядов лунок по 4 лунки в каждом на расстоянии не менее 1,5 см от края пластины. Расстояние между лунками должно быть не менее 1 см. Агарозу из прорезанных лунок удаляют под легким вакуумом.

Определение специфической активности вакцин, т.е. определение содержания антигена, гемагглютинина (ГА) в мкг/мл, проводят на двух пластинах. На каждой пластине исследуют стандарт и серии вакцины, отводя под каждый образец по два ряда лунок. На второй пластине проверяют те же образцы, но расположение вакцин и стандарта произвольно меняют. Предварительно готовят 500 мкл смеси детергента и антигенов,

состоящей из (50 мкл детергента и 450 мкл антигена) и далее, смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем готовят разведения антигенов: неразведенный антиген, 0,75, 0,5 и 0,25 мкл (или в соотношении: 1:0, 3:1, 1:1, 1:3), используя для разбавления ФБР (табл.).

Таблица – Схема разведений антигена

Разведение	Соотношение	Объем в мкл	
		Антиген	Растворитель
неразвед.	1:0	100	0
0,75	3:1	150	50
0,5	1:1	100	100
0,25	1:3	100	300

Вакцина и стандартный антиген должны содержать близкие количества ГА, так, чтобы размеры зон преципитации могли быть сравнимы. Поэтому, если вакцина, согласно паспортным данным, содержит меньше ГА, чем стандарт, необходимо провести предварительное разведение стандарта и, наоборот: в случае, если стандарт менее активен, чем вакцина, то делают разведение разводится вакцина. В документации на стандарт должны быть указаны рекомендуемые разведения стандарта и сыворотки.

В лунки вносят по 10 или по 20 мкл каждого разведения, начиная с разведения 1:3, с помощью автоматического дозатора со сменой наконечников при переходе от одного разведения к другому. Через 30 мин пластины помещают во влажную камеру на 18 – 24 час при комнатной температуре. Затем для удаления из геля неспецифических белков пластины помещают в ФБР на несколько часов. При этом меняют ФБР 2 – 3 раза. Далее пластинки с гелем покрывают смоченной в ФБР плотной фильтровальной бумагой, избегая образования воздушных пузырьков на поверхности геля, затем несколькими слоями сухой фильтровальной бумаги и помещают под груз (не более 10 г на 1 см² поверхности). Бумагу, за исключением первого

слоя, меняют через каждые 10 – 15 мин до тех пор, пока она не перестанет впитывать влагу из агарозы. Для дальнейшего высушивания пластины помещают под вентилятор, не снимая первого слоя бумаги. Пластинки высушивают до момента, когда фильтровальная бумага первого слоя будет свободно отделяться от агарозы, затем заливают красителем и окрашивают не менее 30 мин. После окрашивания пластины обесцвечивают в растворе для обесцвечивания гелей до проявления четких колец преципитации на слабо окрашенном фоне. После подсушивания кольца преципитации измеряют в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

5. Результаты анализа. Рассчитывают квадраты диаметров колец преципитации каждого антигена на основании средних величин по двум пластинам и строят график, откладывая по оси ординат квадраты диаметров, а по оси абсцисс – разведения антигенов. На графике зависимость квадрата диаметров от разведений для каждой вакцины должна быть выражена прямой линией, которая должна располагаться по оси ординат в пределах 3 мм² от стандартной кривой. Если расстояние между начальными точками тестируемого и стандартного антигена превышает 3 мм², такие результаты не учитывают; в этом случае необходимо более точно подобрать концентрации антисыворотки и антигенов. Затем на оси ординат между начальными точками кривой стандарта и каждого антигена находят среднюю точку, от нее проводят прямую, параллельную оси абсцисс, а от нее на уровне разведения 1:3 находят расстояния до кривой тестируемого антигена и стандартного. Количество ГА (X) в вакцине в мкг/мл рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{L_x}{L_{CT}} \cdot a \cdot b,$$

где: L_x , L_{CT} – расстояния по перпендикуляру на уровне разведения 1:0 от срединной линии до пересечения с кривыми тестируемого и стандартного антигенов, соответственно;

a – содержание ГА в мкг/мл в стандарте;

b – предварительное разведение вакцины.

Учет результатов ОРИД можно проводить, используя программное обеспечение. Методика должна быть валидирована.

Примечания.

1. Приготовление моноспецифической сыворотки к ГА. Делают разведение водой очищенной до объема, указанного на ампуле; последующие разведения делают с помощью ФБР.

2. Приготовление стандартного антигена. Делают разведение водой в объеме, указанном на ампуле; дальнейшие разведения делают с помощью ФБР. Разведенный антиген хранят при температуре 4 °С не более 6 час.

3. Приготовление агарозы. Агарозу заливают ФБР (конечная концентрация 1,5 %) и нагревают в кипящей водяной бане до полного растворения. Расплавленную агарозу фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр, разливают по 12 мл в пробирки и закрывают резиновыми пробками. В таком виде агароза может храниться более 3 мес. при комнатной температуре (если агароза начинает отделяться от стенок пробирки, ее не используют).

4. Детергенты. Используют детергенты, указанные в паспорте (инструкции) к стандарту. Растворы детергентов готовят на воде очищенной и хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

5. Краситель. Готовят 0,3 % раствор кислотного синего 83 (Кумасси бриллиантовый синий Р250) в растворе для обесцвечивания гелей. Краситель хранят при комнатной температуре и может использоваться до выпадения в осадок образовавшихся кристаллов красителя.

6. Раствор для обесцвечивания окрашенных агарозных гелей. В мерный цилиндр вместимостью 1 л вносят 200 мл уксусной кислоты ледяной, добавляют 500 мл этилового спирта, перемешивают, доводят объем раствора до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят неограниченное время в емкости с притертой пробкой.

Вещества, вносимые в препарат. Выполняются тесты определения содержания соответствующих химических и вспомогательных веществ, указанных в нормативной документации, используемых для разрушения вируса и его инактивации.

Все исходные материалы и сырье, используемые при производстве, должны иметь сертификаты соответствия (допустимо только фармакопейное качество используемых компонентов). В состав вакцины должны входить вспомогательные компоненты, разрешенные к медицинскому применению и

в дозах не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Тиомерсал. От 42,5 до 57,5 мкг на дозу. Определение проводят колориметрическим или методом атомно-абсорбционной спектроскопии в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Овальбумин. Не более 1 мкг на дозу. Определение проводят иммуноферментным методом анализа с тест-системой для количественного определения овальбумина в жидкости. Чувствительность используемой тест-системы и условия проведения анализа указывают в нормативной документации.

Иммуногенность. Контролируют три первые серии вакцины, содержащие новый вакцинный штамм, по данным исследования в РТГА парных сывороток добровольцев, полученных до иммунизации и после нее по методу, описанному в разделе «Подлинность».

Для оценки иммуногенности должны быть взяты парные сыворотки (до вакцинации и через 21-28 дней после вакцинации). Обе сыворотки титруют одновременно в РТГА с эритроцитами петуха (раздел «Подлинность»). Титр в РТГА менее 1:10 оценивается как 1:5.

Показатели иммуногенности для серонегативных (с исходным титром не более 1:20):

- Число лиц с четырехкратным и более увеличением титра антител (сероконверсия) должно быть $> 40 \%$;
- Увеличение среднегеометрического титра (кратность нарастания) $> 2,5$ раза;
- Процент лиц с защитным титром антителом ≥ 40 должно быть $> 70\%$.

По крайней мере, один показатель должен отвечать вышеуказанным требованиям.

Каждую серию вакцины испытывают на группе из 30 человек в возрасте от 18 лет. Ввиду малочисленности групп лиц вакцинированных каждой серией вакцины при замене штамма в учет результатов могут быть включены серопозитивные лица (с титром антител ≥ 40).

Реактогенность. Вакцина должна быть ареактогенной или слабо реактогенной. Контролируют три первые серии вакцины, содержащей новый вакцинный штамм. Каждую серию вакцины испытывают на той же группе людей численностью 30 человек в возрасте от 18 лет, на которой определяют иммуногенность.

У части привитых могут наблюдаться местные и общие реакции различной степени выраженности; гиперемия, болезненность, припухлость в месте введения; недомогание, головная боль, повышение температуры. Местные реакции должны исчезать в течение от 1 до 3 суток (очень редко – до 5 суток), общие – в течение 3 суток. Допустимые реакции и их количество определяют для каждого конкретного препарата по результатам клинических исследований.

Производственные штаммы. Штаммы вирусов гриппа типа А и В для производства вакцин должны быть рекомендованы ВОЗ, ЕС и национальной Комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам. Должны соответствовать по антигенной структуре антигенной разновидности вирусов гриппа подтипов А(Н₁Н₁) и А(Н₃Н₂) и типа В на текущий эпидемический сезон, с известной историей пассажей и источника выделения.

Штаммы должны отвечать следующим требованиям:

- быть адаптированными к куриным эмбрионам и не требовать дополнительной аттенуации;
- быть стерильными: не содержать посторонних вирусов, микоплазм и микобактерий туберкулеза;

- быть специфичными в РТГА и РИНА (реакция ингибирования нейраминидазной активности) со штаммоспецифическими противогриппозными сыворотками;

- быть нетоксичными для белых мышей;

- иметь в лиофилизированном виде инфекционную активность на куриных эмбрионах не ниже 10^6 ЭИД₅₀/0,1 мл;

- должны вызывать накопление гемагглютининов в аллантоисной жидкости зараженных куриных эмбрионов в титре не ниже 1:256.

Производственные штаммы должны контролироваться не реже 1 раза в год.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Вторичная (потребительская) упаковка кроме общепринятых требований, должна содержать сведения о субстрате культивирования, составе штаммов, эпидсезоне, для которого предназначен препарат, количестве гемагглютинина каждого штамма в дозе, наличие или отсутствие консерванта либо его остаточное количество.

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в сухом месте. Замораживание не допускается.