

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вакцина оспенная живая

ФС.3.3.1.0033.15

Взамен ГФ X, ст.727

ФС 42-3133-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину оспенную живую, применяемую в качестве иммунобиологического лекарственного препарата (ИЛП). Вакцина представляет собой лиофилизат, содержащий вирус осповакцины, выращенный на скарифицированной коже телят, частично освобожденный от бактериальной флоры обработкой хлоргексидина биглюконатом. Одна прививочная доза должна содержать не менее 10^6 ООЕ (оспообразующих единиц). Вакцина выпускается с растворителем – 50 % раствором глицерина, стабилизатор – пептон в конечной концентрации 5 – 10 %. Вакцина не содержит антибиотиков.

Вакцина предназначена для профилактики натуральной оспы по эпидемическим показаниям, вакцинации лиц, работающих с вирусами осповакцины и оспы животных, патогенными для человека.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны быть валидированы в соответствии с установленными требованиями к правилам организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека.

Производство оспенной вакцины должно проводиться в отдельных изолированных помещениях, в которых не допускается производство других

лекарственных средств. Условия производства должны соответствовать требованиям санитарных правил «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Этапы производства оспенной вакцины включают: получение оспенного соскоба с кожи телят; очистку оспенного соскоба от белка кожи телят центрифугированием; освобождение от микрофлоры путем обработки хлоргексидина биглюконатом; приготовление жидкой вакцины и внесение стабилизатора; розлив и герметизация ампул в атмосфере азота. В процессе производства обязательным является испытание качества исходных материалов, вакцинного штамма, ляпиновакцины I, II и III генераций посевного вируса. Также обязательным является определение содержания патогенных анаэробных микроорганизмов в 1 мл вакцины, которое необходимо проводить на производстве на этапе контроля готовой нерасфасованной продукции, до ее маркировки. Культивирование патогенных анаэробных микроорганизмов проводят в анаэробных условиях. Испытание должно проводиться с использованием питательных сред, пригодных для культивирования патогенных анаэробных микроорганизмов.

Определение проводят методом посева образцов вакцины на среду Тароцци с созданием анаэробных условий. Для испытания используют не менее 5 образцов препарата. Содержимое каждой ампулы с вакциной растворяют в 0,2 мл стерильного 0,004 М буферного фосфатно-цитратного раствора (ФЦБ) Мак-Илвейна.

Примечания.

1. Приготовление ФЦБ раствора Мак-Илвейна 0,004 М (рН 7,2 – 7,4). Готовят растворы 1 и 2.

Раствор 1: Лимонная кислота – 2,1 г; Вода очищенная – 100 мл.

Раствор 2: В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 28,4 г натрия гидрофосфата безводного или 35,6 г натрия гидрофосфата дигидрата, или 71,6 г натрия гидрофосфата додекагидрата, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Смешивают 2 мл раствора 1 и 18 мл раствора 2 в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Полученный раствор должен иметь рН 7,2 – 7,4. Если рН полученного раствора более 7,4, его доводят до нормы раствором 1. В случае, если рН полученного раствора меньше 7,2, приготовление раствора повторяют. Буферный раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С и давлении $(0,1 \pm 0,01)$ МПа в течение 8 – 30 мин (в зависимости от объема) или фильтруют через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок хранения от 10 до 30 сут в зависимости от способа укупорки флаконов (способ укупорки флаконов должен быть указан в нормативной документации).

Среда Тароцци:

- Гидролизат мяса (по Хоттингеру)^{а)} – 250 мл;
- Ликадекс ПФ декстрозы моногидрат – 5 г;
- Натрия хлорид – 5 г;
- Агар микробиологический – 1 г;
- Фарш говяжий – 200 г;
- Вода очищенная – 1000 мл.

рН готовой среды $(7,3 \pm 0,2)$.

Готовую среду разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при давлении $(0,1 \pm 0,01)$ МПа, температуре (120 ± 1) °С в течение 15 мин. Хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

а) Гидролизат мяса (по Хоттингеру):

- Панкреатин 45 ед. – 20 г;
- Фарш говяжий – 500 г;
- Вода очищенная – 1000 мл.

Стерилизуют при давлении $(0,1 \pm 0,01)$ МПа, температуре (120 ± 1) °С в течение 15 мин. Хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

б) Фарш говяжий (на 1 кг).

Вырезка говяжья – 1,05 кг.

Хранению не подлежит.

Используемая питательная среда для культивирования патогенных анаэробных микроорганизмов должна обеспечивать рост соответствующих тест-штаммов. Обязательным условием при производстве препарата является определение посторонних примесей – хлоргексидина биглюконата, который используют в виде 0,5 % раствора для обработки шкур телят с оспенным детритом. Содержание примеси хлоргексидина биглюконата определяют в полуфабрикate на стадии получения оспенного соскоба. Содержание

хлоргексидина биглюконата в полуфабрикате не должно превышать 0,05 % при определении спектрофотометрическим методом.

Требования к животным. В качестве продуцентов для производства оспенной вакцины и посевного материала используют телят крупного рогатого скота в возрасте от 6 до 18 мес любой породы, предпочтительно светлой масти. Животные должны поступать из хозяйств, благополучных в отношении инфекционных агентов, в том числе прионовой природы. Каждая партия животных должна сопровождаться ветеринарным свидетельством, подтверждающим отсутствие инфекционных заболеваний. Все поступившие телята должны пройти 30-дневный карантин.

Требования к производственному штамму. В качестве вакцинного штамма используют вирус осповакцины, штамм Л-ИВП, полученный путем накожных пассажей на кроликах и телятах вакцины, изготовленной из штамма *Lister* института Листера (Великобритания). Штамм Л-ИВП хранится в коллекции производственных штаммов на предприятии-изготовителе. Для поддержания стабильных свойств штамма проводят 1 пассаж исходного штамма на коже кролика. Материалом исходного штамма служит ляпинов-вакцина III генерации. В результате пассирования исходного штамма на кроликах получают ляпину. Посевной вирус I генерации получают в результате пассажа ляпины на коже теленка. Посевной вирус II генерации получают путем пассажа посевного вируса I генерации на коже теленка. Для приготовления вакцины используют только ляпинов-вакцину III генерации. Взвесь посевного вируса должна отвечать следующим требованиям:

- может содержать суммарно не более 50 посторонних микроорганизмов в 1 мл, в том числе аэробных и факультативно-анаэробных бактерий и грибов;

- не должна содержать бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и вида *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, а также патогенных анаэробных бактерий;

- быть генетически однородной: допускается образование на хорионаллантоисных оболочках куриных эмбрионов (ХАО КЭ) не более 10 поражений поверхностного диффузного типа на 1000 типичных оспин (от 0,5 до 3 мм);

- на скарифицированной коже кроликов образовывать типичные вакцинальные поражения (оспины);

- не вызывать некрозы при внутрикожном введении кроликам 10^4 ООЕ/0,1 мл (ООЕ – оспообразующие единицы);

- не вызывать гибель кроликов при введении в мозг 10^4 ООЕ/0,1 мл;

- быть безвредной для морских свинок при введении подкожно 1 мл посевного вируса и для белых мышей при введении 0,2 мл посевного вируса подкожно;

- иметь специфическую активность не менее $1 \cdot 10^9$ ООЕ/мл.

Производственный штамм контролируется при получении каждой генерации посевного вируса.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса от бело-серого до светло-желтого цвета, гигроскопичная.

Подлинность. Вакцина должна вызывать на хорионаллантоисных оболочках (ХАО) 12-дневных куриных эмбрионов образование белых плотных поражений диаметром от 0,5 до 3 мм (испытания проводят одновременно с испытанием специфической активности оспенной вакцины). Вызывать типичные вакцинальные поражения (оспины) при накожном введении кроликам. Испытание проводят на 2 белокожих кроликах породы Шиншилла массой от 2,5 до 3,5 кг. На предварительно депилированные и скарифицированные участки кожи кроликов площадью около 5 см^2 наносят по 0,1 мл вакцины в разведениях 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5} . Для разведения используют 0,9 % раствор натрия хлорида. Испытания осуществляют параллельно со

стандартным образцом активности специфичности и некротической активности оспенной вакцины.

Через 5 – 7 сут у животных обеих групп на зараженных участках кожи должны образовываться типичные вакцинальные поражения (оспины).

При неудовлетворительных результатах контроль повторяют, как при первичном испытании. При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Время растворения. Должна растворяться в 0,3 мл 50 % раствора глицерина в течение 1 мин при перемешивании стеклянной палочкой. После растворения вакцина должна представлять собой опалесцирующую жидкость от беловато-серого до светло-желтого цвета без осадка и посторонних включений. Определение проводят визуально.

pH (восстановленного препарата). От 6,5 до 7,5. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». При получении неудовлетворительных результатов контроль повторяют на удвоенном количестве образцов. При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Микробиологическая чистота. 1 мл растворенной вакцины должен содержать суммарно не более 50 микроорганизмов, в том числе аэробных и факультативно-анаэробных бактерий и грибов; бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* должны отсутствовать. Содержимое ампул с вакциной растворяют до первоначального объема в 0,004 М стерильном ФЦБ растворе Мак-Илвейна. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытание проводят на 5 здоровых белых мышах массой 10 – 12 г и 2 морских свинках массой 250 – 300 г.

Вакцину растворяют до первоначального объема, указанного на ампуле, стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида и вводят подкожно морским свинкам в объеме 1 мл, белым мышам в объёме 0,2 мл. Наблюдение за животными проводят в течение 7 сут. Все животные должны оставаться живыми, признаки интоксикации и уменьшение массы тела должны отсутствовать. В случае гибели или появления признаков интоксикации или снижения массы тела у 1 животного испытание повторяют.

Вакцина выдерживает испытание, если ни 1 животное из второй группы не погибнет, не появятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела.

Специфическая активность. Вакцина должна иметь активность не менее $1 \cdot 10^8$ ООЕ/мл и не более $2 \cdot 10^9$ ООЕ/мл. Испытания проводят биологическим методом на хорионаллантоисных оболочках 12-дневных куриных эмбрионов (КЭ) от кур породы «Леггорн», «Роменбраун», «Родонит-2», «Изобраун» или «Хайсек», или пород кур, эмбрионы которых чувствительны к вирусу осповакцины.

Примечание. Куриные эмбрионы получают из хозяйств, свободных от вирусных и других возбудителей, патогенных для человека.

Контроль специфической активности вакцины проводят одновременно с определением специфической активности стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины.

Подготовка куриных эмбрионов. Проводят овоскопию куриных эмбрионов в затемненном помещении. Каждый эмбрион просматривают в направленном пучке света. Свет должен падать сверху на тупой конец яйца. Яйцо с погибшим эмбрионом, или имеющее кровоизлияние под оболочкой, бракуют. В центре воздушного мешка на тупом конце яйца и на боковой поверхности яйца на участке между сосудами и их ответвлениями карандашом делают отметку. В местах отметок с соблюдением правил асептики пропиливают бормашиной с абразивным диском отверстия (щели)

длиной 3 – 4 мм и шириной 1,5 мм, не повреждая оболочки. Яйцо укладывают так, чтобы отверстие на боковой стороне было обращено вверх. Подскорлупную оболочку в центре воздушного мешка прорывают плоской полукруглой хирургической иглой. Затем на отверстие, расположенное на боковой поверхности, вносят 0,1 мл 0,004 М стерильного ФЦБ раствора Мак-Илвейна, подогретого до температуры (50 ± 5) °С, и той же иглой осторожно продавливают подскорлупную оболочку. После этого практически вся капля раствора проходит под подскорлупную оболочку и частично отслаивает ХАО.

Из отверстия в центре воздушного мешка резиновой грушей осторожно отсасывают воздух до полного опускания ХАО и создания искусственного воздушного мешка под боковой щелью. Для контроля наличия и величины искусственного воздушного мешка вновь проводят овоскопию и бракуют эмбрионы, имеющие кровоизлияния, воздушные мешки под ХАО или без искусственных воздушных мешков. Яйца с опущенной ХАО помещают на лотки отверстием вверх и выдерживают 2 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Затем проводят овоскопию повторно и бракуют эмбрионы с воздушными мешками под ХАО, без искусственных воздушных мешков и эмбрионы с кровоизлияниями.

Приготовление десятикратных разведений. Для приготовления разведений используют стерильный ФЦБ. Готовят 7 десятикратных разведений: в штатив устанавливают 7 пробирок, которые маркируют от 10^{-1} до 10^{-7} . В первую пробирку вносят 4 мл ФЦБ. В последующие 6 пробирок вносят по 4,5 мл ФЦБ. Вскрывают 2 ампулы с вакциной и растворяют их содержимое в 0,5 мл ФЦБ, взятом из первой пробирки с маркировкой 10^{-1} . Полученный раствор из 2 ампул переносят пипеткой в пробирки с маркировкой 10^{-1} . Этой же пипеткой тщательно перемешивают раствор в пробирке и переносят 0,5 мл в пробирку с маркировкой 10^{-2} , не касаясь пипеткой жидкости, после чего меняют пипетку. Аналогичным образом

готовят последующие разведения до разведения 10^{-7} , меняя пипетки после каждого разведения.

Постановка основного опыта. Для заражения эмбрионов используют разведения вакцины 10^{-6} и 10^{-7} . Каждое разведение вируса вводят на ХАО 6 куриных эмбрионов по 0,1 мл в отверстие на боковой поверхности яйца. Круговым вращением яйца вирус равномерно распределяют по ХАО. Инокулированные эмбрионы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 42 – 48 ч. Затем эмбрионы вскрывают, разрезая скорлупу по длинной оси яйца, визуально определяют жизнеспособность куриного эмбриона. Изолируют пинцетом ХАО, промывают в воде и подсчитывают число оспин на каждой ХАО. Среднеарифметическое количество типичных оспин, развившихся на ХАО в учетном разведении, должно быть не менее 10. Специфическую активность вируса выражают в оспообразующих единицах в 1 мл (ООЕ/мл) и вычисляют по формуле:

$$\text{ООЕ/мл} = \frac{\text{среднее арифметическое число оспин на ХАО}}{\text{объем инфицирующей дозы} \cdot \text{разведение вируса}}$$

Контроль специфической активности вакцины проводят одновременно с определением специфической активности стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины в соответствии с инструкцией по применению.

Результат испытания серии вакцины принимают к учету при получении удовлетворительного результата определения специфической активности стандартного образца.

При получении неудовлетворительных результатов контроля серии вакцины проводят повторное испытание на удвоенном количестве образцов вакцины: разведение 10^{-1} получают растворением содержимого 4 ампул вакцины в 8 мл ФЦБ.

При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Некротическая активность. Вакцина в дозе 10^4 ООЕ/0,1 мл не должна вызывать некрозы при внутрикожном введении кроликам. Испытание проводят на 2 белокожих кроликах породы Шиншилла массой от 2,5 до 3,5 кг. Шерсть на боках в местах предполагаемых прививок удаляют. Для проведения испытания вакцину разводят стерильным ФЦБ до содержания 10^3 ; 10^4 и 10^5 ООЕ в 0,1 мл. Каждое разведение вакцины вводят кролику внутрикожно по 0,1 мл в 2 участка. Для проверки чувствительности кроликов к вирусу осповакцины тем же кроликам аналогичным образом на другом боку вводят по 0,1 мл растворы стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины с концентрацией 10^3 ; 10^4 и 10^5 ООЕ/0,1мл. Наблюдение за животными проводят в течение 4 – 5 сут.

Учет результатов. В местах инъекций вируса в дозе 10^4 ООЕ/0,1 мл не должны образовываться некрозы. Допустимо наличие ограниченных инфильтратов розового цвета. При появлении некрозов в дозе 10^4 ООЕ/0,1 мл хотя бы у 1 кролика и их отсутствие при введении стандартного образца испытание повторяют. При развитии некрозов после повторного испытания хотя бы у 1 кролика вакцину бракуют. При наличии некрозов в опыте со стандартным образцом активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины контроль повторяют.

Термостабильность. Вакцина должна быть термостабильной. Для проведения контроля вакцину прогревают при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 28 сут. Затем проводят контроль специфической активности прогретых образцов вакцины с одновременным контролем стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины (раздел «Специфическая активность»). Возможно проведение контроля одновременно с контролем специфической активности препарата в одном испытании. Вакцину считают термостабильной, если после прогревания она имеет специфическую активность не менее 10^8 ООЕ/мл.

При получении неудовлетворительных результатов контроля серии вакцины проводят повторное испытание на удвоенном количестве образцов вакцины: разведение 10^{-1} получают растворением содержимого 4 ампул вакцины в 8 мл ФЦБ.

При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Примечание. При необходимости экстренного контроля допускается прогревание вакцины при температуре $(61 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 5 ч.

Растворитель, выпускаемый в комплекте с препаратом

Растворитель – 50 % раствор глицерина, готовят из глицерина на 0,004 М ФЦБ растворе Мак – Илвейна .

Описание. Прозрачная бесцветная сиропообразная жидкость без запаха.

Подлинность. Должен давать характерную реакцию на трехатомный спирт. К 3 мл растворителя прибавляют 10 капель 10 % раствора меди сульфата и 0,2 мл 10 % раствора натрия гидроксида, должно появиться синее окрашивание, не изменяющееся при кипячении.

pH. От 6,8 до 7,4. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Количественное определение. Массовую долю глицерина в растворителе определяют по плотности в соответствии с ОФС «Плотность». Показатель плотности растворителя должен быть в пределах от 1,113 до 1,140 г/см³, что соответствует массовой доле глицерина 45 – 55 %.

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность», если в нормативной документации нет иных указаний.

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

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Допускается однократное кратковременное транспортирование при температуре от 9 до 20 °С (не более 24 ч).