

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Оценка специфической безопасности

ОФС.1.7.2.0010.15

производственных штаммов и

посевных вирусов

кори, паротита и краснухи

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод оценки специфической безопасности (остаточной нейровирулентности) производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи, используемых для изготовления живых вирусных вакцин.

Метод основан на изучении специфической безопасности (остаточной нейровирулентности) указанных производственных штаммов вирусов путем интрацеребрального заражения восприимчивых к указанным вирусам обезьян. Этот метод может быть также применен при оценке специфической безопасности (остаточной нейровирулентности) новых вакцинных штаммов вирусов кори, паротита и краснухи.

Исследованию на остаточную нейровирулентность подвергают каждую новую серию производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи. В процессе хранения производственный штамм должен контролироваться на генетическую стабильность 1 раз в 5 лет.

Животные. Испытания на нейровирулентность следует проводить на обезьянах макака резус, макака мулата или яванская макака. При отсутствии обезьян вида макака исследование материалов, содержащих вирусы кори и паротита, можно провести на зеленых мартышках.

На каждое испытание берут не менее 10 здоровых серонегативных обезьян. В качестве контроля используют дополнительно 4 серонегативные

обезьяны, двум из которых интрацеребрально вводят по 0,5 мл жидкости, собранной с незараженных культур клеток. Две другие обезьяны контрольной группы предназначены для оценки контагиозности производственного штамма (посевого вируса) и должны содержаться в непосредственной близости от опытных животных в течение всего периода наблюдения.

Производственный штамм (посевой вирус) считают не контагиозным, если сыворотки крови контрольных обезьян, содержащихся в непосредственной близости от опытных животных в течение всего периода наблюдения, не содержат специфических антител.

Введение исследуемого материала. Вирусосодержащий материал (жидкий полуфабрикат со стабилизатором) вводят каждой обезьяне по 0,5 мл в зрительные бугры обоих полушарий. Доза вируса кори и паротита для интрацеребрального введения составляет не менее десяти минимальных прививочных доз человека, для вируса краснухи – не менее одной минимальной прививочной дозы человека.

Материал вводят обезьянам под глубоким наркозом, который достигается путем внутримышечного введения препарата для наркоза в соответствии с инструкцией по его применению.

Перед введением исследуемого материала шерсть на голове у обезьян тщательно сбривают, и операционное поле дважды обрабатывают 70 % спиртом и 10 % настойкой йода. В момент заражения кожу головы натягивают назад и фиксируют рукой с целью последующего образования "биологического шва". Для заражения используют иглу длиной 2,3 - 2,5 см и диаметром 0,6 мм. Вирусосодержащую жидкость вводят в трепанационное отверстие, сделанное сверлом диаметром 1,5 мм, отступая 0,5 см назад от коронарного шва и на 1,0 - 1,5 см латеральнее саггитального шва на глубину 2,0 - 2,5 см, в зависимости от размеров черепа животного. Иглу вводят несколько вперед и медиально по направлению к глазу.

Рекомендуемая методика интрацеребральной инокуляции позволяет получить стандартные по топографии и глубине инокуляционные каналы, уменьшить вероятность повреждения стенок желудочков мозга и предупредить развитие посттравматических реакций, затрудняющих достоверную оценку степени нейровирулентности исследуемых материалов. При этом методе инокуляции постинъекционные рубцы располагаются симметрично с обеих сторон в области пре- и постцентральных извилин коры головного мозга, в подкорковых ганглиях (в головке хвостатого ядра, внутренней капсуле) и передних ядрах таламуса.

Серологические исследования. Непосредственно перед началом испытания необходимо убедиться с помощью адекватных серологических методов, что в сыворотке крови всех обезьян отсутствуют антитела к вирусу кори (паротита или краснухи соответственно).

В соответствии с рекомендациями ВОЗ материал считается успешно прошедшим испытание, если антитела вырабатываются не менее, чем у 80 % вакцинированных обезьян. При этом надо иметь в виду, что у вакцинированных зеленых мартышек антитела к исследуемым вирусам могут вырабатываться у меньшего количества животных (менее 80 %), что делает нецелесообразным исследование у зеленых мартышек наличия антител к вирусу кори и паротита после заражения. В этом случае оценка результатов основывается только на анализе гистологических и клинических данных.

Клинические наблюдения. Наблюдение за обезьянами, используемыми в тесте оценки остаточной нейровирулентности, проводят ежедневно в течение 17-21 сут при исследовании материалов, содержащих вирус кори или краснухи, и в течение 25-28 сут при исследовании материалов, содержащих вирус паротита. Наблюдение за контрольными животными проводят дополнительно еще в течение 10 сут. Животных, погибших в течение первых 48 ч после заражения, заменяют.

В период наблюдения регистрируют общие клинические симптомы и признаки поражения центральной нервной системы. Клинически значимыми

симптомами считают: изменение поведенческих характеристик животных (вялость, беспокойство), нарушение аппетита, повышение температуры тела (нормальная температура обезьян $38 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$), различные неврологические нарушения (парезы, параличи, наличие нистагма и косоглазия).

Морфологические исследования. По истечении срока наблюдения животных под глубоким наркозом обескровливают, производят аутопсию и гистологическое исследование головного и спинного мозга.

Из головного мозга каждого животного при испытании вирусов кори и краснухи должно быть исследовано 15 блоков (табл. 1); при контроле вируса паротита – 18 блоков (передние, задние и нижние рога боковых желудочков исследуются в обоих полушариях головного мозга).

Оценка степени нейровирулентности производственного штамма и посевного вируса паротита

При инфицировании ЦНС обезьян вирусом паротита «мишенью» является желудочковая система головного мозга. Для достоверной оценки параметров развивающегося патологического процесса необходимо максимально обследовать все отделы желудочковой системы. Срезы головного мозга производятся на определенных анатомических уровнях, которые вместе с соответствующими отделами желудочковой системы представлены в табл. 1. При вырезке кусочков головного мозга в протоколе обязательно фиксируют наличие инокуляционных каналов, их величину и топографию по отношению к стенкам боковых и третьего желудочков.

Оценке подлежат следующие отделы желудочковой системы:

- 1) передние рога боковых желудочков;
- 2) центральные части боковых желудочков;
- 3) нижние рога боковых желудочков;
- 4) задние рога боковых желудочков;
- 5) третий желудочек;
- 6) сильвиев водопровод;
- 7) четвертый желудочек.

Парные образования – боковые желудочки – оцениваются отдельно в правом и левом полушарии.

Основным проявлением паротитного процесса в ЦНС обезьян является патоморфологическая триада: хориоплексит, эпендимит и перивентрикулярный энцефалит. Степень выраженности и распространенности этих изменений являются основными морфометрическими параметрами, отражающими нейровирулентные свойства штаммов вируса паротита.

Для оценки интенсивности патоморфологических изменений в желудочковой системе обезьян используют четырехбальную шкалу:

1 балл (минимальные изменения). Один-два небольших лимфогистиоцитарных инфильтрата в строме сосудистого сплетения; слабая диффузная лимфоидная инфильтрация стромы сосудистого сплетения, единичные мелкие васкулиты в субэпендимарной зоне (СЭЗ).

2 балла (умеренные изменения). Три и более умеренно выраженных очаговых лимфогистиоцитарных инфильтратов в строме сосудистого сплетения; несколько васкулитов и/или умеренная диффузная инфильтрация стромы сосудистого сплетения и СЭЗ, умеренные дистрофические изменения и очаговая пролиферация эпендимного эпителия.

3 балла (выраженные изменения). Три и более выраженных инфильтратов в строме сосудистого сплетения, множественные васкулиты в СЭЗ; интенсивная диффузная инфильтрация вентрикулярной стенки на значительном протяжении; частичная дегенерация эпендимной выстилки наряду с интенсивной пролиферацией эпендимного эпителия и образованием папилломатозных выростов; субэпендимарный отек; адгезия воспаленного сосудистого сплетения к стенкам желудочка.

4 балла. Интенсивная воспалительная инфильтрация СЭЗ и стромы сосудистых сплетений; тяжелая дегенерация и десквамация эпендимного эпителия; некроз петель плексусов; адгезия сосудистого сплетения к вентрикулярным стенкам вплоть до полной обтурации полости желудочка;

поражение нейронов вне зоны инокуляционной травмы вне зависимости от степени поражения желудочковой системы.

Оценка степени нейровирулентности производственного штамма и посевного вируса кори (краснухи)

Степень выраженности морфологических изменений в месте введения вирусосодержащего материала, а также наличие и распространенность энцефалита, являются основными морфометрическими параметрами, отражающими нейровирулентные свойства вакцинного штамма вируса кори (краснухи).

Основные патоморфологические изменения возникают в месте инокуляции и сопровождаются развитием воспалительной реакции, очаговой демиелинизации, пролиферации глии и дистрофических изменений нервных клеток. При наличии инокуляционного повреждения желудочковой системы вакцинный вирус кори (краснухи) вызывает развитие преимущественно перивентрикулярного очагового энцефалита.

При вырезке кусочков головного мозга в протоколе обязательно фиксируют наличие инокуляционных каналов, их величину и топографию по отношению к стенкам боковых и третьего желудочков.

Для оценки интенсивности патоморфологических изменений в ЦНС обезьян используют четырехбалльную шкалу:

1 балл (минимальные изменения). Один-два лимфогистиоцитарных инфильтрата умеренной выраженности и/или слабая диффузная лимфоидная инфильтрация в строме сосудистого сплетения; обратимые дистрофические изменения единичных нервных клеток в перитравматической зоне, слабая диффузно-очаговая пролиферация глиальных и гистиоцитарных элементов по ходу сосудов и проводников, единичные васкулиты и/или слабая лимфоидно-клеточная инфильтрация в перитравматической зоне.

2 балла (умеренные изменения). Умеренная диффузная или диффузно-очаговая инфильтрация стромы сосудистого сплетения, умеренные дистрофические изменения и умеренная очаговая пролиферация

эпендимного эпителия; умеренная диффузно-очаговая пролиферация глиальных и гистиоцитарных элементов вокруг сосудов и по ходу проводящих путей и/или умеренные дистрофические изменения большей части нейронов в перитравматической зоне.

3 балла (выраженные изменения). Выраженные инфильтраты в строме сосудистого сплетения; частичная дегенерация эпендимной выстилки наряду с участками интенсивной пролиферации эпендимного эпителия; множественные васкулиты с участками интенсивной диффузной или очаговой глиально-гистиоцитарной пролиферации и/или выраженные дистрофические изменения и деструкция нервных клеток в перитравматической зоне.

4 балла. Множественные васкулиты с участками интенсивной диффузной или очаговой глиально-гистиоцитарной пролиферации в паренхиме мозга и/или выраженные дистрофические изменения и деструкция нервных клеток за пределами перитравматической зоны.

Критерии пригодности серий производственного штамма и посевного вируса паротита, кори, краснухи по результатам оценки остаточной нейровирулентности в тесте на обезьянах

Контроль считается недействительным и должен быть повторен, если:

- 1) более 20 % обезьян погибает от неспецифических причин, установленных патологоанатомическим вскрытием;
- 2) менее чем у 80 % зараженных обезьян имеется микроскопическое подтверждение инокуляционной травмы в таламической области;
- 3) в случае развития однотипных поражений в ЦНС обезьян опытной и контрольной групп.

При оценке результатов теста на остаточную нейровирулентность производственные штаммы и посевные вирусы кори, паротита и краснухи, считают не нейровирулентными, если:

1) у вакцинированных обезьян отсутствуют клинические симптомы поражения центральной нервной системы в течение всего периода наблюдения;

2) при гистологическом исследовании головного мозга обезьян отсутствуют изменения на 4 балла, а изменения на 3 балла отмечаются не более, чем у одного животного.

Результаты оценки степени нейровирулентности заносятся в протоколы (табл. 2 – образец протокола для вирусов кори и краснухи; табл. 3 – для вируса паротита).

Приложение

Таблица 1 – Срезы головного мозга и соответствующие отделы ЦНС, подлежащие гистологическому исследованию

№ п/п	Анатомический уровень среза	Отделы ЦНС, подлежащие исследованию	Условные обозначения
1	Фронтальный срез впереди передней спайки	Лобная зона коры (верхняя лобная извилина)	Л
		Передние рога боковых желудочков и отделы подкорковых ганглиев: головка хвостатого ядра, передняя ножка внутренней капсулы, чечевицеобразное ядро	А
2	Фронтальный срез на уровне сосцевидных тел	Двигательная зона коры (прецентральная извилина)	Д
		Центральные части боковых желудочков, третий желудочек, хвостатое ядро, таламус, внутренняя капсула, чечевицеобразное ядро	Г
3	Фронтальный срез через ножки мозга и мост	Теменная зона коры (постцентральная извилина)	Т
		Центральные части боковых желудочков и третий желудочек, тело хвостатого ядра, ядра таламуса, задняя ножка внутренней капсулы	У
		Гиппокамп; нижние рога боковых желудочков	Нр
4	Фронтальный срез через борозду птичьей шпоры	Затылочная зона коры	З
		Задние рога боковых желудочков	Зр
5	Поперечный разрез среднего мозга через пластинку четверохолмия	Сильвиев водопровод, черное вещество, ядра среднего мозга	хххх
6	Поперечный разрез моста на уровне выхода тройничного нерва	Оральная часть четвертого желудочка, собственные ядра Варолиева моста и расположенные в нем участки проводящих путей	ххх
7	Поперечный разрез ствола на границе между мостом и продолговатым мозгом	Центральная часть четвертого желудочка, ядра и участки проводящих путей, расположенные в дне ромбовидной ямки	хх
8	Поперечный срез продолговатого мозга	Каудальная часть четвертого желудочка, ядра олив, ретикулярная формация, ядра черепно-мозговых нервов, участки проводящих путей	х
9	Поперечный срез спинного мозга на уровне шейного утолщения	Шейный отдел спинного мозга: ядра серого вещества и проводящие пути белого вещества	Ш. о.
10	Поперечный срез спинного мозга на уровне поясничного утолщения	Поясничный отдел спинного мозга	П. о.

Таблица 2 – Протокол «Оценка интенсивности патоморфологических изменений в ЦНС обезьян, заражённых вирусом кори (краснухи)»

Вид обезьян
Дата инокуляции

Исследуемый вирус

Титр при инокуляции
Дата забоя обезьян

Номера обезьян	Интенсивность патоморфологических изменений в баллах														
	Условные обозначения отделов ЦНС обезьян, подлежащих гистологическому исследованию														
	Отделы головного мозга												Отделы спинного мозга		
	Л	А	Д	Г	Т	V	НР	ЗР	З	X X X X	X X X	X X	X	Ш.о	П.о.
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															

Примечание: «Л», «А» и т.д. – обозначения отделов ЦНС представлены в табл. 1.

Таблица 3 – Протокол «Оценка интенсивности патоморфологических изменений в ЦНС обезьян, заражённых вирусом паротита»

Вид обезьян
Дата инокуляции

Исследуемый вирус

Титр при инокуляции
Дата забоя обезьян

Номера обезьян	Интенсивность патоморфологических изменений в баллах															
	Условные обозначения отделов ЦНС обезьян, подлежащих гистологическому исследованию															
	Отделы головного мозга														Отделы спинного мозга	
	Л	А	ПР	Д	Г	Т	V	НР	ЗР	З	X X	X X X	X X	X	Ш.о	П.о.
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																

Примечание: «Л», «А» и т.д. – обозначения отделов ЦНС представлены в табл. 1.