

2.1.6.26. ИСПЫТАНИЯ НА ПОСТОРОННИЕ АГЕНТЫ В ВИРУСНЫХ ВАКЦИНАХ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Общая фармакопейная статья распространяется на методы обнаружения посторонних агентов в вирусных вакцинах для медицинского применения (вирусных вакцинах).

ВВЕДЕНИЕ

Стратегия испытания на присутствие посторонних агентов в вакцинах должна базироваться на оценке риска в соответствии с принципами риска вирусной контаминации, представленными в общей фармакопейной статье 2.3.1.3. Вирусная безопасность. Эта стратегия включает перечень подходящих испытаний, которые способны обнаруживать различные семейства посторонних вирусов, которые могут инфицировать посевные культуры вакцинных штаммов, включая клеточные культуры, сырье животного или растительного происхождения. Также учитывают способность производственного процесса удалять или инактивировать вирусы. Перечень испытаний, представленный в таблице 2.1.6.26.-1, необходимо адаптировать в зависимости от потенциально возможной контаминации посторонними агентами. Для испытаний *in vitro* при разрешении уполномоченного органа, по результатам оценки риска допустимо использование других пермиссивных клеточных линий или методов молекулярной биологии в зависимости от производственного процесса и температуры инкубации для роста конкретных вирусов. Испытания *in vivo* включают в стратегию на основании результатов оценки рисков в случаях их большей чувствительности для выявления некоторых вирусов по сравнению с тестами *in vitro* (например, испытания на новорожденных мышах для выявления вируса везикулярного стоматита, испытания на развивающихся куриных эмбрионах для выявления вируса гриппа).

Доступны новые чувствительные молекулярные методы с широкими возможностями обнаружения, включая методы высокопроизводительного секвенирования, методы амплификации нуклеиновых кислот (например, полимеразная цепная реакция, полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой, анализ обратной транскриптазы с усилением для семейств вирусов или методы случайного праймирования (связанные или не связанные с секвенированием), гибридизация с олигонуклеотидами и масс-спектрометрия с полимеразной цепной реакцией широкого спектра. Эти методы могут быть использованы как альтернативные испытаниям *in vivo* или специфичным методам амплификации нуклеиновых кислот, так и в качестве дополнения или альтернативы культуральным методам испытаний *in vitro* при соответствующем обосновании и разрешении уполномоченным органом.

В испытаниях требующих предварительной нейтрализации вируса должны использоваться антитела нечеловеческого и необезьяньего происхождения; в случаях культивирования вируса в культурах клеток птиц, антитела также должны быть нептичьего происхождения. При изготовлении антисыворотки для иммунизации используют антиген, полученный в свободной от посторонних агентов клеточной культуре вида, отличного от вида, являющегося источником клеточной культуры – субстрата производства вакцины. При использовании развивающихся куриных эмбрионов яйца должны быть получены из стада, свободного от патогенной микрофлоры (2.3.19.4 Стада кур для производства и контроля качества вакцин, не содержащие определенных патогенов).

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ

В таблице 2.1.6.26.-1 представлен перечень испытаний на посторонние агенты, необходимость проведения которых на различных этапах производственного процесса должна быть установлена на основе оценки риска. Методы испытаний на посторонние агенты, описание которых представлены ниже, должны рассматриваться вместе с информацией в таблице 2.1.6.26.-1.

Отбирают пробы во время сбора посевной культуры вируса или биомассы вируса и, если испытания не проводят немедленно, хранят при температуре ниже -40°C .

Таблица 2.1.6.26.-1. – *Виды испытаний на посторонние агенты различных этапах производства*

Испытание	Посевная культура вируса	Биомасса вируса	Субстраты для культивирования	
			контрольные клетки	контрольные эмбрионы
Контаминация микроорганизмами	+	+	-	-
Микоплазмы	+	+	-	-
Спироплазмы ¹⁾	+	-	-	-
Микобактерии	+	+ ⁹⁾	-	-
Испытания на новорожденных мышцах ²⁾	+	-	-	-
Вирусы птиц ³⁾	+	+	-	-
Испытания на посторонние агенты в клеточных культурах ⁴⁾	+	+ ⁹⁾	+	+
Вирусы насекомых ⁵⁾	+	+	-	-
Испытание контрольных клеток	-	-	+	-
Гемадсорбирующие вирусы	+	+	+	-
Испытание контрольных эмбрионов на гемагглютинирующие агенты	-	-	-	+
Вирус птичьего лейкоза ⁶⁾	+	-	+	+
Оценка наличия конкретных вирусов методами амплификации нуклеиновых кислот ⁷⁾	+	+	-	-
Испытания с использованием молекулярных методов с широкими возможностями ⁸⁾	+	+	-	-

Примечания.

1) Если используют клетки насекомых или сырье растительного происхождения.

2) Если оценка риска показывает, что испытание обеспечивает снижение риска с учетом всех проводимых испытаний на посторонние агенты.

3) Если вирус размножается в тканях или первичных клетках птиц и оценка риска показывает, что испытание обеспечивает снижение риска с учетом всех проводимых испытаний на посторонние агенты.

- 4) Испытание, проведенное на подходящих перmissive клеточных культурах, с учетом оценки риска.
- 5) Если вирус размножается в клетках насекомых.
- 6) Если вирус размножается в первичных клетках птиц (включая эмбрионы).
- 7) На основе оценки риска.
- 8) Методы могут быть использованы как альтернативные испытаниям *in vivo* или специфичным методам амплификации нуклеиновых кислот, а так же в качестве дополнения или альтернативы культуральным методам испытаний *in vitro* при соответствующем обосновании и разрешении уполномоченным органом. Испытание проводят на этапах производства, выбранных на основе оценки риска.
- 9) Неприменимо для инактивированных вирусных вакцин.

КОНТАМИНАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Каждая серия посевной культуры вируса и биомассы вируса должна соответствовать требованиям испытания на стерильность (2.1.6.1.)

МИКОПЛАЗМЫ

Каждая серия посевной культуры вируса и биомассы вируса должна соответствовать требованиям испытания на микоплазмы (2.1.6.25.)

СПИРОПЛАЗМЫ.

Испытания на спироплазмы проводят для серии посевной культуры вируса, если для размножения вируса была использована линия клеток насекомых и(или) сырьё растительного происхождения. Если применимо проводят испытания серии посевной культуры вируса валидированным методом, одобренным и разрешенным уполномоченным органом. Допустимо использование методов амплификации нуклеиновых кислот для обнаружения микоплазм (2.1.6.25.) при соответствующем обосновании и разрешении уполномоченного органа.

МИКОБАКТЕРИИ

Каждая серия посевной культуры вируса и биомассы вируса должна соответствовать требованиям испытания на микобактерии (2.1.6.14). Испытания проводят с использованием образца посевной культуры вируса и биомассы вируса объемом 2,7 мл. Допустимо использование методов амплификации нуклеиновых кислот (2.1.6.17) в качестве альтернативных культуральному методу при соответствующем обосновании сопоставимости получаемых результатов.

ИСПЫТАНИЕ НА НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШАХ

Испытание проводят для каждой серии посевной культуры вируса, если оценка риска показывает, что оно обеспечивает снижение риска с учетом результатов всех других испытаний на посторонние агенты, проведенных для данной серии.

В испытании используют не менее 20 новорожденных мышей в возрасте не старше 24 часов.

Серию посевной культуры вируса вводят каждому животному внутрибрюшинно в объеме не менее 0,1 мл и интрацеребрально – 0,01 мл.

Наблюдают за новорожденными мышами в течение не менее четырех недель. Всех павших в течение первых 24 часов животных вскрывают и проводят макроскопическое исследование с целью установления причины. Заболевших животных исследуют для установления причины.

Серия посевной культуры вируса выдерживает испытание, если у всех животных отсутствуют признаки инфекции, связанной с испытуемым образцом. Испытание считают недействительным, если менее 80 % новорожденных мышей в каждой группе доживают до конца периода наблюдения.

ВИРУСЫ ПТИЦ

Испытания проводят для каждой серии посевной культуры вируса и биомассы вируса, полученной в тканях или первичных клетках птиц, если оценка риска показывает, что испытание обеспечивает снижение риска с учетом всех других испытаний на посторонние агенты, проведенных для данной серии.

В испытании используют куриные эмбрионы яиц, полученных от стад кур категории СПФ (2.3.19.4.).

Нейтрализуют испытуемый образец, эквивалентный 100 дозам вакцины для человека или 10 мл (в зависимости от того, что больше). По 0,5 мл образца вводят

- в аллантоисную полость группы куриных эмбрионов в возрастном периоде от 9 сут до 11 сут;

- в желточный мешок группы куриных эмбрионов в возрастном периоде от 5 сут до 7 сут.

Инкубируют семь суток и определяют в аллантоисной жидкости наличие гемагглютининов. Серия посевной культуры вируса и биомассы вируса выдерживает испытание, если в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов не обнаруживают гемагглютинирующих агентов, а также ни у одного эмбриона и ни на одной хорионаллантоисной оболочке не будут обнаружены макроскопические признаки патологии.

Испытание считают недействительным, если менее 80 % куриных эмбрионов доживают до конца периода наблюдения.

ИСПЫТАНИЕ НА ПОСТОРОННИЕ АГЕНТЫ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

Испытания для каждой серии посевной культуры вируса, биомассы вируса и субстрата культивирования (контрольные клетки или контрольные эмбрионы) проводят на основе оценки риска с учетом особенностей производственного процесса. При выборе подходящих перmissive клеточных линий учитывают характеристики субстрата производства и штамма вируса, а также потенциально возможные посторонние агенты, которые могут быть случайно занесены во время производственных процессов или при использовании сырья животного или растительного происхождения.

Испытание посевной культуры вируса и биомассы вируса

Нейтрализуют вируссодержащий образец, эквивалентный 500 (если не указано иное) дозам вакцины для человека или 50 мл (в зависимости от того, что больше) и помещают в культуру диплоидных клеток человека или перевиваемых клеток обезьян. Если посевную культуру вируса и биомассу вируса получают в клетках человека или обезьяны, испытание проводят с использованием отдельной серии культуры этих клеточных линий. Если посевную культуру вируса и биомассу вируса получают в клетках млекопитающих, но не человека или обезьяны, или в клетках птиц, то испытание также проводят с использованием отдельной серии культуры этой клеточной линии.

Культивируют клетки при температуре от 35 °С до 37 °С в течение 14 сут. Если выращивание вируса в культуре клеток осуществляют при температуре, отличной от указанной, проводят дополнительное испытание на посторонние агенты при температуре культивирования в производственном процессе с использованием отдельной серии культуры этих же клеток. Проводят субкультивирование в течение 14 сут, по окончании которого проводят испытание на гемадсорбирующие вирусы (раздел *Гемадсорбирующие вирусы* настоящей общей фармакопейной статьи).

Серия посевной культуры вируса и биомассы вируса выдерживает испытание, если в клеточной культуре не обнаруживают посторонних агентов (отсутствие цитопатического эффекта) через 14 сут и 28 сут инкубации и не обнаруживают признаков каких-либо гемадсорбирующих агентов.

Испытание считают недействительным, если жизнеспособными остаются менее 80 % клеток.

Испытание контрольных клеток

Если для производства вируса используют клеточные культуры, испытание проводят с использованием культуральной жидкости контрольных клеток.

В конце периода наблюдения за контрольными клетками (раздел *Испытание контрольных клеток* настоящей общей фармакопейной статьи) через 14 сут или во время последнего сбора биомассы вируса, в зависимости от того, что дольше, объединяют культуральные жидкости из контрольных клеток и помещают в культуры клеток соответствующих клеточных линий в зависимости от клеток, используемых в производственном процессе (подраздел *Испытание посевной культуры вируса и биомассы вируса* раздела *Испытание на посторонние агенты в клеточных культурах* настоящей общей фармакопейной статьи). Устанавливают отсутствие или наличие посторонних агентов (по цитопатическому эффекту) через 14 суток и любых гемадсорбирующих вирусов через 14 сут (раздел *Гемадсорбирующие вирусы* настоящей общей фармакопейной статьи).

Контрольные клетки выдерживают испытание, если через 14 сут в клеточной культуре не обнаруживают посторонних агентов (отсутствие цитопатического эффекта) и не обнаруживают признаков каких-либо гемадсорбирующих вирусов.

Испытание считают недействительным, если жизнеспособными остаются менее 80 % клеток.

Испытание контрольных эмбрионов

Если для производства вируса используют эмбрионы, испытание проводят с использованием аллантоисной жидкости контрольных эмбрионов.

Объединяют аллантоисные жидкости контрольных эмбрионов. Помещают по 5 мл полученного образца в культуру подходящих пермиссивных клеток, включая клетки человека, обезьяны и птиц. Наблюдают за клеточными культурами в течение 14 сут при подходящей температуре культивирования.

Контрольные эмбрионы выдерживают испытание, если через 14 сут в клеточной культуре не обнаруживают посторонних агентов (отсутствие цитопатического эффекта).

Испытание считают недействительным, если жизнеспособными остаются менее 80 % клеток.

ВИРУСЫ НАСЕКОМЫХ

Для каждой серии посевной культуры вируса и биомассы вируса, полученной в клетках насекомых, проводят испытания на наличие вирусов насекомых.

Нейтрализуют вируссодержащий образец, эквивалентный 500 (если не указано иное) дозам вакцины для человека или 50 мл (в зависимости от того, что больше) и помещают в культуру не менее одной клеточной линии, отличной от используемой в производстве, чувствительной к вирусам насекомых и позволяющей выявить арбовирусы человека (например, *ВНК-21*). При выборе подходящей для испытания клеточной линии учитывают происхождение клеточной линии, используемой в производстве, и возможные посторонние агенты, для которых выбранные клетки должны быть пермиссивными. Выбранные клеточные линии должны быть разрешены к применению в испытании уполномоченным органом.

Культивируют клетки при подходящей температуре в течение 14 сут. Проводят субкультивирование в течение 14 сут, по окончании которого проводят испытание на гемадсорбирующие вирусы.

Серия посевной культуры вируса и биомассы вируса выдерживает испытание, если в клеточной культуре не обнаруживают посторонних агентов (отсутствие цитопатического эффекта) через в течение 14 сут и 28 сут инкубации и не обнаруживают признаков каких-либо гемадсорбирующих агентов.

Испытание считают недействительным, если жизнеспособными остаются менее 80 % клеток.

ИСПЫТАНИЕ КОНТРОЛЬНЫХ КЛЕТОК

Если для производства вируса используют клеточные культуры, в течение всего периода культивирования вируспродуцирующих клеточных культур или в течение не менее 14 дней после внесения посевной культуры вируса в клеточную культуру, в зависимости от того, что дольше, проводят микроскопическое определение цитопатического эффекта, связанного с посторонним вирусом

Испытание считают недействительным, если жизнеспособными в конце периода наблюдения остаются менее 80 % контрольных клеток.

Через 14 суток или во время последнего сбора биомассы вируса, в зависимости от того, что наступит дольше, исследуют не менее 25 % контрольных клеток на наличие гемадсорбирующих вирусов (раздел *Гемадсорбирующие вирусы* настоящей общей фармакопейной статьи).

ГЕМАДСОРБИРУЮЩИЕ ВИРУСЫ

Испытание на гемадсорбирующие вирусы проводят путем добавления эритроцитов морской свинки в клеточную культуру. Эритроциты морской свинки хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более семи суток. Половину клеточных культур инкубируют при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 30 мин, а другую половину – при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 30 мин, после инкубации оценивают наличие гемадсорбции.

Если испытание на гемадсорбирующие вирусы невозможно, проводят испытание на гемагглютинирующие вирусы. Признаки гемадсорбции должны отсутствовать; если применимо, гемагглютинирующие агенты, должны отсутствовать.

ИСПЫТАНИЕ КОНТРОЛЬНЫХ ЭМБРИОНОВ НА ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИЕ АГЕНТЫ

Если для производства вируса используют эмбрионы, проводят следующие испытания:

- смешивают 0,25 мл аллантоисной жидкости каждого контрольного эмбриона с куриными эритроцитами и оценивают наличие гемагглютинации (прямой метод);

- объединяют аллантоисные жидкости контрольных эмбрионов. Помещают по 0,5 мл полученного образца в аллантоисную полость и амниотическую полость куриных эмбрионов яиц, полученных от стад кур категории СПФ (2.3.19.4.), в возрастном периоде от 9 сут от 11 сут. После соответствующего инкубационного периода проводят испытание прямым методом (непрямой метод).

Контрольные эмбрионы выдерживают испытание, если отсутствуют данные о наличии гемагглютинирующих агентов.

ВИРУС ПТИЧЬЕГО ЛЕЙКОЗА

Испытания проводят для каждой серии посевной культуры вируса, полученной в тканях или первичных клетках птиц и субстрата для культивирования (контрольные клетки или контрольные эмбрионы)

В случае влияния вируса на методику проведения испытания нейтрализуют вирусосодержащий образец серии посевной культуры вируса с помощью специфической антисыворотки.

В конце периода наблюдения за контрольными клетками через 14 сут или во время последнего сбора биомассы вируса, в зависимости от того, что дольше, объединяют культуральные жидкости контрольных клеток.

Объединяют аллантоисные жидкости контрольных эмбрионов во время последнего сбора биомассы вируса.

Проводят испытание в два этапа, включающих накопление и последующее обнаружение. Для накопления проводят не менее четырех пассажей в клетках *DF-1* или безлейкозных клеточных культурах из тканей куриных эмбрионов в возрастном периоде

от 9 сут от 11 сут, полученных от стад кур категории СПФ (2.3.19.4.) с использованием не менее 0,5 мл посевной культуры вируса или не менее 5 мл объединенной культуральной жидкости из контрольных клеток или не менее 10 мл объединенных аллантаоисных жидкостей контрольных эмбрионов. В качестве положительного контроля проводят культивирование вируса птичьего лейкоза трех штаммов (подгруппы А, В и J). По окончании культивирования проводят три цикла замораживания-оттаивания для высвобождения любых группоспецифичных антигенов вируса птичьего лейкоза.

В полученном лизате проводят специфическое выявление антигена *ALV p27* вируса лейкоза птиц подходящими методами, включая иммуноокрашивание, иммуноферментный анализ (2.1.6.10) и метод на основе реакции связывания комплемента (КоФАЛ-тест). Альтернативно может быть использован анализ обратной транскриптазы с усилением для семейств вирусов после амплификации в клетках *DF-1* для обнаружения экзогенных ретровирусов птиц (включая вирус птичьего лейкоза).

Серия посевной культуры вируса, контрольные клетки и контрольные эмбрионы выдерживают испытание, если отсутствуют данные о наличии вируса птичьего лейкоза.

ИСПЫТАНИЯ НА ОПРЕДЕЛЕННЫЕ ВИРУСЫ МЕТОДАМИ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Испытания методами амплификации нуклеиновых кислот (2.1.6.17.) на наличие определенных вирусов проводят для каждой серии посевной культуры вируса и биомассы вируса на основании оценки риска, связанного с производственным процессом.

ИСПЫТАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ С ШИРОКИМИ ВОЗМОЖНОСТЯМИ ОБНАРУЖЕНИЯ

При соответствующем обосновании и разрешении уполномоченным органом молекулярные методы с широкими возможностями обнаружения, например, высокопроизводительное секвенирование, могут быть использованы как альтернативные испытаниям *in vivo* или специфичным методам амплификации нуклеиновых кислот, так и в качестве дополнения или альтернативы культуральным методам испытаний *in vitro* на основе оценки риска.

Испытания методами амплификации нуклеиновых кислот (2.1.6.17.) и молекулярные методы с широкими возможностями обнаружения проводят как с предварительной амплификацией, так и без нее в подходящих пермиссивных клетках.

В случае получения положительных результатов в испытаниях методами амплификации нуклеиновых кислот (2.1.6.17.) и молекулярными методами с широкими возможностями обнаружения должно быть установлено, связано ли обнаружение нуклеиновых кислот с контаминацией серии посевной культуры вируса и биомассы вируса посторонними инфекционными агентами и(или) представляют ли они риск для здоровья человека.