**Коклюшная суспензия ФС**

**инактивированная, субстанция Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на коклюшную суспензию (КС) инактивированную, субстанцию. Коклюшная суспензия инактивированная, субстанция представляет собой суспензию убитых формалином коклюшных бактерий первой фазы трех штаммов *Bordetella pertussis (B. pertussis)* (cеротип 1.2.3 – 1 штамм, серотип 1.0.3 – 1 штамм, серотип 1.2.0 – 1 штамм), взятых в равных соотношениях или в соотношении 4:3:3. Штаммы должны обладать минимальной токсичностью при сохранении иммуногенной активности.

В 1 мл субстанции содержатся коклюшные бактериальные клетки в 0, 9 % растворе натрия хлорида в количестве от 60 до 70 млрд.

В состав субстанции может входить консервант.

Субстанция коклюшной суспензии инактивированной предназначена для производства комбинированных вакцин с цельноклеточным или бесклеточным коклюшным компонентом.

ТЕРМИНЫ

*Исходный штамм* – ампула с производственным штаммом *B. pertussis,* полученная из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ).

*Серия производственного штамма –* ампулы с рассеянной и лиофильно высушенной бактериальной массой исходного штамма, которую ежегодно проверяют по всем требуемым показателям.

*Посевная серия –* культура из серии производственного штамма с подтвержденными иммунобиологическими свойствами, характерными для данного штамма.

*Разовый сбор –* суспензия бактерий одного штамма *B. pertussis,* полученная из культур, посеянных, собранных и обработанных вместе.

*Сведенная коклюшная суспензия одного штамма* *–* сведенная коклюшная суспензия разового сборабактерий одного штамма *B. pertussis*

*Сведенная коклюшная суспензия трех штаммов* *–* объединенныесведенные коклюшные суспензии бактерий трех штаммов *B. pertussis*

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства коклюшной суспензии инактивированной, субстанции должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих безопасность ее применения.

*Штаммы B. pertussis*

Для производства КС используют штаммы, депонированные в ГКПМ. Штаммы идентифицируют на основе документов, отражающих их происхождение, а также данных о результатах всех тестов, регулярно проводимых для подтверждения свойственных этим штаммам характеристик. Штаммы следует поддерживать таким образом, чтобы активность получаемых из них вакцин не снижалась. Хранят штаммы в виде лиофилизата при температуре минус 20 ºС или ниже, допускается хранение при 2-8 ºС.

Живую культуру штаммов оценивают на микробиологическую чистоту, проверяют по культуральным, морфологическим, серологическим свойствам, антигенной структуре, гемагглютинирующей, гемолитической, дермонекротической активностям, вирулентности; после обезвреживания формалином и внесения тиомерсала оценивают безопасность и иммуногенность. Используемые штаммы *B. pertussis* должныотвечать требованиям, характерным для гладкой формы (фазы I) бактерий.

*Система посевных серий*

Производство КС должно быть основано на системе посевных серий. Культура посевной серии должна обладать теми же характеристиками, что и культура исходного штамма. Ежегодно перед использованием в производстве посевные серии должны быть проверены по всем регламентированным показателям и содержать в своем составе агглютиногены 1, 2, 3.

Культуры должны агглютинироваться соответствующими адсорбированными сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3, присущим штамму, в титре не ниже 1:1280. Если содержание агглютиногенов 1, 2, 3 в бактериальных клетках посевной серии не соответствует требуемым значениям, следует провести селекционную работу по поиску и выделению отдельных колоний *B. pertussis* активно экспрессирующихагглютиногены. С этой целью лиофилизированную культуру после регидратирования в 1 % растворе гидролизата казеина или 0,9 % растворе натрия хлорида высевают на чашки Петри со средой Борде-Жангу, содержащей 30 % крови, или КУА, содержащей 10 % крови, так, чтобы получить изолированные колонии. Затем культуру инкубируют при температуре (35,5 ± 0,5) °С в течение 3-4 суток. После окончания срока культивирования выросшую культуру изучают под микроскопом-лупой. Способность бактериальных клеток *B. pertussis* диссоциировать проявляется формированием на поверхности плотных питательных сред гетерогенной популяции сформировавшихся колоний, различающихся по морфологическим признакам. Наряду с характерными мелкими полупрозрачными колониями встречаются колонии среднего и крупного размера матового цвета. Уровень агглютиногенов определяют в образцах бактериальной культуры, полученных из отобранных по морфологическим признакам отдельных типичных колоний. Из отобранных 10-12 колоний получают 10-12 образцов культуры. Для получения образца единичную колонию пересевают на питательную среду, наращивают бактериальную массу и полученную коклюшную суспензию исследуют в реакции агглютинации (РА) на содержание агглютиногенов 1, 2, 3. Те образцы, которые демонстрируют высокое содержание агглютиногенов (обычно из 10-12 колоний это 2-4 колонии), используют для получения бактериальной массы, которую подвергают лиофильному высушиванию. После подтверждения всех требуемых свойств коклюшной суспензии новую партию лиофильно высушенной культуры можно использовать в качестве посевной серии. Если однократной селекции колоний для повышения количественного содержания агглютиногенов в бактериальных клетках недостаточно, то селекцию проводят повторно.

*Контроль разовых сборов*

Следует доказать стабильность технологического процесса. Параметрами анализа могут быть признаки, характерные для бактерий I фазы, например, гемолитическая активность, скорость роста культуры или уровень агглютиногенов 1, 2, 3. Разовый сбор не может быть использован в дальнейшем производстве пока не будет продемонстрировано, что клетки *B. pertussis,* входящие в его состав, имеют те же самые характеристики, что и исходная посевная серия.

Культуру бактерий с атипичными ростовыми характеристиками необходимо исследовать чтобы убедиться в ее соответствии требованиям, прежде чем использовать в качестве разового сбора.

Культуры I, II, III пассажей, а также маточную и производственную культуру проверяют по морфологическим свойствам и чистоте, кроме того, в культуре II пассажа определяют уровень агглютиногенов 1, 2, 3, а маточную культуру проверяют на отсутствие контаминации («стерильность»).

Смытую бактериальную взвесь контролируют по морфологии, чистоте и мутности. Мутность необходимо определять не позже чем через 2 недели после сбора и до того, как бактериальная суспензия будет подвергнута какой-либо обработке, способной изменить ее мутность. Этот показатель следует определять путем сравнения с Международным стандартным образцом (МСО) мутности или эквивалентным отечественным стандартным образцом (СО).

После определения мутности суспензий коклюшные бактерии и токсины инактивируют, при этом суспензия приобретает иную мутность. Однако количество бактерий в каждом разовом сборе необходимо считать неизменным.

Коклюшную суспензию разового сбора контролируют по морфологии и чистоте, мутности, рН, стерильности специфической, содержанию остаточного формальдегида и тиомерсала, стерильности общей.

*Контроль сведенной коклюшной суспензии одного штамма*

Коклюшную суспензию контролируют по физическим свойствам, подлинности, чистоте, мутности, рН, стерильности общей, содержанию остаточного формальдегида и тиомерсала, уровню агглютиногенов 1, 2, 3, специфической безвредности на мышах, иммуногенности.

*Контроль сведенной коклюшной суспензии трех штаммов*

Коклюшную суспензию контролируют по всем показателям, используемым для оценки сведенной суспензии одного штамма и, кроме того, следует доказать отсутствие биологически активного дермонекротического токсина. С этой целью проводят тест на мышах-сосунках.

В изготовленной субстанции уровень агглютиногенов 1, 2, 3 следует определять перед добавлением адъюванта или объединением с другими компонентами (антигенами) комбинированных вакцин.

До сведения в серию комбинированной вакцины коклюшная суспензия, субстанция должна храниться при температуре 2-8 ºС не менее трех месяцев и не более 1 года. Суспензии, изменившие мутность во время хранения более чем на 10 % бракуют.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Гомогенная серовато-белого цвета суспензия, разделяющаяся при отстаивании на прозрачную надосадочную жидкость и рыхлый осадок, полностью разбивающийся при встряхивании. Не допускается наличие неразбивающихся хлопьев и посторонних включений. Определение проводят визуально.

**Подлинность.** В мазках, окрашенных по Граму, должны быть грамотрицательные, овоидной формы мелкие палочки (коккобактерии), располагающиеся отдельно или парами, без признаков полиморфизма. Определяют микроскопическим методом.

Подлинность подтверждается специфической активностью. Определяют биологическим методом (по разделу «Специфическая активность»).

**рН.** От 6,8 до 7,4. Определяют потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Мутность.** От 60 до 70 международных единиц мутности (МЕ). Мутность микробной взвеси определяют визуально по стандартному образцу мутности, откалиброванному по международному стандартному образцу в международных единицах.

Примечание

1 МЕ условно принята за 1 млрд коклюшных бактериальных клеток в 1 мл.

**Стерильность.** Должна быть стерильной. Определяют методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30 - 35 ºС и при 20 - 25 ºС.

**Специфическая безопасность.** Должна быть безопасной. Полноту инактивации коклюшных бактерий определяют на белых мышах и мышах-сосунках.

*Испытание на белых мышах*

Для испытания используют здоровых беспородных животных одного пола из одной партии. При использовании самцов и самок, их равномерно распределяют по группам. Животные должны иметь доступ к пище и воде по меньшей мере за 2 часа до введения вакцинной массы и затем на протяжении всего периода испытания. В тесте используют животных, равномерно прибавляющих массу тела в течение 3-4 сут наблюдения. Ежесуточный прирост массы тела мышей должен составлять не менее 0,4 г. С отобранными по весу животными проводят рандомизацию.

Испытуемую КС вводят внутрибрюшинно 10 белым мышам массой 14-16 г в объеме по 0,5 мл, содержащем 10 млрд коклюшных бактерий (прививочная доза вакцины для человека). Мышам контрольной группы (10 животных) внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида или, если вакцина содержит консервант, по 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида консервантом в той концентрации, которая присутствует в вакцине. Общую массу каждой группы мышей определяют непосредственно перед введением препаратов, через 72 ч и спустя 7 сут после введения. Вакцина считается безопасной, если:

а) через 72 ч общая масса тела группы вакцинированных животных не ниже их массы тела перед введением препарата;

б) через 7 сут относительный прирост средней массы тела мыши составляет не менее 60 % прироста средней массы тела контрольной мыши.

В случае если коклюшная суспензия не выдерживает требования или наблюдается гибель не более одного животного, опыт повторяют на том же количестве животных, результаты двух испытаний суммируют. При этом допускается гибель не более 5 % вакцинированных мышей.

Испытание на мышах-сосунках

Определение проводят на 4-дневных аутбредных мышах самцах и самках. В качестве положительного контроля используют живую 2–х суточную культуру тест-штамма 18323 или производственного штамма 2-3 пассажа, выращенную на среде Борде- Жангу с 30 % крови человека или КУА с 10 % крови человека. Выросшую культуру разводят до содержания 40 млрд бактериальных клеток/мл или 2 млрд/0,05 мл. Далее готовят 2-кратные разведения живой культуры. В качестве отрицательного контроля используют серию, отконтролированную ранее, с содержанием бактериальных клеток 20 млрд/мл или 1 млрд/0,05 мл, а также 0,9 % раствор натрия хлорида. Исследуемые образцы разводят до 20 млрд/мл или 1 млрд/0,05 мл. Каждое разведение вводят туберкулиновым шприцем по 0,05 мл подкожно двум мышам-сосункам в область шеи со стороны спины.

Учет результатов проводят через 24 ч. Положительной реакцией является сине-пурпурное окрашивание кожного покрова в месте инъекции. Отрицательной реакцией является отсутствие изменения цвета кожного покрова. Инактивированная коклюшная суспензия не должна вызывать изменения цвета кожных покровов мышей-сосунков.

Примечания

Методики приготовления и состав среды Борде-Жангу с 30 % крови человека, фильтрата картофельного отвара, среды КУА с 10 % крови человека (на 1 л), дрожжевого диализата, гидролизата казеина должны быть приведены в нормативной документации.

**Агглютиногены.** Должна агглютинироваться соответствующими адсорбированными сыворотками к агглютиногенам, присущим штамму, в титре не ниже 1:1280. Испытание проводят серологическим методом с использованием СО Национального института биологических стандартов и контроля NIBSC или СО предприятия «Сыворотки коклюшные к агглютиногенам 1, 2, 3 адсорбированные, для реакции агглютинации, сухие», аттестованного в установленном порядке.

Для постановки развернутой реакции агглютинации готовят двукратные разведения сывороток от 1:160 до 1:10240 в 0,9 % растворе натрия хлорида.

Во все пробирки с приготовленными двукратными разведениями сывороток вносят равный объем (например, 0,5 мл) испытуемой микробной взвеси с мутностью 10 МЕ. В качестве референс-препарата используют приготовленную ранее серию КС с соответствующим сроком годности, которая в испытании показала высокую иммуногенную активность (10 МЕ/мл и более). Одновременно проводят контроль сыворотки и антигена в тех же объемах на отсутствие спонтанной агглютинации, смешивая:

- 0,5 мл сыворотки в разведении 1:160 с 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида;

- 0,5 мл микробной взвеси КС с 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Содержимое пробирок перемешивают, затем штатив с пробирками помещают на 2 ч в термостат при температуре (36±1) ºС, после чего оставляют на 18-20 ч при температуре (5±3) ºС.

Результаты реакции агглютинации учитывают визуально. Титром считают величину, соответствующую последнему удвоенному разведению сыворотки, дающему агглютинацию, соответствующую 3+.

Учет результатов реакции проводят по «четырехкрестовой» системе:

4+ - полная агглютинация: обильный плотный осадок, четко сформирован «зонтик», полное просветление надосадочной жидкости; после легкого встряхивания – крупные хлопья в прозрачной надосадочной жидкости;

3+ - осадок большой, рыхлый, надосадочная жидкость еще прозрачна, слегка опалесцирует; после легкого встряхивания – средние хлопья в слегка опалесцирующей надосадочной жидкости;

2+ - мелкие, нестойкие хлопья, осадок небольшой, рыхлый, надосадочная жидкость непрозрачна; после легкого встряхивания – мелкие, нестойкие хлопья;

+ - следы агглютинации: в центре небольшой осадок, надосадочная жидкость непрозрачная;

– - отрицательная реакция: осадка нет или небольшой компактный осадок в центре дна пробирки, взвесь равномерно мутная.

При титре ниже 1:1280 субстанция подлежит повторному контролю с соответствующими агглютинирующими сыворотками других серий. При повторных неудовлетворительных результатах испытуемую серию КС бракуют.

**Специфическая (иммуногенная) активность.** Должна быть иммуногенной. В 1 мл, содержащем 20 млрд коклюшных бактерий, должно быть не менее 8 международных единиц (МЕ). Нижний предел значения специфической активности при доверительном интервале (Р = 0,95), должен быть не менее 4 МЕ/мл. Определение проводят методом летального заражения в соответствии с ОФС «Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного компонента комбинированных вакцин».

**Формальдегид**. Не более 300 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

**Консервант.** Тиомерсал (при наличии). От 80 до 120 мкг/мл. Определение проводят подходящим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах».

**Производственные штаммы микроорганизмов.** Штаммы *B. pertussis* должны отвечать требованиям, характерным для гладкой формы (фазы I) бактерий, по морфологическим, культуральным, ферментативным, серологическим свойствам, антигенной структуре (серотипы), гемагглютинирующей, гемолитической, дермонекротической активностям, вирулентности, токсичности и защитной активности.

Новые штаммы, предназначенные для изготовления коклюшной суспензии должны быть изучены по всем вышеуказанным свойствам и аттестованы соответствующими уполномоченными органами.

**Упаковка и маркировка**. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные средства». Наносят дополнительную предупредительную надпись «Стерильно».

**Транспортирование и хранение**. В сухом, защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.