**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Вакцина герпетическая культуральная** **ФС**

**инактивированная**  **Взамен ФС 42-3400-97**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину герпетическую культуральную инактивированную, лиофилизат для приготовления раствора для внутрикожного введения, представляющую собой иммунобиологический лекарственный препарат, содержащий антигены вирусов простого герпеса типа 1 и типа 2 (ВПГ-1; ВПГ-2), полученные путем репродукции вирусов в первично-трипсинизированной клеточной культуре фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) или в культуре перевиваемых клеток почек африканской зеленой мартышки (*VERO B*), инактивированных формалином и лиофилизированных с добавлением сахарозо-желатозной среды в качестве стабилизатора. Вакцина содержит инактиватор формальдегид и антибиотик гентамицина сульфат.

Вакцина предназначена для лечения больных герпетической инфекцией с поражениями кожи и слизистых различной локализации и профилактики рецидивов герпетических инфекций, вызываемых вирусами простого герпеса типа 1 и типа 2.

ПРОИЗВОДСТВО

Технологический процесс производства должен обеспечивать стабильное получение серий вакцины ,соответствующих требованиям по иммуногенности ,безопасности и стабильности.

Производство вакцины герпетической культуральной инактивированной (далее вакцины герпетической) должно осуществляться с соблюдением надлежащих требований к организации производства и контролю качества лекарственных препаратов, гарантирующих качество и безопасность для человека. Производство вакцины герпетической должно быть основано на использовании системы посевного материала (системе посевных серий), регламентирующей получение вакцинного вирусного сбора на определенном пассажном уровне.

Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами.

Куриные эмбрионы, используемые для получения клеточного субстрата для культивирования вирусов - первично-трипсинизированной клеточной культуры ФЭК, должны поступать из птицеводческих хозяйств, благополучных по особо опасным и карантинным заболеваниям животных и птицы, что должно быть подтверждено документально государственной ветеринарной службой.

Состав вакцины**:** одна прививочная доза (0,2 мл) содержит:

* действующие вещества: специфические инактивированные антигены вирусов простого герпеса типа 1 и 2 (ВПГ -1 и ВПГ -2) .
* вспомогательные вещества: сахароза не более 15 мг/доза, желатоза не более 2,0 мг/доза.
* инактиватор: формальдегид не более 40 мкг/доза.
* антибиотик гентамицина сульфат не более 8,0 мкг/доза.

**Производственные штаммы вирусов простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) и типа 2 (ВПГ-2)**

В качестве производственных штаммов для изготовления вакцины герпетической используются штаммы вирусов простого герпеса 2-х антигенных типов ВПГ типа 1 (штамм «УС») и ВПГ типа 2 (штамм «ВН»), культивируемые в первично-трипсинизированной клеточной культуре ФЭК или в культуре перевиваемых клеток *VERO B*.

Штаммы «УС» (ВПГ-1) и «ВН» (ВПГ-2) депонированы в Государственной коллекции вирусов.

Производственные штаммы должны быть зафиксированы на установленном пассажном уровне («главная посевная культура») и храниться в лиофилизированном виде в ампулах при температуре не выше минус 60 о С в соответствии с надлежащими правилами порядка учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов III-IV групп патогенности.

Производственные штаммы должны иметь сертификат качества.. В материалах должны быть представлены сведения по истории выделения штамма, видовой антигенной специфичности, показатели по ведущим биологическим свойствам (культуральные свойства, вирулентность , видоваяспецифичность ),условия хранения.

Требования к производственным штаммам ВПГ-1 и ВПГ-2

При культивировании штаммов ВПГ-1 и ВПГ-2 на производстве от «главной посевной культуры» до производства вакцины должно быть проведено не более 5 пассажей на клеточной культуре ФЭК или 5- пассажей в культуре перевиваемых клеток *VERO В*. В процессе пассирования при изготовлении материала для промежуточных вирусных сборов («главная посевная культура», «рабочая посевная культура») - должен проводиться контроль стерильности, отсутствия посторонних вирусов и микоплазм (для «рабочей посевной культуры») инфекционной активности в используемой на производстве клеточной культуре и видовой антигенной специфичности.

Производственные штаммы ВПГ-1 («УС») и ВПГ-2 («ВН»), используемые в производстве и контроле вакцины должны отвечать следующим требованиям:

* быть стерильными, не содержать посторонних вирусных агентов и микоплазм;
* должны обладать видовой антигенной специфичностью: показатель индекса нейтрализации типоспецифическими сыворотками, содержащими антитела к вирусам простого герпеса типа 1 и типа 2, в реакции нейтрализации в используемых клеточных культурах должен быть не менее 2,5 lg .
* должны обладать инфекционной активностью в используемых клеточных культурах: показатели титров вирусов в клеточных культурах ФЭК (или в перевиваемой культуре МА-104 – почка эмбриона макаки резус) - не менее 5,0 lgТЦД 50/мл для штамма «УС» и не менее 4,0 lg ТЦД 50/мл для штамма «ВН»; показатели титров вирусов в клеточной культуре VERO B – не менее 6,0 lgТЦД 50/ мл для штамма «УС» и не менее 5,0 lg ТЦД 50/мл для штамма «ВН».

Работу с микроорганизмами III группы патогенности (производственные штаммы ВПГ-1 и ВПГ-2) проводят в соответствии с надлежащими правилами по безопасности работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней.Основные этапы производства:

Технология производства вакцины герпетической состоит из двух основных технологических процессов: подготовки и ведения производственных штаммов вирусов простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) и типа 2 (ВПГ-2); подготовки и ведения клеточных культур - субстрата для культивирования вирусов.

Каждый из этих этапов включает ряд технологических стадий и операций.

1. *Подготовка* с*убстрата для культивирования вирусов простого герпеса.*

1.1. Первично-трипсинизированная клеточная культура ФЭК. Для заражения вирусом простого герпеса используют монослойные культуры клеток ФЭК. Перед заражением вирусом получаемые клетки – фибробласты эмбрионов кур должны быть проверены на отсутствие контаминирующих агентов – вирусов, бактерий, грибов.

1.2. Перевиваемая клеточная линия *VERO B*. Клеточная линия *VERO B* должна быть аттестована в качестве субстрата с целью производства иммунобиологических препаратов для профилактики вирусных инфекций. Для заражения вирусом простого герпеса используют монослойные культуры клеток *VERO B.*

2. *Подготовка посевного материала.*

2.1.Вакцинные антигены получают на основе вирусных сборов которые представляют собой вирусы простого герпеса двух антигенных типов ВПГ типа 1 (штамм УС) и ВПГ типа 2 (штамм ВН), репродуцированные в культуре клеток ФЭК или культуре клеток *VERO B.*

2.2.Получение вирусного сбора ВПГ-1 (штамм УС) и ВПГ-2 (штамм ВН). Вирусные сборы каждого штамма готовят раздельно.

3. *Инактивация вируса простого герпеса*

Инактивация вируса простого герпеса в вируссодержащих жидкостях формалином (концентрация формалина в жидком полуфабрикате 1:2000). Проводят контроль инактивированных антигенсодержащих жидкостей на отсутствие неинактивированного вируса, остаточного формальдегида.

4. *Сведение инактивированных вирусных сборов*

Сведение инактивированных вирусных сборов ВПГ-1 (штамма УС) и ВПГ-2 (штамма ВН) и добавление к смеси антигенсодержащих жидкостей стабилизирующего наполнителя для лиофильного высушивания (сахарозы и желатозы в концентрации, указанной нормативной документации). Приготовление полуфабриката вакцины.

5. Готовый полуфабрикат разливают в первичную упаковку (ампулы) и лиофилизируют при соответствующих условиях .Первичную упаковку (ампулы)герметизируют в атмосфере очищенного воздуха и проверяют на герметичность и потерю в массе при высушивании в соответствии с ОФС « Иммунологические лекарственные препараты».

воздуха.

6. Маркировка. Упаковка.

7. Контроль качества готовой серии вакцины.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Аморфная масса, от светло-желтого до розового цвета. Гигроскопична. Испытание проводят визуально.

Восстановленный препарат - опалесцирующая жидкость розового, розового с желтым оттенком или желтовато-красного (красного) цвета. Испытание проводят визуально.

**Подлинность.** Вакцина должна вызывать образование вируснейтрализующих антител к вирусам простого герпеса типа 1 и типа 2 при иммунизации белых крыс. Определение проводят биологическим методом, изложенным в разделе «Специфическая активность»

**Время восстановления препарата.** Не более 2 мин. Определение проводят визуально.

**Механические включения.** Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят визуально по ОФС «Видимые механические включения в парентеральных лекарственных формах и глазных лекарственных формах».

**рН восстановленного препарата**. От 6,8 до 7,8. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 2,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

**Стерильность.** Должна быть стерильной. Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Присутствие микоплазм.** Не должна содержать микоплазм. Определение проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 25 ЕЭ/мл. Определение проводят методом гель-тромб тест в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Формальдегид.** Не более 200 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

**Аномальная токсичность**. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза: морским свинкам – 1 доза вакцины подкожно, белым мышам по 1 дозе вакцины внутрибрюшинно.

**Герметизация.** Ампулы (флаконы) с препаратом должны быть герметичны. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

**Бычий сывороточный альбумин (БСА)**. Не более 0,5 мкг/мл. Определение проводят методом ракетного иммуноэлектрофореза в соответствии с ОФС «Определение бычьего сывороточного альбумина в иммунобиологических лекарственных препаратах методом ракетного иммуноэлектрофореза» или методом ИФА, указанным в нормативной документации.

**Содержание гентамицина сульфата.** Не более 40 мкг/мл. Определение проводят методом диффузии в агар в соответствии с ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».

**Остаточная ДНК культуры клеток *Vero* *B*.** Не более 100 пкг/мл. Определение проводят методом полимеразной цепной реакции в соответствии с ОФС «Полимеразная цепная реакция» или по методике, указанной в нормативной документации.

**Специфическая безопасность.** Не должна содержать живых неинактивированных вирусов простого герпеса типа 1 и типа 2. Определение проводят биологическим методом: путем проведения 2 –х пассажей при внутримозговом введении непородным белым мышам 8-10 г возрастной категории 12-14 дней без различия пола.

Десяти белым мышам вводят при внутримозговом введении по 0,03 мл вакцины герпетической (содержимое трех ампул растворяют в воде для инъекций добавляя по 0,3 мл в каждую ампулу; после растворения содержимое ампул объединяют). Десяти контрольным мышам вводят при внутримозговом введении по 0,03 мл среды 199 или среда Игла (при субстрате культивирования VERO B). Наблюдение за животными проводят ежедневно в течение 7 сут.

Второй пассаж – пять опытных и пять контрольных мышей забивают и 10% суспензию ткани мозга на среде 199 или среде Игла вводят при внутримозговом введении по 0,03 мл 10 мышам опытной группы. Контрольной группе вводят при внутримозговом введении по 0,03 мл среды 199 или среды Игла (при субстрате культивирования VERO B). Наблюдение за животными проводят ежедневно в течение двух недель.

Не должно наблюдаться заболевания и гибели мышей в опыте и контроле при первом пассаже в течение 7 суток, и втором пассаже в течение 14 суток.

**Специфическая активность (иммуногенность).** Должна быть специфически активной. Определение проводят биологическим методом в реакции нейтрализации (РН) на клеточных культурах по выявлению вируснейтрализующие активности сывороток крови иммунизированных крыс. В реакции нейтрализации используются клеточные культуры: - первично-трипсинизированной ФЭК; перевиваемых – почка эмбриона макаки резус (М А-104), полученной из Российской коллекции клеточных культур позвоночных, или на культуре клеток *Vero B*. В качестве тест-штаммов для контроля используют те же производственные штаммы ВПГ-1 и ВПГ-2. Индексы нейтрализации сывороток крыс, иммунизированных вакциной, должны быть не менее 2,0 lg со штаммом «УС» ВПГ-1 и не менее 1,5 lg со штаммом «ВН» ВПГ-2.

Постановка реакции нейтрализации включает несколько этапов:

Получение иммунной сыворотки крыс.

1.Трех самцов белых крыс массой 100-120 г иммунизируют трехкратно (внутрибрюшинно, подкожно, внутрибрюшинно) по 1,0 мл вакцины с интервалами между инъекциями – 3 сут (содержимое 1 ампулы или флакона с вакциной)растворяют в 0,3 мл воды для инъекций, затем содержимое пяти ампул (флаконов) объединяют). Группу из трех не иммунизированных животных, аналогичной массой используют в качестве контрольной. Через 10 сут после последней иммунизации опытных животных и контрольной группы обескровливают. Сыворотки, полученных от 3 иммунизированных крыс объединяют, прогревают при температуре (56±1) 0С в течение 30 мин. Одновременно получают сыворотки от контрольной группы крыс и так же объединяют и прогревают. Сыворотки используют для реакции нейтрализации в соответствующих клеточных культурах.

2. Подготовка клеточных культур для реакции нейтрализации.

3. Приготовление вируссодержащих смесей: вируса и сыворотки крови иммунизированных крыс; вируса и сыворотки крови неиммунизированных крыс (контрольной).

4. Инкубация смесей при температуре 37 0С в течение 1,5 ч

5. Внесение вируссодержащих смесей в монослойные культуры клеток, ФЭК, М А-104 или *Vero B*.

6. Просмотр клеточных культур под микроскопом для выявления цитопатического действия вируса (ЦПД). Учет результатов с использованием 4-х крестной шкалы оценки ЦПД (на 5-7 сут):

++++ - ЦПД наблюдается на всей поверхности монослоя клеток;

+++ - ЦПД на 75 % монослоя клеток;

++ - ЦПД на 25 % монослоя;

+ - ЦПД наблюдается на отдельных участках монослоя клеток.

Титр вируса подсчитывают по методу Рида и Менча и выражают в lg ТЦД50. Индекс нейтрализации определяют как разность логарифмов титров вируса в присутствии контрольной и иммунной сывороток крыс.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Дополнительно на вторичной (потребительской) указывают предупредительные надписи: «Хранить в недоступном для детей месте», «Стерильно», «Препарат содержит антибиотик гентамицина сульфат и инактиватор формальдегид».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».