**Антиген вируса гриппа ФС**

 **типа В аллантоисный,**

**субстанция Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на антиген вируса гриппа типа В аллантоисный, субстанцию, которая представляет собой поверхностные гликопротеины (гемагглютинин и нейраминидазу), выделенные из очищенных вирионов вируса гриппа типа В, полученные из вируссодержащей аллантоисной жидкости куриных эмбрионов и разведенные в фосфатном буферном растворе.

1 мл субстанции содержит: гемагглютинин вируса гриппа типа В не менее 94 мкг, нейраминидаза вируса гриппа типа В – должна присутствовать ферментативная активность нейраминидазы и консервант.

Субстанция антигена вируса гриппа типа В аллантоисный используется для производства гриппозных вакцин.

ПРОИЗВОДСТВО

В основе производства антиген вируса гриппа типа В аллантоисного заложено выделение из очищенных вирионов вируса гриппа типа В, полученных из вируссодержащей аллантоисной жидкости куриных эмбрионов с целью получения поверхностных антигенов - гликопротеинов (гемагглютинин и нейраминидазу). Все этапы производственного процесса получения субстанции антиген вируса гриппа типа В аллантоисного должны быть валидированы.

Куриные эмбрионы получают только от здоровой птицы из птицехозяйств, благополучных по инфекционной заболеваемости кур. Качество поставляемых эмбрио

Штамм вируса гриппа, используемый в производстве субстанции, ежегодно рекомендуется ВОЗ и комиссией по гриппозным вакцинам и диагностическим штаммам Минздрава России. При работе с производственным штаммом необходимо руководствоваться требованиями санитарных правил по безопасности работы с микроорганизмами III и IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней, действующих на территории РФ и рекомендациями ВОЗ.

Основными этапами производственного процесса получения субстанции антигена вируса гриппа типа В аллантоисного являются:

*Получение и контроль главного посевного материала (ГПМ)*

- получение эпидемиологически актуальных штаммов вирусов гриппа

- получение и входной контроль куриных эмбрионов (КЭ)

- получение и контроль вируссодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ)

*Получение и контроль рабочего посевного материала (РПМ)*

- пассирование и контроль РПМ

- приготовление и контроль посевного материала ГПМ и РПМ

*Получение и контроль ВАЖ*

- заражение, инкубация КЭ

- контроль качества ВАЖ

*Получение и контроль элюата вируса гриппа*

- получение и контроль взвеси формалинизированных куриных эритроцитов (ФКЭ)

- сорбция и контроль сорбции вируса гриппа на ФКЭ

- декантация и промывание осадка ФКЭ с сорбированным вирусом гриппа

- элюция и контроль элюата вируса гриппа

*Получение концентрированного очищенного вируса гриппа*

*Получение разведенной взвеси инактивированного вируса гриппа*

- инактивация разведенной взвеси вируса гриппа ультрафиолетовым облучением

*Получение и контроль антигена вируса гриппа типа В аллантоисного*

- контроль антигена вируса гриппа типа В аллантоисного до стерилизующей фильтрации

- стерилизующая фильтрация и асептический розлив антигена вируса гриппа типа В аллантоисного.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная или слегка желтоватого цвета слабо опалесцирующая жидкость. Определение проводят визуально.

Подлинность. Испытания проводят по определению специфичности гемагглютинина и нейраминидазной активности.

Специфичность гемагглютинина. Антиген гемагглютинина должен нейтрализоваться гомологичной сывороткой. Титр с гетерологичной сывороткой должен быть ниже ее собственного титра не менее чем в 4 раза.

Определение проводят в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с «Сывороткой диагностической гриппозной сухой для РТГА» или с сыворотками ВОЗ.

Методика определения включает три этапа: I этап - определение гемагглютинирующего титра антигена в реакции гемагглютинации (РГА), II этап - приготовление рабочей дозы антигена и постановку РТГА и III этап - учет результатов.

 *I этап. Определение гемагглютинирующего титра антигена в реакции гемахтлютинации (РГА).*

В лунках горизонтального ряда агглютинационного планшета готовят двукратные разведения антигена (субстанции) в объеме 0,5 мл, начиная с 1:10 до 1:1280. В первую лунку горизонтального ряда агглютинационного планшета вносят 900 мкл фосфатно-буферного раствора (ФБР) рН 7,2, а в последующие лунки ряда - по 500 мкл ФБР, затем добавляют 100 мкл антигена и тщательно перемешивают. Из первой лунки отбирают 500 мкл полученной смеси и переносят во вторую лунку, ее содержимое тщательно перемешивают и 500 мкл полученной смеси переносят в третью лунку и далее процедуру повторяют до получения конечного разведения, из которого отобранные 500 мкл переносят в пустую лунку ряда. Затем в каждую лунку добавляют по 500 мкл 1 % суспензии куриных эритроцитов. Одну лунку используют для контроля на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов (к 500 мкл ФБР добавляют 500 мкл 1 % суспензии куриных эритроцитов). Содержимое лунок перемешивают встряхиванием и оставляют при температуре (15-25) °С в течение 40-45 мин до оседания эритроцитов в контроле. Реакцию оценивают по четырехкрестовой системе (см. Примечание). За титр антигена или одну агглютинирующую единицу (1 АЕ) принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов на 3 (+++) или 4 (-Н-Н-) креста. В контрольной лунке при отсутствии спонтанной агглютинации на дне выпадает гомогенный с ровными краями осадок эритроцитов (отрицательная реакция).

*II этап. Приготовление рабочей дозы антигена*

В РТГА рабочей дозой антигена является то разведение антигена, в 0,2 мл которого содержится 4 АЕ. Для ее вычисления следует установленную величину титра антигена разделить на 8. Полученная от деления цифра указывает, во сколько раз нужно развести антиген, чтобы в 0,2 мл его содержалось 4 АЕ (рабочая доза). Для проверки точности приготовленной рабочей дозы антигена в пять лунок горизонтального ряда агглютинационного планшета, начиная со второй, вносят по 0,2 мл ФБР. В первую и вторую лунки ряда добавляют по 0,2 мл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания переносят с помощью автоматической микропипетки 0,2 мл смеси из второй лунки в 3-ю, из 3-й в 4-ю, из 4-й в 5-ю, из 5-й лунки 0,2 мл удаляют. Затем в каждую лунку добавляют по 0,2 мл ФБР и 0,4 мл 1 %суспензии куриных эритроцитов. В 6-ой лунке ставят контроль на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. Для этого в 6-ю лунку вносят 0,4 мл ФБР и добавляют 0,4 мл 1 % суспензии куринных эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре 15-25 °С на 40-45 мин (до оседания эритроцитов в контроле). При правильном выборе рабочей дозы полная агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в первых трех лунках ряда. В 4-й и 5-й лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного выше разведение антигена должно быть изменено путем добавления соответствующего количества антигена или ФБР. При этом необходимо повторно проверить правильность приготовления рабочей дозы.

*Постановка РТГА*

В лунках агглютинационного планшета готовят двукратные разведения сывороток (гомологичной и гетерологичных) в ФБР, начиная с 1:10 до 1:640 или до разведения, указанного в паспорте на сыворотку, в объеме 0,2 мл. Ккаждому разведению сыворотки добавляют по 0,2 мл рабочей дозы (4 АЕ) антигена. Смесь встряхивают, оставляют при температуре от 15 до 25 °С на 30 мин. В каждую лунку добавляют по 0,4 мл 1 %суспензии куриных эритроцитов. Смесь встряхивают, оставляют при той же температуре в течение 40-45 мин (до оседания эритроцитов в контроле), после чего производят учет результатов реакции.

*III этап. Учет результатов РТГА*

При наличии специфических антител в сыворотке наступает задержка агглютинации эритроцитов. Задержка гемагглютинации указывает на соответствие типа антигена и взятой сыворотки; отсутствие задержки гемагглютинации свидетельствует о несоответствии типа сыворотки. Субстанция считается подлинной, если она реагирует в РТГА с гомологичной сывороткой и не реагирует в РТГА с гетерологичной сывороткой.

Проведение РТГА возможно как макрометодом (см. выше) так и микрометодом. Принцип микрометода, его учет и ингредиенты те же, что и для проведения РТГА макрометодом. Для микрометода применяют уменьшенные концентрации и объемы ингредиентов: 0,5 %суспензию эритроцитов, рабочую дозу антигена равной 8 ГАЕ (путем деления на 16 при вычислении рабочей дозы), в лунки микропанели с «U»-образным дном вносят реагенты по 0,05 мл (50 мкл) для РГА и по 0,025 мл (25 мкл) для РТГА.

Примечания

 Четырехкрестовая система учета реакции гемагглютинации (РГА):

- Н-Н- полная гемагтлютинация эритроцитов в виде однородной пленки на стенках и дне лунки.

+-Н- частичная гемагтлютинация с видимыми признаками сползания эритроцитов по стенкам лунки и незначительным осадком на дне.

++ частичная гемагтлютинация в виде неоднородной пленки на стенках лунки, сочетающейся с оседанием эритроцитов на дне лунки в виде компактного осадка.

+ незначительная гемагглютинация в сочетании с оседанием эритроцитов в виде компактного осадка на дне лунки.

0 - отсутствие агглютинации эритроцитов, компактный осадок на дне лунки.

Приготовление суспензии куриных эритроцитов. Берут кровь из подкрыльцевой вены петуха. 10 мл крови доводят 5 % раствором натрия цитрата до 20 мл, перемешивают 1-2 мин и центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок эритроцитов доводят ФБР (рН 7,2) до объема 5 мл и повторно центрифугируют при тех же условиях. Процедуру отмывания эритроцитов повторяют еще 2 раза. Суспензию хранят не более 8 сут при температуре (2-8) °С.

 Приготовление 1 % суспензии куриных эритроцитов для макрометода. 1 мл осадка куриных эритроцитов доводят ФБР (рН 7,2) до 100 мл. Суспензию хранят не более 3 сут при температуре (2-8) °С.

 Приготовление 0.5 %суспензии куриных эритронитов для микрометода. 0,5 мл осадка куриных эритроцитов доводят ФБР (рН 7,2) до 100 мл. Срок хранения суспензии не более 3 сут при температуре (2-8) °С.

Приготовление фосфатного буферного раствора (ФБР) рН 7,2. В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл вносят 500-600 мл воды и последовательно растворяют 9 г натрия хлорида, 1,5 г натрия гидрофосфата, 012-0,14 г калия дигидрофосфата, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки. Раствор хранят в течение 1 мес при температуре (2-8) °С.

Специфичность нейраминидазы. Ферментативная активность нейраминидазы должна ингибироваться гомологичной сывороткой к нейраминидазе и не ингибироваться или слабо ингибироваться гетерологичными сыворотками.

Контроль проводят на первых трех сериях субстанции, приготовленных с использованием нового штамма. Допускается проведение контроля на цельном (нерасщепленном) вирусе, который берется для исследования при концентрации общего белка 500 мкг/мл.

Определение проводят в реакции ингибирования нейраминидазной активности (РИНА) с гомологичной и гетерологичными сыворотками ВОЗ. Процедура включает 3 этапа: I – этап. Определение наличия ферментативной активности нейраминидазы. Определение рабочего разведения антигена; II этап - определение ингибирования нейрамидазной активности сыворотками (гомологичной и гетерологичными); III – этап. Вычисление титра в РИНА с гомологичной и гетерологичными сыворотками.

Первый этап. Определение наличия нейраминидазной активности

Метод определения наличия нейраминидазной активности основан на: выделении свободной N-ацетилнейраминовой кислоты из фетуинового субстрата под действием нейраминидазы вируса; превращении N-ацетилнейраминовой кислоты в бета-формилпировиноградную кислоту в результате окисления; остановке ферментативной реакции при добавлениинатрия метаарсенита; образовании розового хромофора под действием тиобарбитуровой кислоты, экстракции хромофора органическим растворителем для проведения спектрофотометрического анализа. Розовое окрашивание указывает на присутствие активности нейраминидазы в исследуемом антигене. При ингибировании нейраминидазной активности гомологичной антисывороткой (например, исследуемого N1 с гомологичной сывороткой анти N1отсутствует окраска или наблюдается слабо розовое окрашивание. Отсутствие или значимое уменьшение цветности в пробах с гомологичной сывороткой, в отличие от гетерологичных или нормальной, указывает, что нейраминидазная активность была ингибирована, на основании чего и проводится идентификация подлинности нейраминидазы.

В первые лунки горизонтального ряда агглютинационного планшета с помощью автоматической микропипетки со сменой наконечников после каждого отбора образца вносят по 200 мкл исследуемого образца (разведение 10°). Из первой лунки переносят 100 мкл исследуемого образца во вторую, добавляют 216 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида (разведение 10-0,5) и тщательно перемешивают пипетированием. По 100 мкл из 2-ой лунки переносят в 3-ю и добавляют 216 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают. Процедуру повторяют, получая ряд разведений (10-1, 10-1,5, 10-2, 10-2,5, 10-3).

25 мкл каждого разведения (10°,10-0,5,10-1,10-1,5,10-2,10-2,5,10-3)автоматической микропипеткой переносят в стеклянные круглодонные пробирки с завинчивающимися крышками, добавляют по 25 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, 50 мкл раствора фетуина и тщательно перемешивают. Параллельно готовят «отрицательный фетуин-контроль», для этого, в отдельной пробирке к 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида добавляют 50 мкл раствора фетуина. Пробирки закрывают завинчивающими крышками и инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 18 ч. По окончании инкубации пробирки охлаждают в течение 3-7 мин при комнатной температуре и добавляют по 50 мкл раствора натрия метапериодата в каждую пробирку. Тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на (20±2) мин. По истечении времени для остановки реакции в каждую пробирку добавляют 0,5 мл раствора натрия метаарсенита. Может появляться коричневая окраска, как результат высвобождения паров йода. Затем пробирки интенсивно встряхивают до исчезновения окраски, допускается появление беловатого оттенка. В каждую пробирку добавляют по 1,25 мл раствора тиобарбитуровой кислоты, закрывают завинчивающимися крышками, перемешивают, устанавливают в штатив и помещают в кипящую водяную баню на 15 мин. Появляющееся в процессе инкубирования розовое окрашивание содержимого пробирки свидетельствует о наличии нейраминидазной активности. В пробирке с «отрицательным фетуин-контролем» окрашивание отсутствует. По окончании инкубации все пробирки охлаждают под проточной водопроводной водой. После охлаждения в пробирки добавляют по 2 мл Варенофф реактива, закрывают завинчивающимися крышками, тщательно перемешивают и выдерживают 20-30 мин до появления прозрачной верхней фазы. При наличии мутности в верхней бутаноловой фазе проводят центрифугирование в течение 5 мин при 13000 об/мин. Из каждой пробирки верхнюю (бутаноловую) фазу переносят в лунки плоскодонного микропланшета в объеме, обеспечивающем толщину оптического пути 0,5 см. Измеряют оптическую плотность (ОП) при длине волны 540 нм против «отрицательного фетуин-контроля». Полученные в микропланшете результаты (ОП) умножают на 2, соответствующие 1 см оптического пути.

Объем внесения (V) в мл в лунку микропланшета вычисляют по формуле определения объема цилиндра:

*V= S ˑ h,*

где

S - площадь цилиндра в см2;

h - длина оптического пути (0,5 см).

Примечание

Площадь цилиндра (S) в см2 вычисляется путем умножения π на r2 (квадрат радиуса основания лунки микропланшета).

С помощью программного обеспечения строят калибровочный график зависимости оптической плотности ОП540 (1см) от log разведения исследуемой пробы (0 неразведенная; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3) и вычисляют необходимое разведение, которое дает оптическую плотность ОП540 в пределах от 0,45-0,85.

Например, при получении разведения, соответствующего 1, возводят 10 в степень 1, получают необходимое разведение для исследуемой пробы 1:10. Наличие ОП540 (1 см) = 0,45 в одном из разведений исследуемой пробы указывает на присутствие нейраминидазы. В случае, если ОП540 (1 см) во всех разведениях исследуемой пробы окажется более 0,85, определение повторяют с более высоким рядомразведений (10-3,5, 10-4,10-4,5,10-5, 10-5,5,10-6, 10-6,5).

В случае**,** если ОП540 (1см) во всех разведениях исследуемой пробы окажется менее 0,45, определение рабочего разведения проводят на цельном вирусе.

*II этап - определение ингибирования нейрамидазной активности сыворотками (гомологичной и гетерологичными)*

Готовят ряд (не менее 8) последовательных разведений сывороток (гомологичной, гетерологичной и контрольной (нейтральной)) с шагом 10-0,5. В качестве контрольной сыворотки используется сыворотка крови плода коровы жидкая, которую перед анализом разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:2. В первые лунки горизонтального ряда агглютинационного планшета с помощью автоматической микропипетки со сменой наконечников вносят по 200 мкл каждого разведения сыворотки. Из первых лунок переносят 100 мкл сывороток во вторые, добавляют по 216 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивают. По 100 мкл из вторых лунок переносят в третьи и добавляют по 216 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида и т.д. Получают ряд разведений: 10°,10-0,5,10-1,10-1,5,10-2,10-2,5,10-3. В пробирки стеклянные круглодонные с завинчивающимися крышками переносят по 25 мкл каждого разведения сывороток 10°,10-0,5,10-1,10-1,5,10-2,10-2,5,10-3,10-3,5, добавляют по 25 мкл рабочего разведения из только что вскрытой первичной упаковки исследуемого антигена (нейраминидазы), перемешивают и инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 1 ч. Параллельно готовят «отрицательный фетуин-контроль», для этого в отдельную пробирку вносят 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида раствора и «положительный антиген-контроль». Далее к 25 мкл рабочего разведения исследуемого антигена добавляют 25 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида перемешивают и инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 1 ч. После инкубирования во все пробирки, включая и контрольные, вносят по 50 мкл раствора фетуина.

Далее проводят определение остаточной нейраминидазной активности и учет результатов, как описано выше (Определение нейраминидазной активности)

При проведений реакции должно наблюдаться розовое окрашивание содержимого пробирок, включая пробирку с «положительным антиген-контролем» и пробирки с контрольной (нейтральной) сывороткой. Ослабление окрашивания с гомологичной сывороткой по сравнению с «положительным антиген-контролем» свидетельствует об ингибировании нейраминидазной активности. В пробирке с «отрицательным фетуин-контролем» окрашивание должно отсутствовать.

*Третий этап. Учет результатов ингибирования нейраминидазной активности, вычисление титра в РИНА гомологичной и гетерологичных сывороток*.

Активность нейраминидазы A(NA) в процентах каждого разведения гомологичной или гетерологичной сыворотки вычисляют по формуле:

*A(NA)=OD1540/OD2540 ×100,*

где:

OD1540 - оптическая плотность, соответствующая активности антигена

нейраминидазы при добавлении гомологичной или гетерологичной сыворотки;

OD2540 - оптическая плотность, соответствующая активности антигена нейраминидазы при добавлении контрольной сыворотки;

100 - пересчет в проценты.

С помощью компьютерной программы строят калибровочный график зависимости A(NA) в процентах от log10  разведения гомологичной или гетерологичной сыворотки: 0 (неразведенная); 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5. По графику в линейной области находят значение log10 разведения гомологичной сыворотки, соответствующее ингибированию 50 % активности нейраминидазы для гомологичной и гетерологичных сывороток и вычисляют разведение, как описано выше. На графике для гомологичной сыворотки должна наблюдаться зависимость увеличения активности нейраминидазы при увеличении разведения сыворотки.

Например, при получении для гомологичной сыворотки log,10 разведения 1,5, соответствующего 50 %активности нейраминидазы, рассчитывают титр в РИНА 101,5 ≈ 32. Рассчитывают фактор пересчета к 1 мл сыворотки и определяют титр с учетом фактора пересчета (например, для 25 мкл сыворотки фактор пересчета будет 1000:25=40; следовательно, если для 25 мкл сыворотки титр в РИНА равен 32, то для 1 мл получают титр равный 32ˑ40=1280).

При получении для гетерологичной сыворотки Iog10 разведения 0 или менее, соответствующего 50 % активности нейраминидазы, считают титр в РИНА 10 = 1 или менее, при пересчете на 1 мл получают титр равный 40 или менее.

С помощью компьютерной программы строят калибровочный график зависимости A(NA) в процентах от log10  разведения гомологичной или гетерологичной сыворотки: 0 (неразведенная); 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5. По графику в линейной области находят значение log10 разведения гомологичной сыворотки, соответствующее ингибированию 50 % активности нейраминидазы для гомологичной и гетерологичных сывороток и вычисляют разведение, как описано выше. На графике для гомологичной сыворотки должна наблюдаться зависимость увеличения активности нейраминидазы при увеличении разведения сыворотки.

Например, при получении для гомологичной сыворотки log,10 разведения 1,5, соответствующего 50 %активности нейраминидазы, рассчитывают титр в РИНА 101,5 ≈ 32. Рассчитывают фактор пересчета к 1 мл сыворотки и определяют титр с учетом фактора пересчета (например, для 25 мкл сыворотки фактор пересчета будет 1000:25=40; следовательно, если для 25 мкл сыворотки титр в РИНА равен 32, то для 1 мл получают титр равный 32ˑ40=1280).

При получении для гетерологичной сыворотки Iog10 разведения 0 или менее, соответствующего 50 % активности нейраминидазы, считают титр в РИНА 10 = 1 или менее, при пересчете на 1 мл получают титр равный 40 или менее.

Активность нейраминидазы более 50 %во всех исследуемых разведениях с гетерологичной сывороткой свидетельствует об отсутствии ингибирования сывороткой. В этом случае график зависимости A(NA) от log10  разведения гомологичной или гетерологичной сыворотки не строят и за титр в РИНА принимают титр менее 40 (для 1 мл с учетом фактора пересчета).

Некоторые гетерологичные сыворотки имеют перекреструю реактивность с нейраминидазой исследуемого подтипа, в этом случае разведения сывороток можно увеличить для достижения приемлемых результатов.

Примечания

Приготовление фосфатного буферного раст­вора ФБР 5.9.

Раствор А: 31,2 г натрия дигидрофосфата дигидрата растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 500 мл, доводят объем водой до метки и перемешивают.

Раствор В: 35,6 г натрия гидрофосфата дигидрата растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 500 мл, доводят объем водой до метки и перемешивают.

Смешивании 81 мл раствора А с 19 мл раствора В, добавляют 0,088 г кальция хлорид дигидрата, перемешивают, дают отстояться в течение 1ч, далее е фильтруют через мембрану с размером пор 0,45 мкм. Срок хранения раствора 14 сут при температуре от 2 до 8 °С.

Раствор фетуина. 0,24 г фетуина растворяют в 10 мл ФБР (pH 5,9), добавляют 5 мл воды и перемешивают. Далее разливают по 2 мл и хранят в течение 12 мес при температуре минус 20 °С.

Раствор натрия метапетодата. 4,28 г натрия мета-периодата растворяют в 38 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании. Далее раствор охлаждают при комнатной температуре и добавляют 62 мл 85 % раствора ортофосфорной кислоты. Раствор хорошо перемешивают и хранят в темной бутылке с притертой стеклянной пробкой при комнатной температуре в течение 6 мес.

 Раствор натрия метаарсенита.10 г натрия метаарсенита, 7,1 г натрия сульфата растворяют при нагревании в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем водой до метки и перемешивают. Охлаждают при комнатной температуре, добавляют 0.3 мл серной кислоты концентрированной и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

 Раствор тиобарбитуровой кислоты. 35 г натрия сульфата, 3,0 г 2-тиобарбитуровой кислоты растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 500 мл в кипящей водяной бане и доводят объем раствора до метки, охлаждают и перемешивают. Раствор хранят при комнатной темпера­туре в течение 10 сут.

 Варенофф реактив. К 500 мл 1-бутанола добавляют 25 мл хлористоводородной кислоты концентрированной. Раствор тщательно перемешивают и хранят в посуде темного стекла при комнатной температуре в течение 6 мес.

**Чистота поверхностных антигенов**. На электрофореграммах исходного и исследуемого образца должны быть обнаружены антигены гемагглютинина и нейраминидазы. Определение проводят методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле» и руководством по эксплуатации оборудования.

Образец субстанции антигена вируса гриппа должен исследоваться совместно с образцом концентрированного очищенного вируса гриппа соответствующего типа и штамма (исходный образец).

Идентификацию компонентов, присутствующих в исходном и исследуемом образцах, производят по молекулярной массе.

Примечания

Подготовка исследуемого образца антигена. Исследуемый образец антигена концентрируют до содержания белка 1 мг/мл ацетоном. К 20 мкг белка добавляют 5-кратный объем охлажденного до температуры минус 16-20 ºС ацетона и выдерживают при той же температуре в течение 12 ч. По истечении указанного времени образцы антигена центрифугируют в течение 5 мин при 1300 об/мин, удаляют надосадочную жидкость, осадок высушивают при комнатной температуре в течение 1 ч, далее добавляют по 20 мкл воды и загрузочного буферного раствора и перемешивают.

Подготовка исходного образца. Исходный образец вируса разводят водой до содержания белка 1 мг/мл и смешивают с загрузочным буферным раствором в равном объеме 1:1.

Приготовление загрузочного буферного раствора. В мерную колбу, вместимостью 50 мл вносят 35 мл воды очищенной, добавляют 2,5 мл 1,25 М трис-HCL буферного раствора (рН 6,8), затем последовательно вносят 1 г натрия додецилсульфата, 5 г бромфенолового синего и перемешивают до полного растворения содержимого колбы. Объем раствора доводят до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 мес или в замороженном состоянии при температуре минус 20 ºС в аликвотах от 1 до 5 мл в течение 4-6 мес.

Подготовленные для анализа исследуемый и исходные образцы, прогревают в термостате при температуре 95 ºС в течение 5 мин.

Электрофореграмма исходного образца должна содержать тетрамеры NA (с молекулярной массой более 250 кДа), мономеры гемагглютинина (с молекулярной массой 65-90 кДа), его димеры и тримеры (с молекулярной массой 130-250 кДа), NP-белок (с молекулярной массой 40-65 кДа), М-белок (с молекулярной массой 10-35 кДа).

В исследуемом образце в основном должны присутствовать мономеры гемагглютинина (с молекулярной массой 65-90 кДа), его димеры и тримеры (с молекулярной массой 130- 250 кДа), а также тетрамеры NA (с молекулярной массой более 250 кДа).

Прозрачность. Не должна превышать эталон сравнения II. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности». Перед определением субстанцию разводят водой до концентрации гемагглютинина - 1,5 мкг/мл.

Цветность. Должна быть бесцветной или окраска не должна быть

интенсивнее эталона Y6. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей». Перед определением субстанцию разводят водой до концентрации гемагглютинина - 1,5 мкг/мл.

pH, От 7,0 до 7,6. Определение проводят потенциометрическим методов в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. Не более 240 мкг на 100 мкг гемагглютинина. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологических лекарственных препаратах». В качестве раствора сравнения используют раствор тиомерсала с концентрацией 85 мкг/мл.

Примечания

Приготовление испытуемого образца. Перед проведением испытаний образец субстанции разводят в фосфатно - буферном растворе (рН 7,2) до концентрации гемагглютинина - 100 мкг/мл.

Приготовление раствора тиомерсала 85 мкг/мл. Взвешивают 0,8500 г (точная навеска) тиомерсала, растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Отбирают 1 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой при температуре 4 – 8 °С в течение 6 мес.

Приготовление фосфатного буферного раствора pH 7.2. В мерной колбе вместимостью 1000 мл помещают 500-600 мл воды и последовательно вносят 9 г натрия хлорида, 1,5 г натрия гидрофосфата, 0,12-0,14 г калия дигидро фосфата, добавляют 10 мл раствора тиомерсала (85 мкг/мл), доводят объем водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре (2-8) °С в течение 6 мес.

Стерильность. Должна быть стерильной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева с использованием тиогликолевой среды (при условии предварительного определения ее ростовых и нейтрализующих свойств) для выявления аэробных и анаэробных бактерий и грибов.

**Бактериальные эндотоксины**. Предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 200 БЭ на 100 мкг гемагглютинина. Перед проведением контроля субстанцию разводят водой до концентрации гемагглютинина - 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Аномальная токсичность**. Должна быть нетоксичной. Перед определением субстанцию разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации гемагглютинина - 1,5 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность» при внутрибрюшинном введении по 0,5 мл белым мышам массой тела 10-12 г и/или при подкожном введении по 0,5 мл морским свинкам массой 250-350 г.

**Специфическая безопасность.** Не должна содержать живого вируса гриппа. Определение проводят путем заражения 10 куриных эмбрионов (10-12- дневных) введением в аллантоисную полость 0,2 мл субстанции. Через 72 ч инкубации эмбрионов в термальной камере при температуре 30-35 °С (не менее 7 из 10 куриных эмбрионов должны остаться живыми) собирают аллантоисную жидкость (0,5 мл от каждого эмбриона) и проверяют на наличие гемагглютининов с 1 % суспензией куриных эритроцитов (приготовление 1 % суспензии куриных эритроцитов см. в Примечании раздела «Подлинность»). Аллантоисную жидкость объединяют и 0,2 мл неразведенной смеси заражают10 эмбрионов. Эмбрионы инкубируют при тех же условиях, после чего определяют наличие гемагглютининов в аллантоисной жидкости после второго пассажа.

Проведение анализа (реакция гемагглютинации)

В лунки агглютинационного планшета вносят аллантоисную жидкость от каждого эмбриона в объеме 500 мкл, затем в эти же лунки добавляют по 500 мкл 1 % суспензии куриных эритроцитов. Одну лунку используют дляконтроля на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов (к 500 мкл ФБР добавляют 500 мкл 1 % суспензии куриных эритроцитов). Содержимое лунок перемешивают встряхиванием и оставляют при температуре (20±5) °С в течение 40-45 мин до оседания эритроцитов в контроле. Реакцию оценивают по четырехкрестовой системе (см. Примечание раздела «Подлинность»).

Учет результатов

Результаты реакции после второго пассажа должны быть отрицательными - «0» (компактный осадок эритроцитов в виде «пуговки» в центре дна лунки). Если гемагглютинины обнаружены хотя бы в одной из аллантоисной жидкости, то контроль специфической безопасности субстанции повторяют **с** использованием 20 куриных эмбрионов.

**Специфическая активность**. Должна содержать гемагглютинин вируса гриппа типа В не менее 94 мкг/мл. Определение проводят в реакции одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД) согласно одному из двух вариантов.

*Вариант I.* В застывшей агарозе пробойником из нержавеющей стали с внешним диаметром 3 мм делают 6 рядов лунок (по 4 лунки в каждом) на рас­стоянии не менее 1,5 см от края пластины. Расстояние между лунками должно быть не менее 1 см. Агарозу из лунок удаляют. Определение проводят на двух пластинах. На каждой пластине исследуют стандартный образец гемагглютинина (ГА) и две серии субстанции, отводя под каждый образец по два ряда лунок. На второй пластине проверяют те же образцы, но расположение субстанции и стандартно­го образца произвольно меняют. Важно, чтобы субстанция и стандартный образец содержали близкие количества ГА, так чтобы размеры зон преципитации могли быть сравнимы, Если субстанция, согласно паспортным данным, содержит меньше ГА, чем стандартный образец, необходимо провести предварительное разведение стандартного образца, и, наоборот: в случае если стандартный образец менее активен, чем субстанция, то разводят субстанцию. В инструкции по примене­нию стандартного образца указаны рекомендуемые разведения стандартного образца и антисыворотки. Разведения производят раствором ФБР 7,2.

Готовят смесь 10 % раствора детергента с антигенами (субстанция и стандартный образец ГА): 50 мкл детергента + 450 мкл антигена; инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем готовят разведения антигенов: неразведенный антиген; 0,75; 0,50 и 0,25 (или 1:0; 3:1; 1:1; 1:3), используя для разбавления ФБР 7,2 согласно табл.

Таблица – Схема разведений антигена

|  |  |
| --- | --- |
| Разведение | Объем, мкл |
| Антиген | Растворитель |
| Неразведенный 1:0 | 100 | 0 |
| 0,75 3:1 | 150 | 50 |
| 0,50 1:1 | 100 | 100 |
| 0,25 1:3 | 100 | 300 |

В лунки планшета вносят по 10 или 20 мкл каждого разведения, начиная с разведения 1:3, с помощью микрошприца или с помощью автоматической микропипетки со сменой наконечников при переходе от одного разведения к другому. Через 30 мин пластины помещают во влажную камеру на 18-24 ч при температуре (18-25) °С. Для удаления из геля неспецифических белков пластины помещают в ФБР рН 7,2 на несколько часов при 2-4-кратной смене ФБР рН 7,2. Слой геля покрывают смоченной в ФБР рН 7,2 безворсовой тканью (избегая образования воздушных пузырьков на поверхности геля) и несколькими слоями сухой фильтровальной бумаги, помещают под груз (не более 10 г на 1 см поверхности). Бумагу меняют через каждые 10-15 мин до тех пор, пока она не перестанет впитывать влагу из агарозы. Для дальнейшего высушивания пластины помещают под вентилятор, не снимая ткань и высушивают до момента, когда ткань будет свободно отделяться от агарозы. Пластины окрашивают в течение 30 мин в 0,3 % растворе Кумасси бриллиантового голубого G-250, обесцвечивают в отмывающем растворе до проявления четких колец преципитации на слабо окрашенном фоне.

***Вариант П***. В застывшей агарозе пробойником из нержавеющей стали с внешним диаметром 4,4 мм делают 6 рядов лунок (по 4 лунки в каждом) на расстоянии не менее 1,5 см от края пластины. Расстояние между лунками должно быть не менее 1 см. Агарозу из лунок удаляют. Определение проводят на двух пластинах. На каждой пластине исследуют две серии субстанции в сравнении со стандартным образцом ГА, отводя под каждый образец по два ряда лунок.

Субстанция и стандартный образец ГА должны содержать близкие количества ГА, так чтобы размеры зон преципитации могли быть сравнимы (см. вариант I).

Готовят смесь 10 % раствора детергента с антигенами (субстанция и стандартный образец ГА): 100 мкл детергента + 900 мкл антигена; инкубируют при температуре (18-25) °С в течение 30 мин. Затем готовят разведения антигенов: неразведенный антиген; 0,75; 0,50; 0,25 (или 1:0; 3:1; 1:1; 1:3), используя для разбавления ФБР рН 7,2. В лунки вносят по 30 мкл каждого разведения из лунок агглютинационного планшета, начиная с разведения 1:3, с помощью автоматической микропипетки со сменой наконечников при переходе от одного разведения к другому. Через 30 мин агарозные пластины помещают во влажную камеру на 18-24 ч при температуре (18-25) °С.

Удаление из геля неспецифических белков, высушивание и дальнейшее окрашивание пластины проводится, как изложено в Варианте I.

Учет результатов (проводят одним из указанных методов для двух вариантов проведения ОРИД).

*Метод 1*

Измерение колец преципитации в двух взаимно перпендикулярных направлениях и расчет количества ГА проводится с использованием специализированного решения программного обеспечения, согласно руководству к программе. В автоматическом режиме проводят анализ изображения пластины геля с зонами преципитации и расчет активности. График зависимости квадрата диаметров зон иммунодиффузии от разведения строится автоматически с использованием метода наименьших квадратов.

*Метод 2*

После подсушивания кольца преципитации измеряют в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Рассчитывают квадраты диаметров колец преципитации каждого антигена (субстанции и стандартный образец ГА) на основании средних величин по двум пластинам и строят график зависимости квадрата диаметров (откладывая по оси ординат) от разведения антигенов (откладывая по оси абсцисс), которая должна быть выражена прямой линией, располагающейся по оси ординат в пределах 3 мм2 от стандартной кривой.

*Критерии приемлемости анализа (для Метода 1 и Метода 2)*

На графике зависимость квадрата диаметров от разведений должна быть выражена прямой линией, которая должна располагаться по оси ординат в пределах 3 мм2 от стандартной кривой, Если расстояние между начальными точками линий антигена (субстанции) и стандартного образца гемагглютинина для ОРИД превышает 3 мм2, такие результаты не учитывают. В этом случае необходимо более точно подобрать разведение антисыворотки и антигенов.

Примечания

Приготовление 1 % раствора агарозы (для варианта II) и 1.5 % (для Варианта II ). В колбу вместимостью 250 мл добавляют 2 г агарозы и 200 мл ФБР №1, перемешивают. На кипящей водяной бане нагревают колбу до полного растворения агарозы (раствор должен стать прозрачным). Охлаждают до 56 °С. Разливают в пробирки по 14 мл. Раствор хранят 1 мес при температуре (2-8) °С.

Приготовление 1,5 % раствора агарозы (для варианта I).В колбу вместимостью 250 мл добавляют 3 г агарозы и 200 мл ФБР №1, перемешивают. На кипящей водяной бане нагревают колбу до полного растворения агарозы (раствор должен стать прозрачным). Охлаждают до 56 °С, Разливают в пробирки по 12 мл. Раствор хранят 1 мес при температуре (2-8) °С.

Пробирки с расславленной агарозой охлаждают до температуры 56 °С, добавляют моноспецифическую антисыворотку к гемагглютинину соответствующего штамма вируса гриппа в объеме, указанном в сопроводительных документах на антисыворотку. Агарозу с антисывороткой тщательно перемешивают, не допуская образования пузырьков воздуха. Тщательно вымытые и сухие стеклянные пластины размером 6 x 9 см помещают на горизонтальную поверхность (контроль по «уровню»). Расплавленную агарозу с антисывороткой быстро и равномерно наносят на пластины и оставляют на 30 мин при температуре (18-25) °С до застывания. Срок хранения подготовленных пластин 7 сут во влажной камере при температуре (2-8) °С.

Приготовление 0.3 % раствора Кумасси бриллиантового голубого G-250. В мерную колбу вместимостью 100 мл, на 1/3 заполненную раствором для обесцвечивания окрашенных агарозных гелей (отмывающий раствор), добавляют 0,3 г Кумасси бриллиантового голубого G-250 растворяют и доводят объем до метки тем же раствором и перемешивают. Раствор хранят при температуре (18-25) °С в течение 6 мес.

Приготовление отмывающего раствора. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 100 мл уксусной кислоты ледяной, добавляют 450 мл спирта этилового, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре (18-25) °С в течение 6 мес.

Тиомерсал. От 85 до 115 мкг/мл. Определение проводят подходящим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах».

Овальбумин. Не более 0,1 мкг/мл. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-системы «ИФА-овальбумин» согласно инструкции по применению, согласно инструкции по применению.

**Тетрадецилтриметиламмония бромид (ТДТАБ).** Не более 10 мкг на 50 мкг гемагглютинина. Определение проводят колориметрическим методом. Анализ основан на образовании окрашенного комплекса ТДТАБ с красителем бромфеноловым синим, растворимого в хлороформе.

Примечания

Приготовление фосфатного буферного раствора (ФБР) рН 7,0-7,2. 30 г натрия гидрофосфата и 4 г калия дигидрофосфата растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1000 мл и доводят объем раствора водой до метки, и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

Приготовление раствора бромфенолового синего. Краситель бромфеноловый синий растворяют в ФБР (рН 7,0-7,2) из расчета 80 мкг/мл. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

Приготовление основного стандартного раствора ТДТАБ. растворяют в ФБР (рН 7,0-7,2) из расчета 20 мкг/мл. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 мес.

Калибровочный график. К 1; 2; 3; 4; 5; 6 мл основного стандартного раствора ТДТАБ добавляют ФБР ( рН 7,0-7,2) до объема 10 мл (соответственно 2, 4, 6, 8, 10, 12 мкг/мл ТДТАБ). К полученным растворам добавляют по 4 мл раствора бромфенолового синего, 8 мл хлороформа и далее проводят анализ, как описано в «Методике определения» (см. ниже). Строят калибровочный график зависимости оптической плотности хлороформной фазы от концентрации ТДТАБ.

Методика определения

Перед проведением контроля субстанцию разводят ФБР (рН 7,2) до концентрации геммегглютинина, равной 50 мкг/мл. Встеклянную пробирку или колбу с притертой пробкой по вносят 10 мл субстанции, добавляют 4 мл раствора бромфенолового синего и 8 мл хлороформа. Для каждого образца субстанции делают две параллельные пробы. Одновременно готовят контрольную пробу, добавляя те же реактивы к 10 мл ФБР (рН 7,2). Смесь встряхивают в течение 2 мин до образования гомогенной эмульсии, переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 10 мин при 1500-2000 об/мин. Отделяют водный от хлороформного слоя. Нижний хлороформный слой переносят в кювету с толщиной слоя 10 мм и измеряют оптическую плотность при длине волны 550 нм против раствора, полученного из контрольной пробы. Определяют содержание ТДТАБ в каждой из 2 параллельных проб по калибровочному графику и вычисляют среднее значение содержания ТДТАБ в субстанции.

**Производственный штамм**. Должен соответствовать по антигенной структуре штамму вируса гриппа типа В, ежегодно меняющегося в соответствии с рекомендациями ВОЗ и комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам Минздрава России.

Производственный штамм (главный посевной материал (ГПМ)) должен отвечать следующим требованиям:

- соответствовать по антигенной структуре господствующей антигенной разновидности вируса гриппа типа А, адаптированного к куриным эмбрионам, и не требовать дополнительной аттенуации;

- быть бактериологически стерильными, не содержать посторонних вирусов, микоплазм и микобактерий туберкулеза;

- быть нетоксичным для белых мышей массой 14-16 г при внутрибрюшинном введении 0,5 мл ГПМ;

 - не должен пассироваться на перевиваемых клеточных культурах; иметь в сухом виде инфекционную активность на куриных эмбрионах не ниже 106 ЭИД50/0,2 мл и гемагглютинирующую активностью не ниже 1:80;

- быть специфичным в РТГА и РИНА с типоспецифическими противогриппозными сыворотками; вызывать накопление гемагглютининов в аллантоисной жидкости зараженных куриных эмбрионов в титре не ниже 1:80.

При работе с производственным штаммом необходимо руководствоваться санитарными требованиями, действующими на территории РФ, а также рекомендациями ВОЗ.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

**Транспортирование и хранение.** В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 ºС. Замораживание не допускается.