|  |  |
| --- | --- |
| **Оценка специфической безопасности рабочего посевного вируса вакцины желтой лихорадки в тесте нейровирулентности на обезьянах** | **ОФС****Вводится впервые** |

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод оценки специфической безопасности рабочего посевного вируса вакцины  желтой лихорадки в тесте нейровирулентности на обезьянах.

Метод основан на оценке нейротропных, висцероторопных и иммуногенных свойств рабочего посевного вируса вакцины желтой лихорадки путем интрацеребрального заражения восприимчивых к указанному вирусу обезьян.

ПРОИЗВОДСТВО

Производственный штамм

Аттенуированный штамм 17Д вируса желтой лихорадки. Первичная посевная серия в лиофилизированной форме предоставляется референс-лабораторией ВОЗ. Условия хранения при температуре минус 70 оC.

Вторичную посевную серию (рабочий посевной вирус) готовят из первичной посевной серии, которая представляет собой лиофилизированную суспензию тонкоизмельченной ткани куриных эмбрионов, свободных от специфической патогенной микрофлоры. Вторичную посевную серию производственного штамма получают в условиях одного производственного цикла, т.е. однократного пассирования первичной посевной серии вируса.

Испытания на обезьянах

Рабочая посевная серия вируса должна пройти испытания на нейровирулентность на группе из 10 обезьян. Испытания рабочего посевного вируса проводят параллельно с испытаниями первичной посевной серии, на таком же количестве обезьян.

Испытания следует проводить на обезьянах Macaca mulatta (макака резус) или Macaca fascicularis (макака циномольгус), у которых непосредственно перед инокуляцией посевного вируса необходимо продемонстрировать отсутствие антител к вирусу желтой лихорадки. Обезьяны должны быть здоровы, и ранее они не должны были инокулироваться нейротропными вирусами или антигенами, ассоциируемыми с желтой лихорадкой.

Вируссодержащий материал вводят каждой обезьяне по 0,25 мл во фронтальную часть мозга. Доза вируссодержащей жидкости составляет не менее чем 5000 LD50 (8000 БОЕ) и не более чем 50000 LD50 (80000 БОЕ). Исследуемый материал вводят обезьянам под глубоким наркозом, который достигается путем внутримышечного введения препарата для наркоза в соответствии с инструкцией по его применению. Перед введением исследуемого материала шерсть на голове у обезьян тщательно сбривают, операционное поле дважды обрабатывают 70 % спиртом и 10 % настойкой йода.

Испытания на висцеротропизм

Рабочий посевной вирус должен быть висцеротропным. Определение проводят в сыворотках обезьян на 2, 4 и 6 сутки после инокуляции испытуемой дозы вируса. Сыворотки инокулируют в разведениях 1:10, 1:100 и 1: 1000 как минимум в 4 сосуда с культурами клеток (или внутрь мозга не менее чем 6 мышам по 0,03 мл). Содержание вируса в 0,03 мл сыворотки обезьян должно быть не менее 100 LD50 или 160 БОЕ и не более 500 LD50 или 800 БОЕ.

Испытания на иммуногенность

Вторичная посевная серия вируса вакцины против желтой лихорадки штамма 17Д должна быть иммуногенна для обезьян, т.е. вызывать образование вируснейтрализующих антител не менее чем у 90 % обезьян в течение 30 суток после введения испытуемой дозы.

 Наличие вируснейтрализующих антител в сыворотках крови подопытных обезьян устанавливают в реакции нейтрализации вируса желтой лихорадки в культуре клеток.

Испытания на нейровирулентность

Необходимо произвести сравнение испытуемых обезьян с 10 обезьянами, инфицированными эталонным вирусом, на наличие клинических признаков энцефалита и тяжесть гистологических поражений нервной системы.

Обезьяны осматриваются ежедневно в течение 30 дней сотрудниками, знакомыми с клиническими проявлениями энцефалита приматов (приложение 1).

Признакам энцефалита, таким как парез, расстройства координации, заторможенность, тремор или мышечная спастичность, необходимо присвоить цифровые значения по степени тяжести в соответствии с приведенной ниже балльной системой. Ежедневно каждой обезьяне должен присваиваться балл по следующей шкале:

– 1 балл: грубоволосистый наружный покров, отсутствие аппетита;

– 2 балла: пронзительный голос, высокий голос, вялость, малоподвижность;

– 3 балла: шаткость, тремор, отсутствие координации, слабость конечностей;

– 4 балла: неспособность стоять, паралич конечностей или смерть.

Клиническая бальная оценка состояния обезьяны представляет собой среднюю величину ежедневных балльных оценок; клиническая балльная оценка группы – среднее арифметическое индивидуальных баллов. Клиническая балльная оценка состояния обезьян, инфицированных тестируемым вирусом, не должна превышать клиническую бальную оценку состояния обезьян, инфицированных эталонным вирусом.

Необходимо также исследовать шейные и поясничные утолщения спинного мозга и специфические структуры на пяти уровнях головного мозга. Шейные и поясничные утолщения следует разделить на шесть блоков. Из головного мозга берут блоки ткани толщиной 3-4 мм, делая следующие лобные надрезы:

Блок I: полосатое тело на уровне зрительных нервов;

Блок II: таламус на уровне сосцевидных тел;

Блок III: средний мозг на уровне верхних холмиков;

Блок IV: мост и мозжечок на уровне верхних олив;

Блок V: продолговатый мозг на среднем уровне нижних олив.

Каждый блок дегидрируют и заключают в парафин; делают срезы размером 15 мкм, которые окрашивают галлоцианином. Из каждого блока берут один срез, состоящий из двух половин (приложение 2).

Срезы исследуют под микроскопом и присваивают баллы каждой половине срезов шейных и поясничных утолщений спинного мозга, а также каждой анатомической структуре в каждой половине среза блоков головного мозга согласно следующей классификационной системе:

1 (минимальный): 1-3 малых фокальных воспалительных инфильтрата. Несколько нейронов могут быть изменены или утрачены;

2 (средний): более обширные фокальные воспалительные инфильтраты. Изменения или утрата не более трети нейронов;

3 (высокий): изменения или утрата 33-90% нейронов при умеренной фокальной или диффузной воспалительной инфильтрации;

4 (чрезмерный): изменения или утрата более 90% нейронов при вариабельной, но часто тяжелой воспалительной инфильтрации.

Каждый блок головного мозга содержит ряд анатомических структур, которые тем или иным образом способствует точности оценки испытуемого образца. Например некоторые структуры с большей воспроизводимостью, чем другие, позволяют провести различие между приемлемой и неприемлемой посевными сериями вируса желтой лихорадки и вакцинами. Они называются зонами-дискриминаторами, тогда как структуры, более чувствительные к репликации вируса желтой лихорадки, называются зонами-мишенями.

У макак резус и макак циномольгус зоны-дискриминаторы и зоны-мишени различаются. Главное различие состоит в том, что у макак циномольгус шейные и поясничные утолщения являются зонами-мишенями, в то время как у макак резусов они представляют собой зоны-дискриминаторы.

Для каждой обезьяны должным быть рассчитаны три отдельных балла: только по зонам-дискриминаторам, только по зонам-мишеням и по тем и другим зонам вместе. Для каждой группы обезьян необходимо рассчитать общий средний балл как среднее арифметическое индивидуальных оценок по зонам-дискриминаторам и зонам-мишеням вместе. Оба средних балла должны учитываться при определении приемлемости посевной серии вируса (приложения 3,4).

Нейровирулентность рабочего посевного вируса считается удовлетворительной при отсутствии статистически достоверных различий в гистологической оценке рабочего посевного вируса по сравнению с аналогичными показателями первичного посевного вируса.

Приложение 1

**Результаты клинических испытаний**

**Дата инокуляции**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  **Вид обезьян**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

|  |  |
| --- | --- |
| Номер прототипной посевной серии вируса | Номер серии эталонного вируса |
| №№ обезьян | Балл для зоны-дискриминатора | Балл для зоны-дискриминатора и зоны-мишени | №№ обезьян | Балл для зоны-дискриминатора | Балл для зоны-дискриминатора и зоны-мишени |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
| Среднее значение для группы |  |  | Среднее значение для группы |  |  |

Результат

 (удовлетворительный или неудовлетворительный) \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Приложение 2

**Гистологическая оценка результатов исследований**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследуемые области и структуры ЦНС | Полусрез | № обезьяны | Средний балл пораже-ний | № обезьяны | Средний балл пораже-ний | № обезьяны | Средний балл пораже-ний |
| **Полосатое тело и таламус (блок I, II)** |
| N.caudatus | Л | 1 | ¼=0.25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| Gl. pallidus\* | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 00 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| Putamen \* | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ¼=0.25 |
| П | 0 | 0 | 1 |
| N. ant./med . thalami.\* | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| N. lat . thalami.\* | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| Гипоталамус | Л | 0 | 0 | 0 | 00 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| **Средний мозг (блок III)** |
| Colliculi sup. | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| Corp.gen.med | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| N. oculomotorius | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| N. ruber | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| S. nigra\*\* | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| **Мост (блок IV)** |
| N. abducens | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| N.vestibularis | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| N.trigeminus | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| N.facialis | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| Form. reticularis | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| Oliva superior | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| **Продолговатый мозг (блок V)** |
| N.hypoglossus | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследуемые области и структуры ЦНС | Полусрез | № обезьяны | Средний балл пораже-ний | № обезьяны | Средний балл пораже-ний | № обезьяны | Средний балл пораже-ний |
| N.glossophar. | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| N.vestibularis | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| **Продолговатый мозг (блок V)** |
| N.hypoglossus | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| N.glossophar. | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| N.vestibularis | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| N.trigeminus | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| N. ambiguus | Л | 1 | ½=0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| Form. reticularis | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| Oliva inferior | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| **Мозжечок (блоки IV, V)** |
| N.dentatus | Л | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| Другие ядра | Л | 1 | ½=0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| **Спинной мозг, шейное утолщение** |
| I | Л | 0 | 1/12=0.08 | 0 | 3/12=25 | 0 | 1/12=0.08 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| II | Л | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 1 | 0 |
| III | Л | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 1 | 0 |
| IV | Л | 0 | 0 | 1 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| V | Л | 0 | 1 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| VI | Л | 1 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследуемые области и структуры ЦНС | Полусрез | № обезьяны | Средний балл пораже-ний | № обезьяны | Средний балл пораже-ний | № обезьяны | Средний балл пораже-ний |
| **Спинной мозг, поясничное утолщение** |
| I | Л | 0 | 1/12=0.08 | 0 | 0 | 0 | 1/12=0.08 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| II | Л | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| III | Л | 0 | 0 | 1 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| IV | Л | 0 | 0 | 0 |
| П | 1 | 0 | 0 |
| V | Л | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |
| VI | Л | 0 | 0 | 0 |
| П | 0 | 0 | 0 |

Приложение 3

**Система гистологической оценки**

В приведенных ниже рабочих таблицах показано, как производится гистологическая балльная оценка нарушений у обезьян Macaca fascicularis в соответствии с приводимой системой градации

Вид: Macaca fascicularis

Номер патологии:

Номер обезьяны:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Полосатое тело и таламус | Блок I | Блок II | Клиническая бальная оценка(ежедневная),всего |
| Л | П | Л | П |
| N.caudatusа | 1 | 0 | 2 | 2 | (5/4=)1,25 |
| Gl. Pallidusа,б | 0 | 1 | 2 | 0 | (3/4=)0,75 |
| Putamen а,б | 2 | 0 | 1 | 1 | (4/4=)1,00 |
| N. ant./med. thalam а,б | 1 | 1 | 0 | 1 | (3/4=)0,75 |
| N. lat . thalamiа,б | 1 | 2 | 1 | 1 | (5/4=)1,25 |
| Гипоталамус | 0 | 1 | 0 | 0 | (1/4=)0,25 |

а Зона-дискриминатор у макак резусов

б Зона-дискриминатор у Macaca fascicularis

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Средний мозг (блок III) | Л | П | Всего |
| Colliculi sup. | 0 | 0 | 0 |
| Corp.gen.med | 0 | 0 | 0 |
| N. oculomotorius | 0 | 0 | 0 |
| N. ruber | 0 | 0 | 0 |
| S. nigraв | 2 | 2 | (4/2=)2,00 |

в Зона-минешь у макак резусов и Macaca fascicularis

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Мост (блок IV) | Л | П | Всего |
| N. abducens | 0 | 0 | 0 |
| N.vestibularis | 0 | 0 | 0 |
| N.trigeminus | 0 | 0 | 0 |
| N.facialis | 0 | 1 | (1/2=)0,5 |
| Form. reticularis | 1 | 0 | (1/2=)0,5 |
| Oliva superior | 0 | 0 | 0 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Продолговатый мозг (блок V) | Л | П | Всего |
| N.hypoglossus | 0 | 0 | 0 |
| N.glossophar | 0 | 0 | 0 |
| N.vestibularis | 0 | 0 | 0 |
| N.trigeminus | 0 | 0 | 0 |
| N. ambiguus | 0 | 0 | 0 |
| Form. reticularis | 0 | 0 | 0 |
| Oliva inferior | 0 | 0 | 0 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Мозжечок (блоки IV и V ) | Л | П | Всего |
| N.dentatus | 0 | 0 | 0 |
| Другие ядра | 0 | 0 | 0 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Спинноймозг | I | II | III | IV | V | V I | Всего |
| Л | П | Л | П | Л | П | Л | П | Л | П | Л | П | Л | П | Л+П |
| Шейное утолщение | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 11 | 14 | (25/12=) 2,08 |
| Поясничное утолщение | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | 5 | 11 | (16/12=) 1,33 |

а Зона-дискриминатор у макак резусов

г Зона-мишень у Macaca fascicularis

Расчеты:

Зоны-дискриминаторы (globus pallidus, putamen, n.ant./med. thalami, n. lat. thalami):

Балл при наличии поражения = (0,75 + 1,00 + 0,75 + 1,25) = 0,94 «Д»

 4

Зоны-мишени (s. nigra, шейное утолщение, поясничное утолщение):

Балл при наличии поражения = (2,00 + 2,08 + 1,33) = 1,80 «М»

 3

Зоны-дискриминаторы + зоны-мишени:

Балл при наличии поражения = (0,94 + 1,80) = 1,37 «Д+М»

 2

Клинические баллы оцениваются для 1 обезьяны: ежедневно (х 30 дней).

Клинические баллы оцениваются для группы обезьян: ежедневно (х 30 дней):

«Д»/4, «М»/3, «Д + М»/2

Приложение 4

**Гистопатологические результаты**

**Дата инокуляции**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  **Вид обезьян**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

|  |  |
| --- | --- |
| Номер прототипной посевной серии вируса | Номер серии эталонного вируса |
| №№ обезьян | Балл для зоны-дискриминатора | Балл для зоны-дискриминатора и зоны-мишени | №№ обезьян | Балл для зоны-дискриминатора | Балл для зоны-дискриминатора и зоны-мишени |
| 1 |  |  | 11 |  |  |
| 2 |  |  | 12 |  |  |
| 3 |  |  | 13 |  |  |
| 4 |  |  | 14 |  |  |
| 5 |  |  | 15 |  |  |
| 6 |  |  | 16 |  |  |
| 7 |  |  | 17 |  |  |
| 8 |  |  | 18 |  |  |
| 9 |  |  | 19 |  |  |
| 10 |  |  | 20 |  |  |
| Среднее значение для группы |  |  | Среднее значение для группы |  |  |

Результат

 (удовлетворительный или неудовлетворительный) \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_