



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНЗДРАВ РОССИИ)

ПРИКАЗ

28 ноября 2020г.

№ 751

Москва

**Об утверждении
фармакопейной статьи и внесении изменения в приложение № 2
к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации
от 31 октября 2018 г. № 749 «Об утверждении общих фармакопейных статей
и фармакопейных статей и признании утратившими силу
некоторых приказов Минздравмедпрома России,
Минздравсоцразвития России и Минздрава России»**

В соответствии со статьей 7 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2010, № 16, ст. 1815; 2014, № 52, ст. 7540) п р и к а з ы в а ю:

1. Утвердить фармакопейную статью ФС 3.3.1.0028.20 «Вакцина гриппозная инактивированная» согласно приложению и ввести ее в действие с 1 сентября 2020 года.

2. Пункт 574 приложения № 2 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 749 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей и признании утратившими силу некоторых приказов Минздравмедпрома России, Минздравсоцразвития России и Минздрава России»* изложить в следующей редакции:

* С изменениями, внесенными приказами Министерства здравоохранения Российской Федерации:

от 29 ноября 2018 г. № 828 «О внесении изменений в приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 748 «О признании недействующими на территории Российской Федерации приказа Минздрава СССР от 8 апреля 1991 г. № 99 «О введении в действие фармакопейной статьи «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов» и Государственных фармакопей СССР X и XI изданий» и приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 749 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей и признании утратившими силу некоторых приказов Минздравмедпрома России, Минздравсоцразвития России и Минздрава России»;

от 21 апреля 2020 г. № 352 «Об утверждении общей фармакопейной статьи и внесении изменения в приложение № 1 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 749 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей и признании утратившими силу некоторых приказов Минздравмедпрома России, Минздравсоцразвития России и Минздрава России».

«	574. Вакцина гриппозная инактивированная	ФС 3.3.1.0028.20, утвержденная и введенная в действие приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от «28» июля 2020 г. № 751 «Об утверждении общей фармакопейной статьи и внесении изменения в приложение № 2 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 749 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей и признании утратившими силу некоторых приказов Минздравмедпрома России, Минздравсоцразвития России и Минздрава России»	Взамен ФС.3.3.1.0028.15, утвержденной и введенной в действие приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 749 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей и признании утратившими силу некоторых приказов Минздравмедпрома России, Минздравсоцразвития России и Минздрава России»	».
---	--	--	---	----

3. Пункт 2 настоящего приказа вступает в силу с 1 сентября 2020 года.

Министр



М.А. Мурашко

Приложение
к приказу Министра здравоохранения
Российской Федерации
от «28» июля 2020 г. № 751

Вакцина гриппозная	ФС 3.3.1.0028.20
Инактивированная	Взамен ФС.3.3.1.0028.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину гриппозную инактивированную (вакцину цельновирионную, которая представляет собой цельный вирус; вакцину расщепленную (сплит-вакцину), которая состоит преимущественно из разрушенных вирусных частиц; вакцину субъединичную, которая содержит в основном поверхностные антигены вируса гриппа: гемагглютинин и нейраминидазу). Антигены получают из очищенного вируса или очищенных вирусов гриппа типов А и В, одного, двух, трех или четырех штаммов, выращенных отдельно в развивающихся куриных эмбрионах.

Вакцина может содержать адъювант и консервант.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины включает ряд последовательных стадий с обязательным внутрипроизводственным контролем: получение главного и рабочего посевных материалов; накопление вируса; очистку и концентрацию; расщепление вируса (при необходимости); производство препарата; маркировку; фасовку. На каждой стадии должны быть предусмотрены: система и схема анализа показателей качества в ходе технологического процесса и испытания конечного продукта; соблюдение условий и сроков хранения промежуточных и конечного продукта, обеспечивающее стабильность качества в течение срока годности продукта.

Штаммовый состав вакцин ежегодно рекомендуется ВОЗ и национальной Комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам. Для каждого нового штамма необходима валидация процесса расщепления вируса в моновалентном препарате сплит-вакцины и подтверждение наличия преимущественного содержания гемагглютинина и нейраминидазы в субъединичных моновакцинах. Производственные штаммы должны соответствовать по антигенной структуре вирусов гриппа подтипов А(Н₁Н₁) и А(Н₃Н₂) и типа В на текущий эпидемический сезон, с известной историей пассажей и источника выделения.

В случае использования в производстве в течение более одного эпидемического сезона производственные штаммы должны контролироваться не реже 1 раза в год.

Куриные эмбрионы должны быть получены из птицеводческих хозяйств, благополучных по возбудителям, патогенным для человека. Качество поставляемых эмбрионов должно быть подтверждено ветеринарными свидетельствами, должно соответствовать требованиям ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов» и ОФС «Вирусная безопасность».

Все производственные процессы, технологическое оборудование и методы контроля должны быть валидированы и должны осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека. Производство вакцины должно проводиться в помещениях, исключаящих работу с другими патогенными микроорганизмами и антибиотиками. Не допускается производство препарата на территории, на которой расположены производственные здания по производству антибиотиков, если не соблюдены требования к защитным зонам, согласно действующим санитарным правилам. Обязательным условием технологического процесса производства вакцины является соблюдение

поточности, исключающей возможность перекреста промежуточных продуктов и полуфабрикатов, получаемых на разных стадиях производства, и их контаминацию посторонними веществами, в первую очередь посторонней микрофлорой.

Работа с живым и инактивированным вирусом должна проводиться в разных помещениях. Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами (допустимо использование компонентов только фармакопейного качества). В состав вакцины должны входить вспомогательные компоненты, разрешенные к медицинскому применению и в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Из главного посезного материала готовят рабочий посевной материал (посевной вирус), который должен быть представлен не более чем 15 пассажем от соответствующего производственного штамма. Финальный сбор представляет собой первый пассаж от рабочего посезного вируса.

Пенициллин или стрептомицин нельзя использовать ни на одной из стадий производства.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная или опалесцирующая желтоватая жидкость. Определение проводят визуально.

Подлинность. Каждый подтип и тип антигена должен нейтрализоваться гомологичной сывороткой. Титр с гетерологичной сывороткой должен быть ниже титра с гомологичной сывороткой не менее, чем в 4 раза. Определение проводят на стадиях получения полуфабрикатов: объединенного вирусного концентрата или моновакцины в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (макрометод). РТГА применяют для установления типа и подтипа вируса, т.е. специфичности,

а также для определения нарастания титров специфических антител. Постановка РТГА включает следующие этапы: приготовление взвеси эритроцитов, определение гемагглютинирующего титра антигена в реакции гемагглютинации (РГА) и рабочей дозы вируса, постановка самой реакции. Для постановки реакции необходимы следующие ингредиенты:

- исследуемый антиген (субъединичная моновакцина, вируссодержащая жидкость – аллантоисная или культуральная);
- иммунные/диагностические сыворотки к различным типам (А и В) и подтипам типа А вируса гриппа;
- фосфатный буферный раствор $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$ (ФБР);
- суспензия куриных эритроцитов, 1 %.

1. Приготовление взвеси куриных эритроцитов. Для постановки РТГА используют эритроциты петухов. Кровь у петухов берут из сердца или подкрыльцевой вены.

Свежеполученную кровь от 3-5 петухов помещают во флакон со стеклянными бусами или с одним из антикоагулянтов (раствор Альсевра, 5%-й раствор натрия цитрата). Дефибрирование крови проводят немедленно путем интенсивного встряхивания флакона со стеклянными бусами в течение 5-7 мин при температуре $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ до выпадения волокон фибрина.

Дефибрированную кровь фильтруют через 4 слоя марли, затем трехкратно отмывают ФБР путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин или 800 ± 200 об/мин в течение (15 ± 5) мин. Надосадочную жидкость удаляют. Из осадка, принимаемого за 100 %, готовят 1 % суспензию куриных эритроцитов по объему.

2. Определение гемагглютинирующего титра антигена. В лунках агглютинационного планшета готовят двукратные разведения антигена в объеме 0,4 мл на фосфатном буферном растворе, начиная с 1:10 до 1:1280. В каждую лунку вносят по 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. Содержимое

лунок перемешивают встряхиванием планшета и оставляют при температуре $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ на 40-45 мин (до оседания эритроцитов в отрицательном контроле).

Реакцию оценивают по «четырёхкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается отрицательным контролем на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. С этой целью в контрольную лунку того же агглютинационного планшета вносят 0,4 мл фосфатного буферного раствора и 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. При отсутствии спонтанной агглютинации на дне лунки выпадает гомогенный с ровными краями осадок эритроцитов (отрицательная реакция).

3. Приготовление рабочей дозы антигена. В РТГА рабочей дозой антигена является то разведение антигена, в 0,2 мл которого содержится 4 агглютинирующие единицы (4 АЕ). Для вычисления ее следует установленную величину титра антигена разделить на 8. Полученная цифра указывает во сколько раз нужно развести антиген, чтобы в 0,2 мл его содержалось 4 АЕ (рабочая доза).

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (4 АЕ). Для этого в пять лунок горизонтального ряда агглютинационного планшета, начиная со второй, вносят по 0,2 мл фосфатного буферного раствора. В 1-ю и 2-ю лунки добавляют по 0,2 мл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания переносят 0,2 мл смеси из лунки в лунку, начиная со 2-й по 5-ю лунку, из 5-й лунки 0,2 мл удаляют. Затем в каждую лунку добавляют по 0,2 мл фосфатного буферного раствора и по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. В 6-й лунке ставят контроль на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ на 40-45 мин (до оседания эритроцитов в контроле).

При правильном выборе рабочей дозы полная (++++) агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в первых трех лунках. 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 фосфатного буферного раствора для получения необходимой рабочей дозы. При этом необходимо повторно проверить правильность приготовления рабочей дозы.

4. Постановка реакции торможения гемагглютинации. Готовят двукратные разведения сывороток в лунках агглютинационного планшета, начиная с 1:10 до 1:640 и выше в объеме 0,2 мл. К каждому разведению сыворотки добавляют по 0,2 мл рабочей дозы антигена (4 АЕ). Смесь встряхивают и после контакта антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 ч) при температуре $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ в каждую лунку добавляют по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. Смесь повторно встряхивают, оставляют при температуре $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ в течение 40 – 45 мин (до оседания эритроцитов в контроле), после чего производят учет результатов реакции.

При наличии в сыворотке специфических антител наступает задержка агглютинации эритроцитов. За титр сыворотки принимают предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации.

Задержка гемагглютинации указывает на соответствие типа антигена и взятой сыворотки; отсутствие задержки гемагглютинации свидетельствует о несоответствии типа взятой сыворотки антигену.

Примечания

* При исследовании сывороток привитых в РТГА (изучение иммуногенности вакцины) следует учитывать, что сыворотки людей содержат различные полисахариды, которые могут связывать гемагглютинин вируса гриппа и затруднять связывание специфических гриппозных гемагглютинирующих антител. Для удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации образцы сыворотки обрабатывают при помощи нейраминидазы холерных вибрионов или ферментом RDE (receptor destroying enzyme).

При наличии готового реактива необходимо следовать требованиям, изложенным в инструкции по применению.

К 1 объему исследуемой сыворотки добавляют 3 объема фермента RDE (разведение сыворотки 1:4). Смесь инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 18 – 20 часов, а затем прогревают на водяной бане при температуре $(56 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Смесь охлаждают при комнатной температуре, после чего в нее вносят фосфатный буферный раствор (рН 7,2) в объеме, необходимом для получения разведения сыворотки 1:10 (1 объем сыворотки в разведении 1:4 + 1,5 объема фосфатного буферного раствора).

При необходимости длительного хранения обработанную сыворотку (разведение 1:10) хранят при температуре не выше минус $20 ^\circ\text{C}$.

Приготовление 0,1 М раствора фосфатного буферного (рН $7,2 \pm 0,2$).

Раствор 1. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 17,8 г натрия фосфата двузамещенного 2 – водного ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор 2. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 15,6 г натрия фосфата однозамещенного 2–водного ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 720 мл раствора 1, прибавляют 280 мл раствора 2 и перемешивают. Затем в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 100 мл приготовленного 0,1 М фосфатного буферного раствора доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают, прибавляют 8,5 г натрия хлорида и вновь перемешивают. рН полученного раствора должен быть $7,2 \pm 0,02$. Если показатель рН выше или ниже требуемого, его соответственно доводят 1 М раствором хлористоводородной кислоты или 1 М раствором натрия гидроксида.

Приготовление раствора Альсевера

Состав:

- 2,05 % глюкозы;
- 0,42 % натрия хлорида;
- 0,8 % натрия цитрата;
- 100,0 мл воды очищенной.

рН раствора доводят с помощью 5 % раствора лимонной кислоты до рН 5,6 (примерно 10 мл 5 % раствора лимонной кислоты на 1 л раствора Альсевера). Раствор стерилизуют фильтрацией или автоклавированием в течение 3 последовательных дней при температуре $100 ^\circ\text{C}$ и давлении 0,7 атм. Для консервирования добавляют на 1 мл крови 1,2 мл раствора Альсевера. В данном растворе эритроциты могут храниться при температуре $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 1–2 нед. Перед использованием эритроциты необходимо

трехкратно отмыть фосфатным буферным раствором с помощью центрифугирования при (800 ± 200) об/мин в течение 10 мин.

Приготовление консервирующего 5 % раствора натрия цитрата.

5 % раствор натрия цитрата перед использованием разводят в 2 раза 0,1 М фосфатным буферным раствором ($\text{pH } 7,2 \pm 0,2$). К одной части полученного раствора натрия цитрата добавляют 2 части крови петухов. В данном растворе эритроциты могут храниться при температуре $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 3-5 сут.

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (микрометод). Принцип метода, его учет и ингредиенты, те же, что и для проведения РТГА макрометодом. Отличие методов заключается в изменении концентрации и объемов ингредиентов.

Реакцию ставят в микропланшетах с «U»-образными лунками.

1. Приготовление 0,5 % взвеси куриных эритроцитов. Взвесь готовят из 1%-й суспензии эритроцитов (см. макрометод) разведением ее в 2 раза фосфатным буферным раствором.

2. Определение гемагглютинирующего титра антигена. В каждую лунку микропланшета одного ряда вносят фосфатный буферный раствор в объеме 50 мкл. Затем в первую лунку вносят 50 мкл антигена в разведении 1:10 и далее проводят титрование по принципу двукратного разведения. Из последней лунки удаляют 50 мкл. Затем в каждую лунку вносят по 50 мкл 0,5%-й суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием и оставляют при температуре $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ на 40–45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

Реакцию оценивают по «четырёхкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается постановкой отрицательного контроля на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов.

3. Приготовление рабочей дозы антигена. Рабочая доза антигена при постановке РТГА микрометодом равна 8 АЕ. Для её расчета и последующего приготовления гемагглютинирующий титр делят на 16. Полученное значение указывает, во сколько раз необходимо развести антиген.

Пример: титр антигена равен 160. Разделив 160 на 16, получаем цифру 10, указывающую на то, что антиген необходимо развести в 10 раз.

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (8 АЕ). Для этого в шесть лунок микропланшета, начиная со второй, вносят по 25 мкл фосфатного буферного раствора. В 1 и 2 лунки добавляют по 25 мкл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания 25 мкл смеси переносят из 2 лунки в 3, из 3 – в 4 и т.д. Из последней лунки панели 25 мкл удаляют. Затем во все лунки добавляют по 25 мкл фосфатного буферного раствора и по 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре (20 ± 5) °С на 40 – 45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

При правильном выборе рабочей дозы агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в четырех лунках микропланшета. В остальных лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного результата добавляют антиген или фосфатный буферный раствор для получения необходимой рабочей дозы.

4. Постановка реакции торможения гемагглютинации. Метод постановки реакции микрометодом соответствует таковому, описанному для макрометода, за исключением объемов используемых ингредиентов реакции.

Готовят двукратные разведения сыворотки в объеме 25 мкл, вносят рабочую дозу антигена (8 АЕ) в объеме 25 мкл и после контакта антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 ч) при температуре (20 ± 5) °С в каждую лунку панели вносят по 50 мкл 0,5 % взвеси эритроцитов. После оседания

эритроцитов в контроле (как правило, через 40 – 45 мин) проводят учет результатов.

За титр сыворотки принимают предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации.

Прозрачность. Должен выдерживать сравнение с эталоном III. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Не должен превышать степень окраски эталона сравнения Y_5 . Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

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

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Белок. Не более 100 мкг на дозу для цельновирионных и расщепленных вакцин для каждого из входящих в состав вакцины штамма. Не более 40 мкг на дозу для субъединичных вакцин за вычетом количественного содержания гемагглютенина для каждого из входящих в состав вакцины штамма. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка» по методу Лоури, если нет других указаний в нормативной документации.

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Не более 100 ЕЭ/доза. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Доза для мышей и морских свинок 0,5 мл.

Специфическая безопасность. Не должен содержать живого вируса гриппа.

Определение отсутствия живого вируса проводят путем заражения 10 куриных эмбрионов (10–12-дневных) по 0,2 мл препарата в аллантоисную полость. Через 48 – 72 ч (в соответствии с паспортом на производственный штамм, принимая во внимание максимальное время экспозиции) инкубации эмбрионов в термостате при температуре 34 – 37 °С (в соответствии с паспортом на производственный штамм, принимая во внимание максимальную температуру инкубации) аллантоисную жидкость проверяют на наличие гемагглютининов с эритроцитами петухов (1 % суспензия). Не менее 7 из 10 куриных эмбрионов должны остаться живыми. Собирают по 0,5 мл аллантоисной жидкости из каждого эмбриона, объединяя жидкость от всех эмбрионов. Затем заражают по 0,2 мл неразведенной смеси аллантоисной жидкости 10 эмбрионов. Эмбрионы инкубируют при тех же условиях, после чего определяют наличие гемагглютининов в аллантоисной жидкости после второго пассажа. Результаты реакции гемагглютинации после 2-го пассажа должны быть отрицательными. В том случае, если определяется наличие гемагглютининов в аллантоисной жидкости после 2-го пассажа, допускается проведение 3-го пассажа. Результаты реакции после 3-го пассажа должны быть отрицательными.

Специфическая активность. Должен содержать гемагглютинин вируса гриппа подтипов А и типа В не более 15 ± 2 мкг на дозу. Требование к количественному содержанию гемагглютинина в дозе формулируют на основании результатов клинических испытаний по иммуногенности. Специфическую активность определяют в реакции одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД).

Принцип метода. Гемагглютинин (ГА), диффундируя из лунок агарозного геля в радиальном направлении, реагирует со специфическими антителами сыворотки, находящейся в агарозе, и образует в геле зону преципитации. Размеры окружающей лунку зоны преципитации находятся в прямой зависимости от количества антигена, внесенного в лунку.

В ОРИД может быть использован международный стандарт моноспецифической сыворотки к гемагглютинину вируса гриппа производства NIBSC (Великобритания) или TGA (Австралия) и может быть использован международный стандарт гемагглютинина вируса гриппа производства NIBSC или TGA.

Определение специфической активности вакцин, т.е. определение количественного содержания гемагглютинина (ГА) в мкг/мл, проводят на двух пластинках. На каждой пластине исследуют один стандартный антиген и серии вакцины, отводя под каждый образец по два ряда лунок. На второй пластине проверяют те же образцы, но расположение вакцин и стандартного антигена произвольно меняют. Предварительно к 450 мкл испытуемого образца /каждого стандартного антигена добавляют 50 мкл детергента (далее – неразведенный антиген) и инкубируют смесь при температуре $(20\pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Затем готовят разведения образцов в соответствии с таблицей путем переноса неразведенного антигена в соответствующие лунки планшета.

Таблица – Схема разведений антигена

Разведение	Соотношение	Объем в мкл	
		Неразведенный антиген	Фосфатный буферный раствор(ФБР)
неразвед.	1:0	200	0
0,75	3:1	150	50

0,5	1:1	100	100
0,25	1:3	50	150

Вакцина и стандартный антиген должны содержать близкие количества ГА, так, чтобы размеры зон преципитации могли быть сравнимы. В документации на стандарт должны быть указаны рекомендуемые разведения стандарта и сыворотки.

Результаты анализа. Рассчитывают квадраты диаметров колец преципитации каждого антигена на основании средних величин по двум пластинам и строят график, откладывая по оси ординат квадраты диаметров, а по оси абсцисс – разведения антигенов. На графике зависимость квадрата диаметров от разведений для каждой вакцины должна быть выражена прямой линией, которая должна располагаться по оси ординат в пределах 3 мм² от стандартной кривой. Если расстояние между начальными точками тестируемого и стандартного антигена превышает 3 мм², такие результаты не учитывают; в этом случае необходимо более точно подобрать концентрации антисыворотки и антигенов. Затем на оси ординат между начальными точками кривой стандарта и каждого антигена находят среднюю точку, от нее проводят прямую, параллельную оси абсцисс, а от нее на уровне разведения 1:3 находят расстояния до кривой тестируемого антигена и стандартного. Количество ГА (X) в вакцине в мкг/мл рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{L_x}{L_{ст}} \cdot a \cdot b,$$

где: $L_x, L_{ст}$ – расстояния по перпендикуляру на уровне разведения 1:0 от срединной линии до пересечения с кривыми тестируемого и стандартного антигенов, соответственно;

a – содержание ГА в мкг/мл в стандартном антигене;

b – предварительное разведение вакцины

Учет результатов ОРИД можно проводить, используя программное обеспечение.

Примечания

Приготовление стандартного антигена. Восстанавливают водой очищенной в объеме, указанном на ампуле; дальнейшие разведения делают с помощью ФБР. Разведенный антиген хранят при температуре 4 °С не более 6 ч.

Приготовление агарозы. Агарозу заливают ФБР и нагревают при температуре 96 ± 2 °С в водяной бане до полного растворения. Расплавленную агарозу фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки и закрывают резиновыми пробками. В таком виде агароза может храниться более 3 мес. при температуре 15-25 °С (если агароза начинает отделяться от стенок пробирки, ее не используют).

Детергенты. Используют детергенты, указанные в паспорте (инструкции) к стандарту. Растворы детергентов готовят на воде очищенной и хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

Краситель. Готовят 0,3 % раствор кислотного синего 83 (Кумасси бриллиантовый синий Р250) в растворе для обесцвечивания гелей. Краситель хранят при температуре 15-25 °С и может использоваться до выпадения в осадок образовавшихся кристаллов красителя.

Раствор для обесцвечивания окрашенных агарозных гелей. В мерный цилиндр вместимостью 1 л вносят 200 мл уксусной кислоты ледяной, добавляют 500 мл этилового спирта, перемешивают, доводят объем раствора до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят 6 мес при температуре 15-25 °С в емкости с притертой пробкой.

Вещества, вносимые в препарат. Выполняются тесты определения содержания соответствующих химических и вспомогательных веществ, используемых для разрушения вируса и его инактивации.

Качество исходного сырья и материалов должно быть подтверждено нормативными документами. В состав вакцины должны входить вспомогательные компоненты, разрешенные к медицинскому применению в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Тиомерсал. От 42,5 до 57,5 мкг на дозу. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах».

Овальбумин. Не более 1 мкг на дозу. Определение проводят иммуноферментным методом анализа с тест–системой для количественного определения овальбумина в жидкости.

Иммуногенность. Контролируют три первые серии вакцины, содержащие новый вакцинный штамм, по данным исследования в РТГА парных сывороток добровольцев, полученных до иммунизации и после нее по методу, описанному в разделе «Подлинность».

Для оценки иммуногенности должны быть взяты парные сыворотки (до вакцинации и через 21-28 дней после вакцинации). Обе сыворотки титруют одновременно в РТГА с эритроцитами петуха (раздел «Подлинность»). Титр в РТГА менее 1:10 оценивается как 1:5.

Показатели иммуногенности для серонегативных (с исходным титром не более 1:20):

- Число лиц с четырехкратным и более увеличением титра антител (сероконверсия) должно быть $> 40 \%$;
- Увеличение среднегеометрического титра (кратность нарастания) $> 2,5$ раза;
- Процент лиц с защитным титром антителом ≥ 40 должно быть $> 70 \%$.

По крайней мере, один показатель должен отвечать вышеуказанным требованиям.

Каждую серию вакцины испытывают на группе из 30 человек в возрасте от 18 лет. Ввиду малочисленности групп лиц, вакцинированных каждой серией вакцины, при замене штамма в учет результатов могут быть включены серопозитивные лица (с титром антител ≥ 40).

Реактогенность. Вакцина должна быть ареактогенной или слабо реактогенной. Контролируют три первые серии вакцины, содержащей новый вакцинный штамм. Каждую серию вакцины испытывают на той же группе

людей численностью 30 человек в возрасте от 18 лет, на которой определяют иммуногенность.

У части привитых могут наблюдаться местные и общие реакции различной степени выраженности; гиперемия, болезненность, припухлость в месте введения; недомогание, головная боль, повышение температуры. Местные реакции должны исчезать в течение от 1 до 3 суток (очень редко – до 5 сут), общие – в течение 3 сут. Допустимые реакции и их количество определяют для каждого конкретного препарата по результатам клинических исследований.

Примечание

* Испытания проводят в соответствии с протоколом на ограниченной группе лиц в помещении, оснащённом средствами противошоковой терапии в лицензированных медицинских учреждениях.

Хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств».