

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммунобиологический лекарственный препарат - вакцину коклюшно-дифтерийно-столбнячную адсорбированную (АКДС-вакцину), которая представляет собой смесь инактивированных коклюшных клеток и обезвреженных формальдегидом при нагревании дифтерийного и столбнячного токсинов, очищенных и адсорбированных на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

АКДС-вакцина предназначена для специфической профилактики коклюша, дифтерии и столбняка.

Производство

Все этапы производства АКДС-вакцины должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность ее применения.

Столбнячный анатоксин

При производстве столбнячного анатоксина используют штаммы/штамм *Clostridium tetania* полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию столбнячного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штаммов и предотвращать их контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, рН и содержание токсина. Для производства столбнячного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее $15 L_{+}/_{100}$ в 1 мл. Детоксикация столбнячного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность - отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств. Столбнячный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку. Для характеристики очищенного столбнячного анатоксина определяют рН, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность).

Определение специфической безопасности столбнячного анатоксина. Вводят подкожно 5 морским свинкам массой 250-350 г $1500 L_f$ столбнячного анатоксина (суммарно в бок и внутреннюю поверхность верхней трети бедра). В течение 21 сут. наблюдения у животных не должны обнаруживаться признаки столбняка (ригидность лапки, искривление позвоночника или сочетание указанных признаков) и потери массы тела. Если фиксируют гибель более 1 животного по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдают гибель более 1 животного, столбнячный анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности столбнячного анатоксина. Готовят раствор, содержащий столбнячный анатоксин, консервант (при его наличии) в 0,9% растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут.: первую - при температуре $(37 \pm 1)^{\circ}C$, вторую - при температуре от 2 до 8°C. Каждый образец вводят подкожно 5 морским свинкам массой 250-350 г в объеме 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). Наличие признаков столбняка в течение 21 сут. наблюдения за животными свидетельствует о присутствии в пробе столбнячного токсина.

Для производства АКДС-вакцины используют только стерильный и безопасный столбнячный анатоксин с удельной активностью не менее 1000 ЕС (или L_f) на мг белкового азота.

Дифтерийный анатоксин

При производстве дифтерийного анатоксина используют токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae*, полученный и депонированный в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию дифтерийного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина. Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств. Для характеристики очищенного дифтерийного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность). Дифтерийный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Определение специфической безопасности дифтерийного анатоксина. Морским свинкам (5 животным) массой 250-350 г вводят подкожно 1500 Lf (суммарно в оба бока) дифтерийного анатоксина. В течение 42 сут. наблюдения у животных не должны обнаруживаться изъязвления, инфильтраты, абсцессы, некрозы на местах инъекции и потеря массы тела. Если наблюдается гибель хотя бы 1 животного от дифтерийной интоксикации (красные надпочечники при аутопсии погибших животных), дифтерийный анатоксин применению не подлежит. Если наблюдают гибель более 1 животного по причине, не связанной с дифтерийной интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании устанавливают гибель более 1 животного, дифтерийный анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности дифтерийного анатоксина. Готовят раствор, содержащий дифтерийный анатоксин, консервант (при его наличии) в 0,9% растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут.: первую - при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, вторую - при температуре от 2 до 8°C. По 0,1 мл каждого образца вводят внутрикожно 2 морским свинкам массой 250-350 г или 1 кролику массой $(2,5 \pm 0,5)$ кг в объеме 0,2 мл. Наличие реакций на месте инъекции в течение 4 сут. наблюдения свидетельствует о присутствии во введенном растворе дифтерийного токсина (реверсии токсичности).

Для производства АКДС-вакцины используют только стерильный и безопасный дифтерийный анатоксин, содержащий не менее 1500 Lf на мг белкового азота.

Инактивированная коклюшная суспензия

Инактивированная коклюшная суспензия (КС) представляет собой стерильную взвесь обезвреженных формальдегидом цельных микробных клеток *Bordetella pertussis*. Для производства КС используют штаммы, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Производство ЕС должно быть основано на системе посевных серий. Культуры рабочих посевных серий должны обладать теми же характеристиками, что и культуры штамма, из которого была получена исходная посевная серия. Ежегодно перед использованием в производстве посевные серии должны быть проверены по морфологии, культуральным и антигенным свойствам, дермонекротической активности, вирулентности и токсичности, а также иммуногенной активности.

Определение серологических (антигенных) свойств КС. Взвесь коклюшных микробных клеток должна содержать агглютиногены 1, 2 и 3. Уровень агглютиногенов должен выявляться в реакции агглютинации соответствующими адсорбированными агглютинирующими сыворотками в титре не ниже 1:1280. При производстве КС используют штаммы *Bordetella pertussis* (серотип 1.2.3 - 1 штамм, серотип 1.2.0 - 1 штамм, серотип 1.0.3 - 1 штамм), взятые в равных соотношениях или в соотношении 4:3:3. Содержание формальдегида в инактивированной КС не более 300 мкг/мл, тиомерсала (при его наличии) - от 85 до 115 мкг/мл.

Уровень агглютиногенов 1, 2 и 3 следует определять на стадии получения сведенной КС и перед добавлением адъюванта или объединением с другими компонентами (антигенами) комбинированных вакцин. Для определения уровня содержания агглютиногенов используют адсорбированные коклюшные сыворотки к агглютиногенам 1, 2, 3. Титром считают величину,

соответствующую последнему удвоенному разведению сыворотки, дающему агглютинацию, соответствующую +++.

Для постановки развернутой РА готовят двукратные разведения сывороток от 1:160 до 1:10240 в 0,9% растворе натрия хлорида, рН $(7,1 \pm 0,2)$. Для этого в ряд агглютинационных пробирок, за исключением первой, наливают по 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида, рН $(7,1 \pm 0,2)$. Затем в первую и вторую пробирки вносят по 0,5 мл сыворотки в разведении 1:160. После тщательного перемешивания содержимого переносят 0,5 мл полученного разведения 1:320 из второй пробирки в третью, получая разведение 1:640, из третьей пробирки 0,5 мл переносят в четвертую и т.д. Из последней пробирки ряда, содержащей предельное разведение сыворотки (1:10240), 0,5 мл удаляют в емкость с дезинфицирующим раствором для получения равных объемов разведенной сыворотки (по 0,5 мл) во всех опытных пробирках.

Во все пробирки с приготовленными двукратными разведениями сывороток вносят по 0,5 мл испытуемой микробной взвеси с мутностью 10 МЕ (за 1 МЕ условно принят 1,1 млрд коклюшных бактерий в 1 мл). Одновременно проводят контроль сыворотки и антигена в тех же объемах на отсутствие спонтанной агглютинации, смешивая:

- 0,5 мл сыворотки в разведении 1:160 с 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида, рН $(7,1 \pm 0,2)$;

- 0,5 мл микробной взвеси КС с 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида, рН $(7,1 \pm 0,2)$.

Содержимое пробирок перемешивают путем встряхивания штатива, который затем помещают на 2 ч в термостат при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, после чего оставляют на 18-20 ч при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$.

Результаты реакции агглютинации учитывают визуально до встряхивания пробирок, а затем для более точного учета - в агглютиноскопе при осторожном встряхивании осадка путем медленного наклона пробирки.

Учет результатов реакции проводят по "четырёхкрестовой" системе:

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

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

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

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

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

Определение специфической безопасности инактивированной КС.

Полноту инактивации коклюшных микробов (специфическую безопасность) определяют в опытах на животных.

Испытуемую КС вводят внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл, содержащем 10 млрд коклюшных бактерий (прививочная доза вакцины для человека) 10 беспородным белым мышам массой 14-16 г. Мышам контрольной группы (10 животных) внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида, рН $(7 \pm 0,3)$, содержащего в той же концентрации консервант, который присутствует в вакцине. Для испытания используют здоровых животных одного пола из одной партии. Если используют животных обоего пола, их следует равномерно распределить по группам. Непосредственно перед введением вакцины определяют общую массу каждой группы мышей. Через 72 ч и спустя 7 сут. после введения определяют общую массу каждой группы мышей. Вакцина считается безопасной, если:

а) через 72 ч общая масса тела опытных животных не ниже их исходной массы тела перед введением препаратов;

б) через 7 сут. относительный прирост массы тела мышей, получивших испытываемую коклюшную суспензию, составляет не менее 60% прироста массы тела контрольных животных.

В случае гибели за этот срок хотя бы 1 мыши или потери в массе тела, по сравнению с первоначальной, опыт повторяют на удвоенном количестве мышей с теми же требованиями. В случае гибели хотя бы 1 мыши при повторном контроле испытываемая вакцинная масса признается непригодной.

Определение дермoneкротической активности. Испытание проводят на кроликах или мышам-сосункам. Коклюшная суспензия в концентрации 4 МЕ в объеме 0,2 мл при внутрикожном введении кролику не должна вызывать образования инфильтратов и развития некрозов; допускается гиперемия не более 10 мм в диаметре. В качестве контроля используют введение живой культуры в объеме 0,2 мл с минимальной концентрацией микробных клеток, вызывающей некроз размером не менее 5 мм в диаметре. Определение проводят на 2 белокожих кроликах массой 1,5-2 кг. Учет результатов проводят ежедневно в течение 4 сут.

КС, содержащая 1 МЕ в объеме 0,05 мл, при подкожном введении четырехдневным мышам-сосункам в область шеи со стороны спины не должна вызывать изменения цвета кожных покровов. В качестве положительного контроля вводят живую коклюшную культуру, взятую в том же объеме с минимальной концентрацией микробных клеток, вызывающей кожную реакцию; в качестве отрицательного контроля - 0,05 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Каждый препарат вводят 2 животным. Реакцию учитывают в течение 24 ч. Появление сине-пурпурного окрашивания инъецированной области свидетельствует о присутствии недостаточно обезвреженного дерматoneкротического токсина.

Для обоих тестов в качестве положительного контроля используют живую 2-суточную культуру тест-штамма или производственного (не подвергнутого инактивации) штамма, выращенную на среде Борде-Жангу с 30% крови человека или КУА с 10% крови человека.

Определение иммуногенных (защитных) свойств КС. КС с мутностью 20 МЕ должна содержать 10 МЕ активности. Определение проводят в соответствии с ОФС "Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин".

Для производства вакцины используют КС с концентрацией клеток от 60 до 80 МЕ в 1 мл, pH 6,8-7,4.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

Прививочная доза АКДС-вакцины (0,5 мл) содержит 15 Lf дифтерийного анатоксина, 5 ЕС (Lf) столбнячного анатоксина и 10 млрд клеток инактивированных коклюшных бактерий. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

Испытания

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергируемый при встряхивании, и прозрачную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должна обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия дифтерийного и столбнячного токсинов и коклюшных микробов. Определение проводят методами летального заражения, изложенными в [разделе](#) "Специфическая активность" ОФС "Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина", ОФС "Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина" и ОФС "Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин". В нормативной

документации производителя могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве дифтерийного и столбнячного анатоксинов, а также коклюшного компонента, обладающих антигенной активностью.

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

Размер частиц (дисперсность). Должна свободно проходить в шприц через иглу N 0840, если нет других указаний в нормативной документации производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС "Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения".

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС "Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения".

pH. От 6,8 до 7,4, если в нормативной документации производителя нет иных указаний. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенной АКДС-вакциной в соответствии с ОФС "Ионометрия".

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытание проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС "Стерильность". Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30-35 и 20-25°C.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС "Аномальная токсичность". Белым мышам массой 14-16 г препарат вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл, морским свинкам - подкожно по 3 мл (по 1,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должны наблюдаться гибель животных и потеря массы тела.

Специфическая безопасность. Должна быть безопасной (дифтерийный и столбнячный компоненты) при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250-350 г 6 прививочных доз для человека (суммарно в бок и лапку). Через 30 дней все животные должны остаться живыми без симптомов столбняка, дифтерийной интоксикации и потери массы тела. В случае гибели 1 из животных или потери массы тела от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более 1 животного, лекарственный препарат признают не соответствующим требованиям.

Специфическую безопасность коклюшного компонента оценивают аналогично методу, описанному для определения специфической безопасности коклюшной суспензии.

Специфическая (иммуногенная) активность. Специфическая активность 1 мл вакцины должна быть не менее 8 международных единиц (МЕ) для коклюшного (нижний предел значения доверительного интервала ($P = 0,95$) не менее 4 МЕ/мл), 60 МЕ для дифтерийного и 120 МЕ для столбнячного компонентов. Специфическую активность дифтерийного и столбнячного анатоксинов, входящих в состав вакцины, определяют по устойчивости иммунизированных животных к заражению соответствующими токсинами в соответствии с ОФС "Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина" и ОФС "Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина". Специфическую активность коклюшного компонента вакцины определяют на модели экспериментального менингоэнцефалита при внутримозговом введении иммунизированным мышам заражающей дозы тест-штамма *Bordetella pertussis* в соответствии с ОФС "Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин".

Специфическую активность дифтерийного и столбнячного компонентов возможно оценивать по титру соответствующих антител в сыворотке крови иммунизированных животных в тестах с параллельным использованием стандартных образцов, калиброванных в МЕ.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного дифтерийного анатоксина не должно превышать 1 Lf, неадсорбированного столбнячного анатоксина - 0,1 ЕС/Lf, если в нормативной документации нет иных указаний. Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов в надосадочной жидкости АКДС-вакцины. Определение содержания неадсорбированного

дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости проводят в соответствии с ОФС "Определение концентрации анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции", неадсорбированного столбнячного анатоксина в соответствии с ОФС "Определение концентрации анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания".

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС "Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах".

Производственные штаммы микроорганизмов. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости - дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Консерванты (при наличии). Концентрация антимикробных консервантов должна быть не ниже минимально эффективной и не превышать указанную на этикетке более чем на 15%. В качестве консерванта используют тиомерсал. Определение проводят колориметрическим или атомно-абсорбционным методом в соответствии с ОФС "Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах". Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия (III), если в нормативной документации производителя нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС "Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах".

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

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС "Имунобиологические лекарственные препараты". На первичную упаковку наносят дополнительное указание "Встряхивать!". На вторичную потребительскую упаковку наносят дополнительные указания "Перед употреблением встряхивать", "Замораживание не допускается",

Транспортирование и хранение. Транспортирование и хранение при температуре от 2 до 8°C.