

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину дизентерийную против шигелл Зонне полисахаридную, представляющую собой раствор полисахарида, извлечённого из культуры *Shigella sonnei*, очищенного ферментативными и физико-химическими методами.

Технология получения вакцины дизентерийной против шигелл Зонне полисахаридной предусматривает культивирование производственного штамма в жидкой синтетической питательной среде, выделение из полученной биомассы неочищенного полисахарида, лиофилизацию неочищенного полисахарида, его очистку, лиофилизацию очищенного полисахарида.

Производственный штамм *Shigella sonnei* должен отвечать следующим требованиям:

- на плотной питательной среде должен образовывать круглые выпуклые колонии с ровными краями (S-формы);
- в мазках, окрашенных по Граму, должны обнаруживаться грамтрицательные палочки;
- не должен ферментировать сорбит, дульцит, глюкозу и сахарозу;
- не должен образовывать индол;
- должен расщеплять ксилозу, арабинозу, рамнозу, лактозу;
- не должен образовывать сероводород;
- вирулентность штамма при внутрибрюшинном заражении белых беспородных мышей (LD_{50}) должна быть не выше 50 млн микробных клеток;
- должен давать положительную кератоконъюнктивальную пробу на морских свинках.

Производство

Технология получения вакцины дизентерийной против шигелл Зонне полисахаридной предусматривает культивирование производственного штамма в жидкой синтетической питательной среде; получение биомассы и ее дезактивацию; выделение из полученной биомассы неочищенного полисахарида (ПС); лиофилизацию неочищенного ПС и его очистку, лиофилизацию очищенного ПС и получение готовой формы препарата с соблюдением установленных требований правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека.

На этапе культивирования используют синтетическую питательную среду. Полученную биомассу контролируют на бактериологическую чистоту и типичность морфологии. Инактивацию проводят формалином с массовой долей формальдегида не менее $(37,0 \pm 0,5)\%$, до конечной концентрации 0,5%. Контроль инактивации проводят методом посева на мясопептонный агар (МПА) и среду Эндо.

Полученную инактивированную культуральную жидкость центрифугируют, раствор неочищенного ПС подвергают диализу. ПС лиофилизируют, в полученном препарате ПС исследуют О-специфическую активность.

Этап очистки ПС предусматривает очистку от нуклеиновых кислот, балластных белков и диализ. Лиофильно высушенный препарат очищенного ПС - субстанция для приготовления готовой формы препарата. На стадии производства субстанцию испытывают по следующим показателям.

Описание. Белый аморфный порошок.

Подлинность. 0,01% раствор субстанции образует 1 линию преципитации с сывороткой кроличьей против ПС *Shigella sonnei*. Определение проводят в реакции преципитации в геле по Оухтерлони с сывороткой кроличьей против ПС *S. sonnei* ("[Подлинность](#)" в разделе "Испытания готового продукта").

Белок. Не более 2,0%. Испытания проводят по методу Бредфорда без предварительного осаждения белка в соответствии с ОФС "Определение белка". Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5 мг/мл лиофилизата в объеме растворителя.

Нуклеиновые кислоты. Не более 2,0%. Испытания проводят в соответствии с ОФС "Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах". Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1 мг/мл ПС в объеме растворителя.

Молекулярные параметры. Не менее 50% ПС должно элюироваться в объеме до $K_d = 0,5$. Определение проводят методом гель-фильтрации ("[Молекулярные параметры](#)" в разделе "Испытания готового продукта").

Специфическая активность. 0,01% раствор субстанции должен тормозить реакцию пассивной гемагглютинации с сывороткой диагностической к шигеллам Зонне неадсорбированной в концентрации не выше 6,25 мкг/мл; при отсутствии торможения с сывороткой диагностической к шигеллам Флекснера неадсорбированной в концентрации менее 25 мкг/мл ("[Специфическая активность](#)" в разделе "Испытания готового продукта").

Пирогенность. Субстанция должна быть апиrogenной. Испытания проводят в соответствии с ОФС "Пирогенность". Тест-доза 0,050 мкг/мл в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида на 1 кг массы животного.

Аномальная токсичность. Субстанция должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС "Аномальная токсичность". Готовят раствор субстанции в концентрации 100 мкг в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Тест-доза для морских свинок - 1 мл испытуемого раствора подкожно, для мышей - 0,5 мл испытуемого раствора внутривенно.

Испытания

Описание. Бесцветная прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с запахом фенола. Определение проводят органолептически.

Подлинность. Вакцина должна образовывать 1 линию преципитации с сывороткой кроличьей против ПС *S. sonnei*. Приготовление сыворотки указывается в нормативной документации производителя. Определение проводят в реакции преципитации в геле по Оухтерлони.

Для постановки реакции пластиковую или стеклянную пластины размером 8,5 на 9,5 см заливают гелем агарозы по 12 мл на 1 пластину. В застывшем слое геля с помощью пробойника и специального трафарета делают лунки: одну центральную, остальные - на периферии. Диаметр лунок 0,4 см, расстояние между ними 0,4 см. В центральную лунку вносят по 15 мкл раствора сыворотки кроличьей против ПС *S. sonnei* (титр 1:800), в периферические - 15 мкл испытуемой вакцины. Затем пластину помещают во влажную камеру на 24-48 ч. Вакцину считают подлинной, если она дает 1 линию преципитации с сывороткой кроличьей против ПС *S. sonnei*.

Прозрачность. Прозрачная или опалесцирующая не более эталона 1 жидкость. Испытания проводят в соответствии с ОФС "Прозрачность и степень мутности жидкостей".

Цветность. Бесцветная жидкость. Испытания проводят визуально 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 6,7 до 7,3. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС "Ионометрия".

Молекулярные параметры. Не менее 50% ПС должно элюироваться в объеме до коэффициента распределения $K_d = 0,5$. Определение проводят валидированным методом гель-фильтрации с использованием сефарозы. Через колонку длиной около 0,4 м с внутренним диаметром 9 мм, уравновешенную 0,2 М раствором натрия хлорида, пропускают около 0,9 мг ПС в объеме 0,5 мл раствора 0,2 М натрия хлорида и элюируют со скоростью около 14 мл/ч. Фракции регистрируют при помощи ультрафиолетового детектора при длине волны 206 нм. Выход ПС оценивают по площади пиков до и после $K_d = 0,5$.

Калибрование колонки. Определяют полный (V_t) и свободный (V_o) объемы колонки с помощью калибровочных растворов - голубого декстрана в натрия азида в условиях, описанных выше.

Вычисление объема колонки V_e , соответствующего $K_d = 0,5$, проводят по формуле:

$$V_e = V_o \pm 0,5(V_t - V_o)$$

где: V_o - свободный объем колонки (объем элюции голубого декстрана), мл;

V_t - общий объем колонки с гелем (объем элюции натрия азида), мл;

0,5 - значение коэффициента распределения вещества (K_d) на колонке.

Пересчитывают значение V_e в мм находят на хроматограмме и рассчитывают по формуле:

$$V_e(\text{мм}) = \frac{V_e(\text{мл}) \cdot V_t(\text{мм})}{V_t(\text{мл})}$$

Пики, элюирующиеся до и после $K_d = 0,5$ (значение V_e на хроматограмме, мм), интегрируют вручную.

Содержание ПС (А) в субстанции вакцины, элюировавшегося до $K_d = 0,5$, выраженное в процентах, определяют по формуле:

$$A = \frac{S_1}{S_1 + S_2} \cdot 100\%$$

где: S_1 - площадь пика, элюировавшегося до $K_d = 0,5$;

S_2 - суммарная площадь пиков, элюировавшихся до и после $K_d = 0,5$.

Примечания.

1. Приготовление испытуемого раствора. Растворяют $(0,9 \pm 0,050)$ мг субстанции в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида. Полученный раствор перемешивают на шейкере в течение 2 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

2. Растворы для калибровки хроматографической колонки.

А. Приготовление 0,1% раствора натрия азида. Растворяют 1 мг натрия азида в 1 мл 0,2 М раствора натрия хлорида и перемешивают на шейкере в течение 1 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Б. Приготовление 0,1% раствора голубого декстрана. Растворяют 0,5 мг голубого декстрана в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида. Полученный раствор перемешивают на шейкере в течение 1 мин. Добавляют в полученный раствор голубого декстрана 40 мкл 0,1% раствора натрия азида и быстро перемешивают на шейкере. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

В. Приготовление 0,2 М раствора натрия хлорида. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 500 мл воды очищенной, прибавляют 11,7 г натрия хлорида, доводят до метки водой очищенной и перемешивают на магнитной мешалке в течение 5 мин. Раствор хранят при температуре 4-8°C в течение 1 мес.

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

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС "Стерильность".

Пирогенность. Должна быть апиrogenной. Испытания проводят в соответствии с ОФС "Пирогенность". Вакцину разводят апиrogenным 0,9% раствором натрия хлорида так, чтобы 1 мл раствора содержал по 0,050 мкг ПС и вводят кроликам из расчета 1 мл раствора вакцины (0,050 мкг) на 1 кг массы животного.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС "Аномальная токсичность". Морским свинкам вводят подкожно тест-дозу вакцины в объеме 1 мл, мышам - внутривентриально тест-дозу 0,5 мл. Наблюдение за животными осуществляется ежедневно в течение 7 сут.

Специфическая активность. Вакцина должна тормозить реакцию пассивной гемагглютинации (РТПГА) с сывороткой диагностической к шигеллам Зонне неадсорбированной в концентрации не более 6,25 мкг/мл при отсутствии торможения с сывороткой диагностической к шигеллам Флекснера неадсорбированной в концентрации менее 25 мкг/мл. Оценивается в реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА).

Ингредиенты для проведения РТПГА: сыворотки диагностические к шигеллам Зонне и Флекснера неадсорбированные, диагностикум эригрозитарный шигеллезный Зонне и Флекснера антигенный, испытуемая серия вакцины Шигелвак, стандартный образец (СО) содержания ПС.

Определение рабочего разведения шигеллезных диагностических сывороток. Рабочее разведение определяют в реакции пассивной гемагглютинации. Для постановки реакции готовят двукратные разведения сывороток в 0,9% растворе натрия хлорида в объеме 100 мкл, начиная с разведения сывороток 1:10, в полистироловых круглодонных планшетах. В каждую из лунок прибавляют по 25 мкл соответствующего диагностикума. Планшеты встряхивают и оставляют на 1,5-2 ч при комнатной температуре.

Контролями являются:

1) проверка отсутствия спонтанной агглютинации диагностикума. В 2 лунки, содержащие по 50 мкл 0,9% раствора натрия хлорида, прибавляют по 25 мкл диагностикума;

2) проверка на отсутствие в испытуемой сыворотке агглютининов к эритроцитам барана. В 2 лунки планшета вносят по 50 мкл сыворотки в разведении 1:10 и прибавляют по 25 мкл 1% взвеси несенсибилизированных формализированных эритроцитов барана (контрольные эритроциты).

Учет реакции производится по "четырёхкрестовой" системе. Титром антител испытуемой сыворотки считается последнее разведение сыворотки, при котором наблюдается агглютинация эритроцитов интенсивностью не менее чем на 3+ (+++), когда агглютинированы почти все эритроциты, и на их фоне определяется малозаметное кольцо из осевших неагглютинированных эритроцитов ("зонтик").

Рабочее разведение сыворотки для последующего использования в РТПГА берут на 4 разведения концентрированнее, чем исследуемый титр.

Для постановки РТПГА готовят двукратные разведения СО полисахарида и серии вакцины в 0,9% растворе натрия хлорида в объеме 50 мкл, начиная с 100 мкг/мл ПС, в полистироловых планшетах. В каждую из лунок вносят 25 мкл сыворотки в рабочем разведении и прибавляют по 25 мкл диагностикума. Планшеты встряхивают и оставляют на 1,5-2 ч при комнатной температуре.

Учет результатов. Минимальная концентрация ПС, тормозящая гемагглютинацию (положительная РТПГА), должна быть не более 6,25 мкг/мл (наблюдается ярко выраженный осадок неагглютинированных эритроцитов).

Для неспецифических систем (при использовании сыворотки диагностической к шигеллам Флекснера) наблюдается отсутствие торможения в концентрации менее 25 мкг/мл.

Если полученные результаты не удовлетворяют этим условиям, или вакцина обладает неспецифической активностью, контроль повторяют. Если и при повторном контроле обнаруживают те же результаты, серию вакцины бракуют.

Фенол. Не более 0.75 мг/доза. Испытания проводят в соответствии с ОФС "Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в иммунобиологических лекарственных препаратах".

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС "Иммунобиологические лекарственные препараты".

На вторичную упаковку наносится предупредительная надпись: "Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений".

Транспортирование. При температуре от 2 до 25°C, допускается транспортирование при температуре 35°C не более 14 сут.

Хранение. При температуре от 2 до 8°C.