

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую, суспензию для подкожного введения, представляющую собой смесь инактивированных формальдегидом концентрированных культур лептоспир 4 серогрупп (*Leptospira interrogans icterohaemorrhagiae copenhageni*, *L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa*, *L. interrogans Pomona mozdoc*, *L. interrogans Sejroe sejroe*).

Вакцина предназначена для профилактики лептоспироза и вызывает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

Производство

Все этапы производства вакцины должны гарантировать соблюдение установленных надлежащих правил, а также качество лекарственного препарата, гарантирующее его безопасность для человека.

Технология производства вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой предусматривает приготовление питательной среды Терских с кроличьей сывороткой, приготовление полусинтетической среды с альбумином сыворотки крови человека; высеивание на питательную среду и накопление концентрированной микробной массы штаммов 4 серогрупп лептоспир; сведение стандартизированной микробной массы в вакцину; розлив и упаковку препарата. Производственные штаммы лептоспир должны расти на питательной среде Терских с кроличьей сывороткой и полусинтетической питательной среде с альбумином сыворотки крови человека; быть подвижными; обладать типичными культуральными, морфологическими и антигенными свойствами; быть специфичными в реакции микроагглютинации (РМА) с иммунной сывороткой и иммуногенными для золотистых хомячков.

В качестве консерванта используется формальдегид.

На стадиях производства вакцины проводят определение роста лептоспир, чистоты культуры, подвижности лептоспир, концентрации микробной массы, подлинности, стерильности, специфической стерильности, безвредности, токсичности, специфической активности и содержания формалина.

Испытания

Описание. Бесцветная слегка опалесцирующая жидкость с осадком, легко разбивающимся при встряхивании.

Подлинность. Вакцина должна вызывать у золотистых хомячков образование специфических антител, выявляемых в РМА со штаммами лептоспир 4 серогрупп (*L. interrogans icterohaemorrhagiae copenhageni*, *L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa*, *L. interrogans Pomona mozdoc*, *L. interrogans Sejroe sejroe*) в титре не менее чем 1:100.

Методика проведения испытания описана в [разделе](#) "Специфическая активность".

Прозрачность. Показатель оптической плотности препарата должен быть не менее 0,03. Определение проводят фотометрическим методом. Испытуемый образец тщательно перемешивают, помещают в кювету с толщиной слоя 3 мм и измеряют оптическую плотность при длине волны 315 нм по сравнению с водой очищенной.

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

pH. От 7,2 до 7,6. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС "Ионометрия". Для испытания используют содержимое 5 образцов.

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

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС "Лекарственные формы для парентерального применения".

Размер частиц. Должна свободно проходить в шприц через иглу N 0840. Определение проводят в соответствии с ОФС "Лекарственные формы для парентерального применения".

Формальдегид. Не более 0,03%. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС "Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах".

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

Специфическая стерильность. Не должна содержать живых лептоспир. Определение проводят путем высева по 0,2 мл вакцины в 3 бактериологические пробирки с 7 мл фосфатно-сывороточной среды Терских.

Состав среды Терских (на 1 л):

- натрий фосфорнокислый двузамещенный - 0,85 г;
- калий фосфорнокислый однозамещенный - 0,25 г;
- вода очищенная - 950 мл;
- сыворотка крови кролика нормальная инактивированная - 50 мл.

Пробирки с посевами инкубируют при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 сут. Затем делают из выделенных культур мазки по методике, указанной в [разделе](#) "Специфическая безопасность".

Просматривают не менее 30 полей зрения в темном поле микроскопа при увеличении 200x. В посевах не должны обнаруживаться живые (подвижные) лептоспиры. При обнаружении живых лептоспир хотя бы в 1 посевах препарат считают не выдержавшим испытание.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Вакцину вводят животным по 0,5 мл: белым мышам внутрибрюшинно, морским свинкам - подкожно. Определение проводят в соответствии с ОФС "Аномальная токсичность".

Специфическая безопасность. Должна быть безопасной, не содержать живых лептоспир.

Для проведения испытания используют золотистых хомячков массой (22 ± 3) г. Трех животным однократно внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл вакцины. Наблюдение за животными ведут в течение 20 сут. К концу срока хомячков обескровливают декапитацией. Кровь используют для получения иммунной сыворотки и исследования ее в РМА при определении специфической активности вакцины. После обескровливания животных проводят их вскрытие и затем пастеровской пипеткой делают посев коркового слоя почек в бактериологические пробирки со средой Терских.

Вскрытие животных и забор материала для посева проводят при строгом соблюдении правил асептики. Посевы инкубируют в течение 7 сут. в термостате при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$. Затем отбирают 0,02 мл микробной взвеси и просматривают не менее 30 полей зрения в темном поле микроскопа при увеличении 200x. При обнаружении роста лептоспир хотя бы в 1 посевах вакцину считают не выдержавшей испытание.

Специфическая активность. Препарат должен обладать специфической иммуногенной активностью - вызывать у золотистых хомячков образование специфических антител, выявляемых в РМА со штаммами лептоспир 4 серогрупп в титре не менее, чем 1:100; защищать не менее 3 из 4 животных от заражения вирулентной культурой *L. interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni*. Трех золотистым хомячкам массой (22 ± 3) г однократно внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл вакцины. Через 20 сут. после иммунизации животных обескровливают декапитацией. Кровь собирают во флаконы (пробирки) и инкубируют в термостате в течение 30-40 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, затем выдерживают в холодильнике при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч. Полученную иммунную сыворотку отбирают в стерильные пробирки и исследуют в РМА для выявления специфических антител к штаммам лептоспир 4 серогрупп, входящих в состав вакцины.

Проведение РМА. РМА ставят в лунках полистиролового планшета. В лунки с А1 по А4 вносят по 0,2 мл анализируемой сыворотки, разведенной 1:25 0,9% раствором натрия хлорида. В лунки с В1-В4 по F1-F4 вносят по 0,1 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Разведение сыворотки осуществляют автоматической пипеткой в направлении лунок от А к F (в вертикальном ряду), перенося по 0,1 мл каждого разведения в следующую в ряду лунку, получая таким образом разведения сыворотки с 1:25 до 1:800.

В качестве антигенов используют 7-12-суточные культуры лептоспир 4 серогрупп (*L. interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni*, *L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa*, *L. interrogans Pomona mozdoc*, *L. interrogans Sejroe sejroe*), выращенные на среде Терских. При нанесении 0,02 мл культуры каждой серогруппы на предметное стекло количество лептоспир должно быть не менее 100-150 клеток в поле зрения микроскопа при увеличении $200\times$.

После разведения сыворотки в каждый ряд лунок от А1 до F1, от А2 до F2, от А3 до F3 и от А4 до F4 вносят по 0,1 мл культуры лептоспир соответствующей серогруппы. После добавления антигенов получают разведение сывороток от 1:50 до 1:1600 в каждом вертикальном ряду. Одновременно проводят контроль культур: в 4 лунки (Н1, Н2, Н3, Н4) вносят по 0,1 мл 0,9% раствора натрия хлорида и по 0,1 мл живой культуры лептоспир каждой серогруппы в отдельности.

Планшет выдерживают в течение 1 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Из лунок планшета с определенной серогруппой отбирают по 0,02 мл смеси сыворотки и культуры лептоспир, наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и микроскопируют в темном поле зрения при увеличении $200\times$.

Результаты реакции оценивают по условной "трехкрестовой системе":

- + - 1/3 лептоспир агглютинированы;
- ++ - от 1/3 до 2/3 лептоспир агглютинированы;
- +++ - более 2/3 или все лептоспиры агглютинированы;

контроль - агглютинация отсутствует, все клетки лептоспир находятся в свободном состоянии и полностью подвижны.

Положительной РМА с живыми культурами лептоспир 4 серогрупп считается реакция не менее чем на "+",

Тест активной защиты. Четырём золотистым хомячкам массой (22 ± 3) г однократно внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл вакцины. Через 20 сут. 4 иммунизированных и 4 неиммунизированных (контрольных) животных заражают внутрибрюшинно вирулентной культурой *L. interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni* с содержанием 100-150 лептоспир в поле зрения микроскопа ($200\times$) в объеме 1 мл. Наблюдение за животными ведут в течение 7 сут.

В контрольной группе не менее 3 животных должны заболеть или погибнуть. 3 из 4 иммунизированных и зараженных животных не должны заболеть или погибнуть. Если выживают и гибнут менее 3 иммунизированных и зараженных животных соответственно, испытание повторяют. При получении аналогичных результатов вакцину считают не выдержавшей испытание.

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

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

