

Аттестация и продление срока годности новой серии отраслевого стандартного образца специфической активности и иммуногенности вакцины туляремийной живой

И.В. Касина¹, А.А. Горяев¹, Л.И. Ращепкин², О.В. Фадейкина¹, Т.И. Немировская¹,
О.Б. Устинникова¹, О.А. Лобовикова³, С.А. Алексеева¹, Р.А. Волкова¹, А.А. Мовсесянц¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

²Федеральное казенное учреждение здравоохранения МСЧ-64 ФСИН России, Саратов, Россия

³Федеральное казенное учреждение здравоохранения Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Certification and shelf-life extension of a new batch of the branch reference standard for live tularemic vaccine's specific activity and immunogenicity

I.V. Kasina¹, A.A. Goryaev¹, L.I. Rashchepkin², O.V. Fadeykina¹, T.I. Nemirovskaya¹,
O.B. Ustinnikova¹, O.A. Lobovikova³, S.A. Alekseeva¹, R.A. Volkova¹, A.A. Movsesyants¹

¹Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

²Federal State Health Agency Health Service № 64 of the Federal Penitentiary Service of Russia, Saratov, Russia

³Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Saratov, Russia

В статье представлены результаты по изучению новой серии кандидата в отраслевой стандартный образец вакцины туляремийной живой (ОСО вакцины). В качестве кандидата в ОСО вакцины, использовали коммерческую серию препарата, удовлетворяющую требованиям фармакопейной статьи предприятия (ФСП) по всем показателям качества, предъявляемым к вакцине туляремийной живой. Кандидат в ОСО вакцины аттестован по показателю специфическая активность, включающей в себя комплекс показателей: концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток, степень диссоциации (процент SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших), а также иммуногенность. На основании анализа результатов применения и оценки показателей качества данной серии ОСО вакцины продлен срок годности ОСО на 6 мес.

Ключевые слова: отраслевой стандартный образец (ОСО); вакцина туляремийная живая; фармакопейная статья предприятия (ФСП); специфическая активность; концентрация микробных клеток; процент живых микробных клеток; степень диссоциации (процент SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших); иммуногенность; Dosis certa letalis (Dcl); термостабильность.

Библиографическое описание: Касина ИВ, Горяев АА, Ращепкин ЛИ, Фадейкина ОВ, Немировская ТИ, Устинникова ОБ, Лобовикова ОА, Алексеева СА, Волкова РА, Мовсесянц АА. Аттестация и продление срока годности новой серии отраслевого стандартного образца специфической активности и иммуногенности вакцины туляремийной живой. Биопрепараты 2015; (4): 32–38.

The article presents the results obtained in the study of a new batch of a candidate branch reference standard for live tularemic vaccine (vaccine BRS). The candidate vaccine BRS was represented by a commercial batch of a product that met all applicable requirements of the manufacturer's monograph (MM) for live tularemic vaccine's quality attributes. The candidate vaccine BRS was certified for specific activity including a range of parameters, such as: microbial cells concentration, percentage of living microbial cells, dissociation degree (percent of SR (white) immunogenic colonies from the total number of colonies grown), as well as immunogenicity. Results of analysis that addressed the use of this batch of vaccine BRS and its quality attributes made it possible to extend the shelf-life of the product for 6 months.

Key words: branch reference standard (BRS); live tularemic vaccine; manufacturer's monograph (MM); specific activity; microbial cells concentration; percentage of living microbial cells; dissociation degree (percent of SR (white) immunogenic colonies from the total number of colonies grown); immunogenicity; Dosis certa letalis (Dcl); thermal stability.

Bibliographic description: Kasina IV, Goryaev AA, Rashchepkin LI, Fadeykina OV, Nemirovskaya TI, Ustinnikova OB, Lobovikova OA, Alekseeva SA, Volkova RA, Movsesyants AA. Certification and shelf-life extension of a new batch of the branch reference standard for live tularemic vaccine's specific activity and immunogenicity. Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (4): 32–38.

Одним из важнейших элементов обеспечения качества лекарственных средств (ЛС) являются стандартные образцы. При производстве и контроле качества иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) применяют отраслевые стандартные образцы (ОСО) [1–4].

Одной из задач стандартизации методов контроля ИЛП является использование стандартных образцов, предназначенных для оценки показателей качества, характеризующих биологические и физико-химические свойства препарата и его компонентов [5]. В условиях отсутствия Международных стандартных образцов для оценки профилактических препаратов против опасных инфекционных заболеваний ОСО служат средством для оценки стабильности и приемлемости результатов испытаний [6].

В Испытательном центре экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России ежегодно проводится экспертиза качества от 10 до 60 серий живой туляреминой вакцины, представляющей собой вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, лиофилизированный в стабилизирующей среде [7–9]. В соответствии с требованиями фармакопейной статьи предприятия (ФСП) при проведении испытания специфической активности коммерческих серий туляреминой вакцины для оценки приемлемости полученных результатов необходимо использование ОСО вакцины [10]. Срок годности предыдущей серии ОСО закончился. Международного стандартного образца вакцины туляреминой не существует, поэтому аттестация новой серии отраслевого стандартного образца имеет высокую практическую значимость.

Одним из основных показателей качества туляреминой вакцины является «Специфическая активность», представляющая собой комплекс показателей: концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток и степень диссоциации (процентом SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших). По результатам оценки специфической активности (процент живых микробных клеток) определяют количество накожных и внутрикожных доз в укупорке препарата для введения людям.

При установлении аттестованного значения стандартного образца необходимо оценивать его неопределенность. Понятие неопределенности показывает, что значение измеряемой величины с определенной вероятностью находится в установленном интервале [11].

Для обеспечения объективной оценки значения аттестуемой характеристики в случае отсутствия Международного стандартного образца современными международными и отечественными документами в области разработки стандартных образцов рекомендуется проведение межлабораторной аттестации с использованием 2–3 операторов [12–14].

Целью настоящей работы является аттестация новой серии ОСО специфической активности и иммуногенности вакцины туляреминой живой, назначение которого контроль правильности проведения испытаний препарата по показателям: концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток, процент иммуногенных колоний от общего количества выросших и иммуногенность.

Материалы и методы

В качестве кандидата в ОСО была выбрана вакцина серии О2 производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России.

Указанная серия кандидата в ОСО была испытана в соответствии с действующей ФСП РН002348/01-010212 на вакцину туляремию живую.

Испытание специфической активности кандидата в ОСО вакцины по показателям «Концентрация микробных клеток», «Процент живых микробных клеток» и «Степень диссоциации (процент SR (белых) иммуногенных колоний, от общего количества выросших)» проводили три оператора. Каждый оператор проводил оценку показателей на 5 образцах. Для приготовления 1 образца использовали две ампулы.

Аттестацию кандидата в ОСО по показателю «Специфическая активность: концентрация микробных клеток» проводили визуальным методом с использованием стандартного образца мутности ОСО 42-28-85-2013 (10 МЕ). Концентрацию микробных клеток (K) рассчитывали по формуле, указанной в ФСП РН002348/01-010212:

$$K = \frac{(0,5 + V) \times 5 \times 10^9}{0,5},$$

где: V – объем 0,9% раствора натрия хлорида, взятого на разведение пробы до 10 МЕ, мл;

0,5 – объем испытуемого образца, мл;

5×10^9 м.к./мл – значение общей концентрации туляреминого микроба, соответствующий ОСО мутности (10 МЕ).

При аттестации кандидата в ОСО по показателю «Специфическая активность: процент живых микробных клеток и степень диссоциации (процент SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших)» использовали коммерческую питательную среду для культивирования и выделения туляреминого микроба (FT-агар) производства ФБУН ГНЦ ПМБ (г. Оболонск), предусмотренную требованиями ФСП на препарат.

Определение количества живых микробных клеток в ОСО вакцины проводили на тех же образцах, в которых определяли концентрацию микробных клеток. Для этого полученные микробные взвеси образцов кандидата в ОСО вакцины развели десятикратно от 10^{-1} до 10^{-7} и из последнего разведения высевали по 0,1 мл микробной взвеси на 3 чашки Петри с FT-агаром.

За количество живых микробных клеток в образце принимали среднее количество выросших колоний на трех чашках Петри. Полученную величину умножали на степень разведения культуры (10^{-7}) и увеличивали в 10 раз (для контроля используют 0,1 мл вакцины), получая количество живых микробных клеток, содержащихся в 1 мл вакцины.

Содержание живых микробных клеток (ЖМК) в процентах рассчитывали по формуле:

$$ЖМК = \frac{БК}{ОК} \times 100\%,$$

где: БК – количество живых микробных клеток в 1 мл;

ОК – общая концентрация микробных клеток.

Испытания по показателю «Иммуногенность» были проведены по ФСП РН002348/01-010212 на 13 морских свинках на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в Саратове, так как в опыте используется штамм *F. tularensis* 503/806, относящийся ко II группе патогенности.

Испытание кандидата в ОСО вакцины по показателю «Термостабильность» проводили два оператора по мето-

дике, изложенной в ФСП [10]. Показатель термостабильности – это срок в сутках, в течение которого в препарате сохраняется 50% живых микробных клеток от первоначального количества после хранения образцов вакцины при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 14 сут. Каждый исполнитель проводил оценку 5 образцов. Показатель термостабильности (t) в сут рассчитывали по формуле, указанной в ФСП РН002348/01-010212:

$$t = \frac{0,3 \times 14}{\lg A_0 - \lg A_n},$$

где $\lg A_0$ – логарифм первоначального количества живых м.к./мл;

$\lg A_n$ – логарифм количества живых м.к./мл через 14 сут хранения вакцины при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

0,3 – постоянная величина;

14 – срок хранения вакцины при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, сут.

Неопределенности значений аттестованных характеристик специфической активности кандидата в ОСО вакцины установлены для доверительной вероятности 0,95 (коэффициент охвата $k=2$). Значение неопределенности (u) рассчитывали по формуле $u=2S$, где S – стандартное (среднеквадратическое) отклонение результатов испытаний по установлению значения специфической активности [15, 16].

Статистическая обработка результатов была выполнена с помощью программы Microsoft Office Excel.

Результаты и обсуждение

Аттестация стандартного образца предполагает проведение работ по исследованию показателей ОСО (специфическая активность, описание, подлинность, время растворения, время седиментационной устойчивости, размер частиц, вакуум, герметизация, отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов, специфическая безопасность, прививаемость) в соответствии с ФСП на вакцину туляремийную, а также по определению значения аттестуемой характеристики и оценке его неопределенности.

Испытания серии вакцины кандидата в ОСО по показателям качества «Описание», «Подлинность», «Время растворения», «рН», «Время седиментационной устойчивости», «Размер частиц», «Вакуум, герметизация», «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов», «Специфическая безопасность», «Прививаемость» показали, что данная серия соответствовала требованиям ФСП. Оценивали также такие показатели, как «Точность розлива» и «Потеря в массе при высушивании». Показана приемлемая точность розлива препарата: при среднем значении массы материала-кандидата в ОСО в ампулах 83,8 мг, стандартное отклонение от средней массы – 2,5 мг. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах составил 2,97%, при норме не более 4%. Исследование кандидата в ОСО вакцины по показателю «Потеря в массе при высушивании» показало, что величина данного показателя составила $(1,59 \pm 0,11)\%$, при норме не более 3%. Данные значения соответствовали требованиям, предъявляемым к ОСО вакцины (табл. 1).

Таблица 1. Результаты определения дополнительных биологических и физико-химических показателей кандидата в ОСО вакцины туляремийной живой при аттестации, а также при продлении срока годности

Наименование показателя (с указанием метода)	Требования к ОСО вакцины туляремийной живой	Результаты испытания	
		лаборатория бактериальных вакцин	отдел биологического и технологи- ческого контроля (ОБТК) (производитель)
Описание (визуальный)	Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета	Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета	Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета
Подлинность (иммунофлуоресцентный)	В мазках должны присутствовать только клетки вакцинного штамма <i>Francisella tularensis</i>	В мазках присутствуют только клет- ки вакцинного штамма <i>Francisella tularensis</i>	В мазках присутствуют только клет- ки вакцинного штамма <i>Francisella tularensis</i>
Время растворения (визуальный)	Не более 3 мин Растворенный препарат – однородная мутная суспензия белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев	1 мин Растворенный препарат – однородная мутная суспензия белого с желтова- тым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка и хлопьев	Растворенный препарат – однородная мутная суспензия белого с желтова- тым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка и хлопьев
рН (потенциометрический)	От 6,8 до 7,2	6,9	6,8
Время седиментационной устойчивости (визуальный)	Не менее 5 мин	Суспензия не расслаивается в тече- ние 5 мин	Суспензия не расслаивается в тече- ние 5 мин
Размер частиц (визуальный)	Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840	Суспензия свободно проходит в шприц через иглу № 0840	Суспензия свободно проходит в шприц через иглу № 0840
Потеря в массе при высушивании (весовой)	Не более 3%	$(1,59 \pm 0,11)\%$	2,67%
Точность розлива (весовой)	Коэффициент вариации массы в ампулах должен быть не более 4%	2,97%	3,6%
Вакуум, герметизация (визуальный)	Ампулы должны быть герметичны	Ампулы герметичны	Ампулы герметичны
Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологический)	Не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов	Не содержит посторонних микроорганизмов и грибов	Не содержит посторонних микроорганизмов и грибов
Специфическая безопасность (биологический)	Должна быть безопасной и не вызывать гибель более одной морской свинки из трех	Безопасна. Не вызывает гибель трех морских свинок	Безопасна. Не вызывает гибель трех морских свинок
Прививаемость (биологический)	Должна вызывать у животных реакцию в виде инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм вокруг насечек через 2–5 сут	Соответствует. Гиперемия и инфильтрат диаметром от 10 до 12 мм через 5 сут	Соответствует. Гиперемия и инфильтрат диаметром от 10 до 12 мм через 5 сут
Термостабильность (микробиологический)	Не менее 7 сут	(9 ± 1) сут	7 сут

При аттестации кандидата в ОСО вакцины по показателю «Специфическая активность» (табл. 2) проводили оценку неопределенности полученных результатов. Испытание проводили в условиях промежуточной прецизионности (три оператора). Полученные данные во всех опытах показали высокую воспроизводимость. Разброс полученных данных как между образцами, так и между результатами, полученными разными операторами, не превысил 11%. Результаты аттестации представлены в таблице 2.

В результате аттестации кандидата в ОСО вакцины по показателю «Специфическая активность: концентрация микробных клеток», аттестованное значение составило $(1,5 \pm 0,2) \times 10^{10}$ м.к./мл при норме $(2 \pm 1) \times 10^{10}$ м.к./мл. Стандартное отклонение составило 0,1 м.к./мл, два стандартных отклонения – 0,2 м.к./мл. Метод определения концентрации визуальный, в связи с чем, возможны колебания результатов у разных операторов. Коэффициент вариации концентрации микробных клеток в испытываемых образцах не превысил 5%, что соответствует требованиям ФСП [10].

При испытании кандидата в ОСО вакцины по показателю «Специфическая активность: процент живых микробных клеток» одновременно проводили контроль ростовых свойств питательной среды. FT-агар по ростовым свойствам соответствовал требованиям ФСП: при посеве 100 м.к. обеспечивал рост вакцинного штамма *F. tularensis* от 60 до 80% от посевной дозы, а при посеве 10 м.к. – рост единичных (от 4 до 8) колоний.

В результате аттестации кандидата в ОСО вакцины по показателю «Специфическая активность: процент живых ми-

кробных клеток» количество живых микробных клеток составило $(8,1 \pm 1,9) \times 10^9$, что соответствует $(54,0 \pm 11,7)\%$ от общей концентрации микробных клеток при норме не менее 40%. Стандартное отклонение составило 5,9%, два стандартных отклонения – 11,7%.

Разброс значений количества живых микробных клеток среди образцов кандидата в ОСО вакцины составил 11,7%, что соответствовало допустимым изменениям количества живых микробных клеток в образцах кандидата в ОСО (не более 20%).

Испытания кандидата в ОСО вакцины туляремийной по показателю «Специфическая активность: степень диссоциации (процент SR (белых) иммуногенных колоний, от общего количества выросших)» также показали достаточную стабильность результатов определений. При норме не менее 80% SR (белых) иммуногенных колоний, результат кандидата в ОСО вакцины по этому показателю составил $(94,1 \pm 2,8)\%$.

Важным показателем качества вакцины является «Иммуногенность». В соответствии с требованиями ФСП, вакцина, привитая подкожно в дозе 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл, должна защищать от гибели не менее 8 из 10 морских свинок при заражении 1000 Dcl вирулентного штамма туляремийного микроба голарктической расы. 1 Dcl вирулентного штамма не должна превышать 5 м.к. Результаты данного испытания представлены в таблице 3. Испытания показали, что все морские свинки, привитые подкожно кандидатом в ОСО вакцины в дозе 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл, выжили после заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* 503/806 в дозе 1000 Dcl в течение 30 сут наблюдения. Все животные контрольной

Таблица 2. Результаты испытания кандидата в ОСО вакцины туляремийной живой по показателю «Специфическая активность (концентрация микробных клеток; процент живых микробных клеток; степень диссоциации (процент SR (белых) иммуногенных от общего количества выросших колоний))»

Фактор промежуточной прецизионности	Специфическая активность								
	Концентрация микробных клеток, $\times 10^{10}$ м.к./мл			Процент живых микробных клеток			Процент «белых» иммуногенных колоний		
	$\bar{X} \pm S, n=5$	$X_{cp} \pm 2S, n=15$	Норма	$\bar{X} \pm S, n=5$	$X_{cp} \pm 2S, n=15$	Норма	$\bar{X} \pm 2S, n=5$	$X_{cp} \pm 2S, n=15$	Норма
Оператор 1	1,44±0,1	1,5±0,2	2±1.	61±6	54,0±11,7	не менее 40 %	94,0±1,4	94,1±2,8	не менее 80 %
Оператор 2	1,44±0,1			49±6			93,8±7,1		
Оператор 3	1,56±0,1			53±4			94,7±2,0		
Примечание. $\bar{X}$ оп - среднее значение показателя, полученное оператором в каждом испытании; X_{cp} – среднее значение показателя по объединенной выборке; S – стандартное отклонение результатов испытаний.									

Таблица 3. Результаты испытания кандидата в ОСО вакцины туляремийной живой по показателю «Иммуногенность»

Группа животных (морские свинки)		Доза вакцины для иммунизации	Доза возбудителя туляремии, штамм 503/840	Результат*
Опытная группа животных (иммунизированные)	1	2×10 ⁷ живых м.к. в 0,1 мл, накожно	1000 Dcl (5000 м.к.), подкожно	10 из 10 морских свинок выжили в течение всего срока наблюдения (30 сут)
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
	8			
	9			
	10			
Контрольная группа животных (не иммунизированные)	1	-	1 Dcl (5 м.к.), подкожно	Все животные погибли от туляремии в течение 15 сут
	2	-		
	3	-		
*Норма: не менее 8 из 10 морских свинок, привитых накожно вакциной в дозе 2×10 ⁷ живых м.к. в 0,1 мл, должны быть защищены от гибели при подкожном заражении 100° Dcl вирулентного штамма <i>F. tularensis</i> 503/840.				

группы погибли от туляремии в срок до 15 сут при заражении 1 Dcl (5 м.к.) вирулентного штамма *F. tularensis* 503/806. Таким образом, кандидат в ОСО вакцины обеспечивает у животных формирование специфического иммунитета и защищает от туляремии в 100% случаев.

Кандидат в ОСО вакцины был изучен по показателю «Термостабильность». Определяли процент живых микробных клеток после выдерживания образцов при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 14 сут. В соответствии с ФСП, этот показатель должен быть не менее 7 сут. В результате проведенных исследований показатель термостабильности составил от 7,7 до 9,4 сут (в среднем – 9 сут, при двух стандартных отклонениях – 1 сут). Соответственно и разброс количества живых микробных клеток в образцах кандидата в ОСО вакцины после

хранения при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 14 сут был незначительным (таблица 4).

В результате проведенных исследований установлены аттестованные значения специфической активности ОСО вакцины туляреминой живой: по показателям «Концентрация микробных клеток» – $(1,5\pm 0,2)\times 10^{10}$ м.к./мл, «Процент живых микробных клеток» – $(54,0\pm 11,7)\%$, «Степень диссоциации (процент SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших)» и подтверждена высокая иммуногенная активность ОСО вакцины. Установлено значение ОСО вакцины туляреминой живой по показателю «Термостабильность» – (9 ± 1) сут.

Таким образом, результаты проведенных испытаний показали возможность использования данной серии вакцины ту-

Таблица 4. Результаты аттестации кандидата в ОСО вакцины туляреминой живой по показателю «Термостабильность»

№ образца и шифр оператора	Концентрация микробных клеток после хранения при температуре (37±1)°С в течение 14 сут	Среднее количество живых микробных клеток после хранения при температуре (37±1)°С в течение 14 сут	Процент живых микробных клеток после хранения при температуре (37±1)°С в течение 14 сут	Среднее количество живых микробных клеток (первоначальное)	Термостабильность, сут*
1А	1,3 ×10 ¹⁰	2,8×10 ⁹	21	(8,1±1,9)×10 ⁹	9,1
2А	1,3 ×10 ¹⁰	2,9 ×10 ⁹	22		9,4
3А	1,4 ×10 ¹⁰	2,9×10 ⁹	21		9,4
4А	1,3 ×10 ¹⁰	2,5×10 ⁹	19		8,2
5А	1,3 ×10 ¹⁰	2,3×10 ⁹	18		7,7
1Б	1,4 ×10 ¹⁰	2,7×10 ⁹	19		8,8
2Б	1,3 ×10 ¹⁰	2,8×10 ⁹	21		9,1
3Б	1,3 ×10 ¹⁰	2,8×10 ⁹	21		9,1
4Б	1,3 ×10 ¹⁰	2,9×10 ⁹	22		9,4
5Б	1,4 ×10 ¹⁰	2,8×10 ⁹	20		9,1
Примечание. 1А–5А – оператор 1; 1Б–5Б – оператор 2. Результат определения среднего количества живых микробных клеток после хранения при температуре (37±1)°С в течение 14 сут – (2,7±0,4)×10 ⁹ ж.м.к. Среднее значение термостабильности (в сут) – (9±1) сут. *Норма: не менее 7 сут.					

Таблица 5. Результаты испытания ОСО 42-28-398-2014 специфической активности вакцины туляреминой живой в течение срока годности, на конец срока годности и после продления срока годности

№ образца	Общая концентрация, м.к./мл*	Среднее количество выросших колоний	Среднее количество живых микробных клеток	Процент живых микробных клеток**	Процент SR (белых) иммуногенных колоний***
1	$1,5 \times 10^{10}$	89,7	$8,97 \times 10^9$	46	94,8
2	$1,5 \times 10^{10}$	79,7	$7,97 \times 10^9$	44	94,6
3	$1,5 \times 10^{10}$	84,7	$8,47 \times 10^9$	55	92,9
4	$1,5 \times 10^{10}$	94,7	$9,47 \times 10^9$	55	94,4
5	$1,4 \times 10^{10}$	90,0	$9,0 \times 10^9$	58	93,7
6	$1,4 \times 10^{10}$	72,3	$7,23 \times 10^9$	53	96,8
7	$1,5 \times 10^{10}$	80,3	$8,03 \times 10^9$	44	97,1
8	$1,5 \times 10^{10}$	64,7	$6,47 \times 10^9$	49	91,7
9	$1,5 \times 10^{10}$	68,0	$6,8 \times 10^9$	51	95,1
10	$1,5 \times 10^{10}$	65,0	$6,5 \times 10^9$	45	90,3
11	$1,5 \times 10^{10}$	90,0	$9,0 \times 10^9$	42	95,9
12	$1,5 \times 10^{10}$	86,7	$8,67 \times 10^9$	46	94,6
13	$1,5 \times 10^{10}$	70	$7,0 \times 10^9$	46	93
14	$1,5 \times 10^{10}$	66	$6,6 \times 10^9$	42	93
15	$1,5 \times 10^{10}$	67,7	$6,77 \times 10^9$	45	94,5
16	$1,5 \times 10^{10}$	70,3	$7,03 \times 10^9$	47	97,7
17	$1,5 \times 10^{10}$	64,7	$6,47 \times 10^9$	43	95,4
Примечание. 1–9 – Испытания образцов ОСО 42-28-398-2014 в течение срока годности. 10–12 – Испытания образцов ОСО 42-28-398-2014 на конец срока годности. 13–17 – Испытания образцов ОСО 42-28-398-2015 после продления срока годности (в течение 6 мес.). Среднее значение концентрации микробных клеток – $1,5 \times 10^{10}$ м.к./мл. Среднее значение количества живых микробных клеток – $7,6 \times 10^9$ ж.м.к. Среднее значение процента живых микробных клеток – 47%. Среднее значение процента SR (белых) иммуногенных от общего количества выросших колоний – 94%. *Аттестованная характеристика: $(1,5 \pm 0,2) \times 10^{10}$ м.к./мл. **Аттестованная характеристика: $(54,0 \pm 11,7)\%$. ***Аттестованная характеристика: $(94,1 \pm 2,8)\%$.					

ляремийной живой в качестве ОСО для контроля коммерческих серий туляремийных вакцин по показателям: специфическая активность и иммуногенность.

Нами проведен анализ результатов применения ОСО 42-28-398-2014 вакцины туляремийной живой по аттестованным характеристикам «Специфическая активность: концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток и степень диссоциации (процентом SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших)» при параллельном испытании коммерческих серий туляремийных вакцин в течение и в конце срока годности. Как следует из данных, представленных в таблице 5, значение всех аттестованных характеристик ОСО вакцины, в течение срока наблюдения, оставалось в пределах установленного интервала. Концентрация микробных клеток составила в среднем $1,5 \times 10^{10}$ м.к./мл, процент живых микробных клеток – от 42 до 58%, процент SR (белых) колоний – от 91,7 до 96,8%. Значение показателя «Термостабильность» ОСО вакцины составило (9 ± 1) сутки и также находилось в пределах установленного интервала.

Проведенные исследования позволили сделать вывод о том, что серия О2 по всем проверенным показателям соответствует требованиям к ОСО вакцины и может быть использована в качестве ОСО. Полученные результаты позволили продлить срок годности данной серии ОСО вакцины на 6 мес.

Результаты применения ОСО после продления срока годности (табл. 5) показали, что значения всех аттестованных характеристик остаются в пределах установленного интервала, что подтвердило правомочность продления срока годности.

Полученные результаты позволили разработать комплект нормативной документации на ОСО, подтверждающей качество стандартного образца (паспорт, маркировка и инструкция по применению).

Выводы

1. Аттестованная серия вакцины туляремийной живой может быть использована в качестве ОСО.

2. Установлены значения составляющих аттестованной характеристики «Специфическая активность», представленные как среднее арифметическое значение плюс/минус неопределенность, при доверительной вероятности 0,95% и коэффициенте охвата $k=2$:

- концентрация живых микробных клеток – $(1,5 \pm 0,2) \times 10^{10}$ м.к./мл;
- процент живых микробных клеток – $(54,0 \pm 11,7)\%$;
- процент иммуногенных колоний из числа выросших – $(94,1 \pm 2,8)\%$;
- иммуногенность – 100%.

3. На основании результатов применения ОСО вакцины и полученных данных по оценке показателей качества стандартного образца по окончании периода его хранения, срок годности ОСО 42-28-398-2014 продлен на 6 мес.

4. В результате проведенных исследований разработаны и утверждены нормативные документы: паспорт, маркировка, инструкция по применению.

Литература:

1. ГОСТ Р 52249-2004. Правила производства и контроля качества лекарственных средств.

2. Положение о службе стандартизации в системе Министерства Здравоохранения СССР. Приказ Министерства Здравоохранения СССР № 1010 от 29 июля 1985 г.
3. О мерах по выполнению постановления Совета Министров СССР «О государственном надзоре за стандартами и средствами измерений в СССР». Приказ Министерства Здравоохранения СССР № 1420 от 14 декабря 1983 г.
4. Шмелева НК, Медведевских СВ, Агисева СТ, Осинцева ЕВ. Отраслевые службы стандартных образцов государственной службы стандартных образцов состава и свойств веществ и материалов. Стандартные образцы 2011; (3): 11–8.
5. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Борисевич ИВ, Мовсесянц АА. Опыт Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича по разработке и аттестации стандартных образцов медицинских иммунобиологических препаратов. Стандартные образцы 2011; (4): 17–21.
6. Борисевич ИВ, Петухов ВГ, Волкова РА, Устинникова ОБ, Фадейкина ОВ, Малкова ВИ. Стандартные образцы как средство метрологического обеспечения аналитических методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). Биопрепараты 2010; (4): 8–10.
7. Мещерякова ИС. Таксономия, идентификация и иммунологическая диагностика туляремии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 1990.
8. Косилко СА, Балахонов СВ, Бренёва НВ, Чеснокова МВ, Андаев ЕИ, Носков АК, Мазепа АВ, Дугаржапова ЗФ, Михайлов ЛМ, Шаракшаев МБ. Эпидемиологическая ситуация по зоонозным, природно-очаговым инфекционным болезням в Сибири и на Дальнем Востоке в 2013 г. и прогноз на 2014 г. Проблемы особо опасных инфекций 2014; (2): 53–7.
9. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2014. Available from: http://rosпотребnadzor.ru/bitrix/redirect.php?event1=file&event2=download&event3=gd_2013_dlya-sayta.pdf&goto=/upload/iblock/3b8/gd_2013_dlya-sayta.pdf.
10. РН002348/01-010212 (изм. № 1). Вакцина туляремийная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и кожного скарификационного нанесения.
11. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. СПб.: ВНИИМ им. Д.И. Менделеева; 2002.
12. ГОСТ 8.315-97 ГСИ. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. М.: Издательство стандартов; 2004.
13. ISO Guide 35:2006 Reference Material – General and statistical principles for certification. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:guide:35:ed-3:v1:en>.
14. World Health Organization Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. World Health Organization Technical Report Series 932. Annex 2. 2004. P. 73–131.
15. Волкова РА. Система контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов химическими и иммунохимическими методами: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.; 2009.
16. Фадейкина ОВ, Волкова РА, Борисевич ИВ. Проблемы оценки неопределенности аттестованных характеристик стандартных образцов для оценки качества биологических лекарственных препаратов. В кн.: Сборник трудов II Международной научной конференции «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». Екатеринбург; 2015. С. 80–2.

References

1. State Standard P 52249-2004. Rules of production and quality control of medicines (in Russian).
2. Regulations on Service Standards in the Ministry of Health. Order of the Ministry of Health of the USSR № 1010, 29.07.1985 (in Russian).
3. On measures to implement the decision of the Council of Ministers of the USSR «On state supervision of standards and measuring instruments to the USSR». Order of the Ministry of Health of the USSR № 1420, 14.12.1983 (in Russian).
4. Shmeleva NK, Medvedevskikh SV, Agisheva ST, Osintseva EV. Service Industry standard samples civil service standards of composition and properties of substances and materials. Standartnye obraztsy 2011; (3): 11–8 (in Russian).
5. Volkova RA, Fadeyikina OV, Borisevich IV, Movsesyants AA. The experience of the LA Tarasovich State Research Institute of Standardization and Control of Medical Biological Preparations in the development and certification of standard samples of medical immunobiological preparations. Standartnye obraztsy 2011; (4): 17–21 (in Russian).
6. Borisevich IV, Petuhov VG, Volkova RA, Ustinikova OB, Fadeyikina OV, Malkova VI. Standard samples as a means of metrological support

- of analytical methods for the control of medical immunobiological preparations (MIP). *Biopreparaty* 2010; (4): 8–10 (in Russian).
7. Mescheryakova IS. Taxonomy, identification and immunological diagnostics of tularemia. *Dr. Med. Sci [thesis]*. Moscow; 1990 (in Russian).
 8. Kosilko SA, Balahonov SV, Breneva NV, Chesnokova MV, Andaev EI, Noskov AK, Mazepa AV, Dugarzhapova ZF, Mihaylov LM, Sharakhshyanov MB. Epidemiological situation on zoonoses, natural focal infectious diseases in Siberia and the Far East in 2013 and forecast for 2014. *Problemy osobno opasnykh infektsiy* 2014; (2): 53–7 (in Russian).
 9. On the sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2013. State report. M.: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare; 2014. Available from: http://rospotrebnadzor.ru/bitrix/redirect.php?event1=fi le&event2=download&event3=gd_2013_dlya-sayta.pdf&goto=/upload/iblock/3b8/gd_2013_dlya-sayta.pdf (in Russian).
 10. PN002348/01-010212. *Tularemia vaccine live, lyophilisate for suspension for intradermal and epidermal scarification application* (in Russian).
 11. Guide EVRAHIM/CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Saint Petersburg: DI Mendeleev VNIIM; 2002 (in Russian).
 12. State Standard 8.315-97 GSI. Reference materials of composition and properties of substances and materials. The main provisions. Moscow: Izdatelstvo standartov; 2004 (in Russian).
 13. ISO Guide 35:2006 Reference Material – General and statistical principles for certification. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:guide:35:ed-3:v1:en>.
 14. World Health Organization Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. *World Health Organization Technical Report Series* 932. Annex 2. 2004. P. 73–131.
 15. Volkova RA. The system of quality control of medical immunobiological preparations by chemical and immunological methods. *Dr. Biol. Sci [thesis]*. Moscow; 2009 (in Russian).
 16. Fadeykina OV, Volkova RA, Borisevich IV. Problems of estimation uncertainty characteristics certified reference materials for assessing the quality of biological medicines. In: *Proceedings of the II International Conference «Reference materials and measurement technology»*. Ekaterinburg; 2015. P. 80–2 (in Russian).

Authors:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre on Expert Evaluation of Medical Application Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

Kasina IV. Leading expert of Laboratory of bacterial vaccines of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Goryaev AA. Leading expert of Laboratory of bacterial vaccines of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Fadeykina OV. Leading technologist of Laboratory of bacteriophages and preparations with a collection of normal flora of microorganisms of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Nemirovskaya TI. Head of Laboratory of bacterial vaccines of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Medical Sciences.

Ustinikova OB. Head of Laboratory of biochemistry of medical immunobiological preparations of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Alekseeva SA. 1st category expert of Laboratory of bacterial vaccines of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Volkova RA. Head of the laboratory of molecular biology and genetic testing methods of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Doctor of Biological Sciences.

Movsesyants AA. Head of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Federal State Health Agency Health Service № 64 of the Federal Penitentiary Service of Russia, 18 Rabochaya Street, Saratov, 410028, Russian Federation.

Raschepkin LI. Head of the bacteriological laboratory for the diagnosis of tuberculosis of the branch «Tuberculosis Hospital».

Federal State Health Agency Russian Research Institute for Plague Control «Microbe» of Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 46 Universitetskaya Street, Saratov, 410005, Russian Federation.

Lobovikova OA. Head of the department of biological and technological control. Candidate of Biological Sciences.

Об авторах:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Касина Ирина Владимировна. Ведущий эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Горяев Артем Анатольевич. Ведущий эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Фадеекина Ольга Васильевна. Ведущий технолог лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Немировская Татьяна Ивановна. Начальник лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Устинникова Ольга Борисовна. Начальник лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Алексеева Светлана Александровна. Эксперт 1-й категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук.

Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Медико-санитарная часть № 64 Федеральной службы исполнения наказаний России. Российская Федерация, 410028, Саратов, ул. Рабочая, 18.

Расчепкин Леонид Иванович. Начальник бактериологической лаборатории по диагностике туберкулеза филиала «Туберкулезная больница».

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46.

Лобовикова Оксана Анатольевна. Заведующая отделом биологического и технологического контроля, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Фадеекина Ольга Васильевна; fadeykina@exrmed.ru

Поступила 15.06.2014 г.
Принята 06.11.2015 г.