

▼ 2.6.16. ВИПРОБУВАННЯ НА СТОРОННІ АГЕНТИ У ВІРУСНИХ ВАКЦИНАХ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

ВСТУП

Стратегія випробовування на сторонні агенти у вірусних вакцинах має бути розроблена на підставі оцінювання ризику відповідно до принципів ризику вірусного забруднення, детально описаних у загальній статті «Вірусна безпека» (5.1.7). Ця стратегія охоплює повний пакет придатних випробувань, здатних виявити різні сімейства сторонніх агентів, які можуть інфікувати джерело вірусних штамів, включно з клітинними субстратами та сировиною тваринного чи рослинного походження. Вона також враховує спроможність виробничого процесу видаляти або інактивувати віруси. Перелік випробувань, які наведені в Табл. 2.6.16.-1, має бути адаптований в залежності від того, які сторонні агенти потенційно можуть забруднити продукт: для випробувань *in vitro* оцінювання ризику може допускати, за згодою уповноваженого органу, використання інших дозволених клітинних ліній або методів молекулярної біології в залежності від виробничого процесу й температури інкубації, потрібної для накопичення певних вірусів. Якщо для виявлення деяких занесених/випадкових вірусів (наприклад, вірусу везикулярного стоматиту в мишей-сосунців і вірусу грипу в запліднених SPF-яйцях) випробування *in vivo* є більш релевантними, ніж випробування *in vitro*, рішення зберегти або запровадити такі випробування *in vivo* в стратегії випробування має бути обґрунтоване оцінюванням ризику.

Доступні нові, чутливі молекулярні методи з широкими можливостями виявлення. Ці нові підходи охоплюють методи високопропускового секвенування (ВПС, HTS), методи ампліфікації нуклеїнових кислот (МАНК, NAT) (наприклад, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, PCR), ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР, RT-PCR), метод кількісного визначення посиленої в продукті зворотної транскриптази (ППЗТ, PERT) для цілих сімейств вірусів або методи з випадковим праймінгом (пов'язані або не пов'язані із секвенуванням), гібридизацію олігонуклеотидних масивів і маспектрометрію з ПЛР широкого діапазону. На підставі оцінювання ризику й за згодою уповноваженого органу ці методи можуть бути використані або як альтернатива випробуванням *in vivo* та специфічним МАНК, або як доповнення/альтернатива для випробувань *in vitro* на культурі клітин.

Якщо для проведення випробування потрібна попередня нейтралізація вірусу, використовують специфічні антитіла, походження яких не пов'язане з людиною або мавпою; якщо культивування вірусу проводилося на тканинах, отриманих від птиці, то антитіла також не мають походити від птиці. Для приготування імуносироватки використовують антиген для імунізації, отриманий із клітинної куль-

тури, що має походження, відмінне від походження вакцини, і яка вільна від сторонніх агентів. Там, де передбачене використання SPF-яєць, яйця відбирають зі стада, яке вільне від зазначених патогенів (5.2.2).

МЕТОДИ ВИПРОБУВАННЯ

На різних етапах виробництва проводять відповідні випробування на сторонні агенти, засновані на оцінюванні ризику; використовують описані нижче методи та зазначені в Табл. 2.6.16.-1.

Відбирають зразки під час збирання вірусів; якщо їх не перевіряють негайно, зберігають за температури нижче -40 °С.

Таблиця 2.6.16.-1.

Відповідні випробування на сторонні агенти на різних етапах виробництва

Вірусні посівні серії	Збір вірусу	Виробництво культуральних субстратів	Контрольні клітини	
Контрольні яйця				
Забруднення бактеріями та грибами	+	+	-	-
Мікоплазми	+	+	-	-
Спіроплазми(1)	+	-	-	-
Мікобактерії	+	+	-	-
Випробування на новонароджених мишах(2)	+	+	-	-
Віруси птиці(3)	+	+	-	-
Випробування культури клітин на сторонні агенти(4)	+	+	+	+
Віруси комах(5)	+	+	-	-
Випробування на контрольних клітинах (мікроскопічне дослідження)	-	-	+	-
Гемадсорбувальні віруси	-	-	-	+
Випробування на контрольних яйцях (гемаглютинувальні агенти)	-	-	-	+
Віруси лейкозу птиці(6)	-	-	-	+

Випробування на специфічні віруси МАНК(7)

+ + - -
Випробування на віруси з використанням загальних молекулярних методів(8) + + -
-

(1) Якщо використовують клітини комах або сировину рослинного походження.

(2) Якщо оцінювання ризику вказує на те, що це випробування забезпечує зменшення негативних наслідків, враховуючи загальний комплект випробувань.

(3) Якщо вірус розмножують у птиці або первинних тканинах птиці. Якщо оцінювання ризику вказує на те, що це випробування забезпечує зменшення негативних наслідків, враховуючи загальний обсяг випробування.

(4) Випробування проводять у придатних рекомендованих/дозволених культурах клітин. На підставі оцінювання ризику.

(5) Якщо вірус розмножують у клітинах комах.

(6) Якщо вірус розмножують у первинних тканинах птиці або яйцях.

(7) На підставі оцінювання ризику.

(8) Ці методи також можуть бути використані як альтернатива випробуванням *in vivo* та специфічним МАНК або як доповнення/альтернатива для випробувань культури *in vitro* на підставі оцінювання ризику й за узгодженням з уповноваженим органом.

Відсутність бактерій та грибів. Кожна вірусна посівна серія та збір вірусів має відповідати вимогам випробування на стерильність (2.6.1).

Мікоплазми (2.6.7). Кожна вірусна посівна серія та збір вірусів має відповідати вимогам випробування на відсутність мікоплазм.

Спіроплазми. Спіроплазми можуть бути внесені до вірусної посівної серії через забруднення сировини рослинного походження або коли для культивування вірусу використовують клітинні лінії комах. Коли це доречно, вірусна посівна серія має бути вільною від спіроплазм, це має бути продемонстровано валідованим методом, схваленим уповноваженим органом. Після валідації та погодження з уповноваженим органом для виявлення спіроплазм можна використовувати МАНК для виявлення мікоплазм (2.6.7).

Мікобактерії (2.6.2). Зразок об'ємом 2.7 мл кожної вірусної посівної серії та збору вірусу випробовують на наявність *Mycobacterium spp.* методами культивування, які мають відому чутливість щодо визначення цих організмів. Як альтернативу можна викорис-

товувати МАНК (2.6.2), якщо таке випробування валідоване та продемонстровано, що воно може бути порівняно із методом культивування.

Миші-сосунці. Кожну вірусну посівну серію випробовують на мишах-сосунцях, якщо оцінювання ризику вказує на те, що це випробування забезпечує зменшення негативних наслідків, враховуючи загальний обсяг випробувань. Кожній із не менше 20 мишей-сосунців віком менше 24 год вводять інтрацеребрально 0.01 мл і внутрішньоочеревно не менше 0.1 мл вірусної посівної серії. За мишами-сосунцями спостерігають щодня протягом щонайменше 4 тижня. Проводять розтин усіх мишей-сосунців, загиблих після перших 24 год випробування або таких, що мають симптоми захворювання, та досліджують їх на наявність ознак вірусної інфекції прямим макроскопічним оглядом. Вірусна посівна серія витримує випробування, якщо в жодній миші-сосунця немає ознак інфекції, викликані вірусною посівною серією. Випробування вважається придатним, якщо не менше 80 % щеплених (інокульованих) мишей-сосунців виживає протягом періоду спостереження.

Віруси птиці. Кожну вірусну посівну серію, яку розмножують у тканинах птиці, і кожний збір вірусу, який розмножують у первинних тканинах птиці, випробовують на наявність вірусів птиці, якщо оцінювання ризику вказує на те, що це випробування забезпечує зменшення негативних наслідків, враховуючи загальний обсяг випробувань. Нейтралізують зразок, еквівалентний 100 дозам вакцини для застосування людиною або 10 мл, залежно від того, яка величина більша. Використовуючи по 0.5 мл на кожне яйце, інокують групу запліднених SPF-яєць віком від 9 до 11 діб в алантоїсну рідину, а другу групу, віком від 5 до 7 діб, — у жовтковий мішок. Інкують протягом 7 діб. Вірусна посівна серія або збір вірусу відповідають вимогам випробування, якщо в алантоїсних рідинах і рідинах жовткових мішків не виявляють гемаглютинувальних агентів і якщо всі ембріони й хоріоалантоїсні мембрани, досліджені на загальну патологію, є нормальними. Результати випробування вважаються придатними, якщо не менше 80 % інокульованих ембріонів виживає протягом 7 діб.

Випробування культури клітин на сторонні агенти. Випробування на наявність інших сторонніх агентів кожної вірусної посівної серії, кожного збору вірусу й кожної виробничої культури клітин (контрольні клітини або контрольні яйця) мають проводитись на підставі оцінювання ризику. Під час вибору придатних рекомендованих клітин потрібно враховувати походження клітинного субстрату й штаму вірусу, а також потенційні сторонні агенти, які можуть бути випадково занесені під час виробничого процесу або через використання сировини тваринного або рослинного походження.

Нейтралізовані зразки кожної вірусної посівної серії та кожного збору вірусу, еквівалентні (якщо не зазначено інше) 500 дозам вакцини для застосування людиною або 50 мл, залежно від того, яка величина більша, випробовують на наявність сторонніх агентів інокуляцією в безперервній культурі клітин мавп і людей. Якщо вірус культивують на культурі клітин мавп або людей, збір нейтралізованого вірусу випробовують на окремій культурі цих клітин. Якщо вірус культивують на культурі клітин ссавців (крім клітин людини або мавпи) або в клітинах птиці, то інокують клітини того різновиду, на якому він культивований, але з окремої партії. Інокульовані культури інкубують за температури (36 ± 1) °C та спостерігають протягом 14 діб. Якщо виробничу культуру клітин підтримують за температури, відмінної від (36 ± 1) °C, проводять додаткове випробування на сторонні агенти за цієї температури з використанням клітин того самого типу, який використовується для вирощування вірусу. Проводять культивування протягом 14 діб із подальшим випробуванням на гемадсорбцію. Вірусна посівна серія або збір вірусів витримують випробування, якщо в жодній із культур клітин немає ознак (доказів) наявності будь-яких сторонніх агентів через 14 і 28 діб інкубації та ознак (доказів) наявності будь-яких гемадсорбувальних вірусів через 28 діб. Результати випробування вважаються придатними, якщо не менше 80 % культур клітин залишається життєздатною.

Віруси комах. Кожну вірусну посівну серію та збір вірусів, які розмножують у клітинах комах, перевіряють на наявність вірусів комах. Нейтралізовані зразки, еквівалентні (якщо не зазначено інше) 500 дозам вакцини для застосування людиною, але не менше 50 мл, залежно від того, яка величина більша, випробовують на наявність сторонніх агентів інокуляцією як мінімум в одну культуру клітин, відмінну від тієї, що використовується у виробництві, і допустиму для вірусів комах, що також дає можливість виявити арбовірус людини (наприклад, ВНК-21). Вибір клітин схвалюється уповноваженим органом, береться до уваги походження виробничої культури клітин і ймовірних забруднювачів (контамінантів), які можуть бути виявлені за допомогою обраних клітин. Клітини інкубують за відповідної температури та спостерігають протягом 14 діб. Проводять культивування протягом 14 діб із подальшим випробуванням на гемадсорбцію. Вірусна посівна серія або збір вірусів витримують випробування, якщо в жодній із культур клітин немає ознак (доказів) наявності будь-яких сторонніх агентів через 14 і 28 діб інкубації та ознак наявності будь-яких гемадсорбувальних вірусів через 28 діб. Результати випробування вважаються придатними, якщо не менше 80 % культур клітин залишається життєздатною.

Випробування на контрольних клітинах. Якщо для виробництва вірусу використовують культури клітин, контрольні клітини вивчають під мікроскопом на відсутність будь-якої цитопатичної дегенерації вірусного походження протягом усього часу інкуба-

ції інокульованих виробничих культур клітин або протягом щонайменше 14 діб після часу інокуляції виробничих ємностей, залежно від того, що довше. Результати випробування вважаються придатними, якщо не менше 80 % контрольних культур клітин виживає до кінця періоду спостереження.

Через 14 діб або в момент останнього збору вірусів, залежно від того, що довше, об'єднують надосадкові рідини з контрольних клітин і випробовують на наявність сторонніх агентів протягом 14 діб, як наведено вище для посівної вірусної серії та збору вірусу, інокуляцією відповідних клітинних культур, залежно від типу клітин, що використовувалися для вирощування вірусу.

Гемадсорбувальні віруси. Якщо для виробництва вірусу використовують культури клітин, контрольні клітини вивчають під мікроскопом, як наведено вище для випробування культури клітин на сторонні агенти. Через 14 діб або в момент останнього збору вірусів, залежно від того, що довше, не менше 25 % контрольних культур випробовують на наявність гемадсорбувальних вірусів додаванням еритроцитів мурчаків. Якщо неможливо провести випробування на гемадсорбувальні віруси, потрібно провести випробування на гемаглютинувальні віруси. Якщо потрібно, еритроцити мурчаків можна зберігати за температури (5 ± 3) °C протягом не більше 7 діб. Культуру ділять на дві рівні частини; стан однієї половини оцінюють після інкубації протягом 30 хв за температури (5 ± 3) °C, а стан іншої половини — після інкубації протягом 30 хв за температури від 20 °C до 25 °C. Не має бути виявлено ознак наявності гемадсорбувальних агентів.

Випробування на контрольних яйцях. Якщо для виробництва вірусу використовують яйця, 0.25 мл алантоїсної рідини кожного контрольного яйця випробовують на гемаглютинувальні агенти безпосереднім змішуванням із курячими еритроцитами й далі проводять пасажі в SPF-яйця так: із 5 мл об'єданого зразка амніотичних рідин контрольних яєць вводять по 0.5 мл в алантоїсну й амніотичну порожнини SPF-яєць. Контрольні яйця відповідають вимогам випробування, якщо в жодному випадку немає ознак наявності гемаглютинувальних агентів.

Крім того, по 5 мл зразків об'єднаних амніотичних рідин контрольних яєць інокують у придатні рекомендовані клітини, включно з клітинами людини, мавп і птиці. За культурами клітин спостерігають протягом 14 діб за придатної температури інкубації. Контрольні яйця відповідають вимогам випробування, якщо немає ознак наявності сторонніх агентів. Результати випробування вважаються придатними, якщо не менше 80 % інокульованих культур клітин виживає до кінця періоду спостереження.

Віруси лейкозу птиці. Для кожного вірусу, який розмножується в первинних тканинах птиці або в яйцях, виробничу культуру клітин (контрольні клітини або

контрольні яйця) випробовують на віруси лейкозу птиці відповідно до загальної статті (2.6.24). Якщо для виробництва вірусу використовують культури клітин, до випробування на віруси лейкозу птиці контрольні клітини вивчають під мікроскопом, як наведено вище для випробування культури клітин на сторонні агенти. Через 14 діб або в момент останнього збору вірусів, залежно від того, що довшє, проводять випробування на віруси лейкозу птиці на клітинах DF1 або на вільних від лейкозу ембріональних культурах клітин курей ампліфікацією через 5 пасажів із використанням щонайменше 5 мл надосадової рідини з контрольних клітин або щонайменше 10 мл зразка об'єднаних амніотичних рідин із контрольних яєць. Для виявлення екзогенних ретровірусів птиці (враховуючи вірус лейкозу птиці) може бути використана кінцева точка методу кількісного визначення ППЗТ (PERT) після ампліфікації клітин DF1. Для специфічного виявлення вірусу лейкозу птиці можуть бути використані декілька кінцевих точок, таких як імуофарбування, твердофазний імуоферментний аналіз (*ELISA*) або фіксація комплексу для лейкозу птиці (ФКЛП, СОFAL). Контрольні клітини або контрольні яйця відповідають вимогам випробування, якщо немає ознак наявності вірусу лейкозу птиці.

Випробування для специфічних вірусів МАНК (NAT). Грунтуючись на оцінюванні ризику, яке пов'язане з виробничим процесом, кожна посівна вірусна серія та кожний збір вірусу можуть бути випробувані за допомогою МАНК (2.6.21) для специфічних вірусів, які не можливо виявити за допомогою традиційних випробувань *in vivo* або культури клітин.

Випробування на віруси з використанням розширених молекулярних методів. На підставі оцінювання ризику й за згодою уповноваженого органу розширені молекулярні методи (наприклад, метод високопропускового секвенування) можуть бути використані або як альтернатива випробуванням *in vivo* та специфічним МАНК, або як доповнення/альтернатива для випробувань *in vitro* на культурі клітин.

Як МАНК (2.6.21), так і розширені молекулярні методи проводять із попередньою ампліфікацією або без неї у придатних рекомендованих (дозволених) клітинах. У разі позитивних результатів із використанням розширених молекулярних методів або МАНК потрібно провести подальше дослідження, щоб визначити, чи пов'язані виявлені нуклеїнові кислоти з присутністю інфекційних сторонніх агентів і/або, як відомо, є небезпечними для здоров'я людини. ▲