

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение вирусной контаминации в вирусных вакцинах для ветеринарного применения

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы обнаружения посторонних агентов (чужеродных вирусов) в серии главного посевного материала (Master Seed) и готового продукта вакцин против вирусных инфекций животных и птиц.

Перечень контаминантов (патогенных или условно-патогенных), наличие которых возможно в посевном вирусном материале (Master Seed) и готовом обработанном продукте определяется на основе анализа рисков для отдельных производителей с учетом конкретных условий.

1. Общие положения

1.1 Испытания на наличие чужеродных вирусов проводят только в главном посевном материале и/или живых вирусных вакцинах.

1.2 Для испытаний на наличие чужеродных вирусов используют эмбрионы птиц, культуры клеток, цыплят и полимеразную цепную реакцию (ПЦР), если иное не предусматривается в фармакопейных статьях.

1.3 Эмбрионы птиц должны быть получены от стад кур, свободных от специфической патогенной микрофлоры (SPF), а цыплята – от стад здоровых кур, если в фармакопейных статьях нет других указаний.

1.4 Клеточные культуры для испытания на посторонние агенты должны отвечать требованиям к культурам клеток, изложенным в общей фармакопейной статье "*Культуры клеток для ветеринарного применения*".

1.5 При проведении испытаний готового продукта, описанных в данном разделе, используют жидкие или лиофилизированные препараты, которые восстанавливают стерильным раствором натрия хлорида изотонического 0,9 % (физиологический раствор, pH 7,2-7,4), дистиллированной водой или другим разбавителем.

При проведении испытаний серии главного посевного материала (Master Seed), если не установлено или не указано иначе, испытуемое вещество должно содержать количество вируса, эквивалентное не менее 10 иммунизирующим дозам вакцины из расчёта объёма в 1,0 мл для культуры клеток (площадью 25 см³) и в 0,2 мл для эмбрионов птиц.

1.6 Если вирус, входящий в состав исследуемого материала, может оказывать влияние на ход и чувствительность испытания (кроме ПЦР), данный вирус в испытуемом образце нейтрализуют с помощью моновалентной антисыворотки, при этом смесь "вирус+сыворотка" инкубируют при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и относительной влажности 60-70% в течение 0,5 ч, необходимых для нейтрализации вакцинного штамма вируса (если нет других указаний в фармакопейных статьях).

1.7 Все сыворотки, используемые в испытаниях для обнаружения посторонних агентов не должны содержать антитела к перечисленным в п.2.1 вирусам, что должно быть подтверждено с помощью соответствующих исследований, за исключением антител к тому вирусу, который они предлагают нейтрализовать.

1.8 Исследования сывороток, полученных от цыплят из SPF стад, не проводят.

1.9 В качестве метода для проведения испытаний на посторонние агенты может быть использован метод ПЦР после его валидации на чувствительность, специфичность и воспроизводимость.

1.10 Допускается использование и других методов испытаний, которые должны обладать соответствующей специфичностью и чувствительностью и быть валидированы в лаборатории, проводящей испытания.

1.11 Если в результате испытаний выявлено несоответствие заявленным требованиям хотя бы по одному из показателей, по данному показателю проводят испытания на удвоенном количестве готового препарата или главного посевного материала (Master Seed) той же серии.

Если результаты повторных испытаний также выявляют несоответствие

заявленным требованиям, серию вакцины или главного посевного материала (Master Seed) выбраковывают.

2. Испытание образцов на контаминацию посторонними вирусами вакцин против болезней птиц

2.1 При проведении испытаний на наличие чужеродных вирусов главного посевного материала (Master Seed) проводят исследование на наличие следующих контаминантов:

- аденовирусы птиц, 1 группа;
- вирус инфекционного энцефаломиелита птиц;
- вирус инфекционного бронхита кур;
- вирус инфекционной бурсальной болезни;
- вирус инфекционного ларинготрахеита птиц;
- вирус лейкоза птиц (типа А, В, J);
- реовирус птиц;
- вирус инфекционной анемии цыплят;
- вирус синдрома снижения яйценоскости;
- вирус болезни Марека (1-го серотипа);
- вирус болезни Ньюкасла;
- вирус метапневмовирусной инфекции птиц (типа А, В);
- вирус оспы птиц;
- вирус гриппа птиц;
- вирус ретикулоэндотелиоза птиц;
- энтерит уток (для главного посевного материала, изготовленного на культурах клеток из утиных эмбрионов);
- парвовирусы уток и гусей (для главного посевного материала, изготовленного на культурах клеток из утиных или гусиных эмбрионов).
- лимфопролиферативный вирус индеек (вирус герпеса индеек – НVT).

Приведенный перечень может быть изменен при соответствующем обосновании с учетом рисков конкретного производителя.

2.2 На наличие контаминации чужеродными вирусами готовой продукции проводят испытания на наличие следующих вирусов:

- вирус инфекционного бронхита кур;
- вирус инфекционной бурсальной болезни;
- вирус инфекционного ларинготрахеита птиц;
- вирус гриппа птиц;
- вирус болезни Ньюкасла;
- вирус синдрома снижения яйценоскости
- вирус метапневмовирусной инфекции птиц (типа А, В);
- энтерит уток (проводится для вакцин, изготовленных на клетках уток или гусей);
- парвовирусы уток и гусей (для вакцин, изготовленных на культурах клеток из утиных или гусиных эмбрионов).

Производитель на основе анализа рисков конкретных условий производства может расширить список проверяемых контаминантов.

2.3 Если в серии готового продукта вакцин против вирусных инфекций при проведении исследований методом ПЦР обнаружен геном вируса, то дальнейшие исследования на обнаружение возможной контаминации проводятся с использованием живых биологических тест-систем (эмбрионы птиц, культуры клеток или цыплята).

2.4 Если в серии готового продукта вакцин против вирусных инфекций при проведении исследований методом ПЦР геном вируса не обнаруживается, то данный препарат считается свободным от вирусных контаминантов.

3. Испытание на обнаружение (выявление) посторонних вирусных агентов с использованием SPF эмбрионов кур

3.1 Используют испытуемый образец, обработанный иммунной сывороткой, как было указано в п.1.6, содержащий вирус не менее 10 доз в 0,2 мл. Могут быть добавлены соответствующие антибиотики. Испытуемый образец инокулируют по 0,2 мл куриным эмбрионам 3-х групп, по 10

эмбрионов в каждой:

- группа 1 – в желточный мешок эмбрионов 4-6-суточного возраста;
- группа 2 – в аллантаоисную полость эмбрионов 8-10-суточного возраста;
- группа 3 - на хорионаллантоисную оболочку эмбрионов 10-12-суточного возраста.

3.2 По 2 эмбриона каждого возраста необходимо оставить незараженными в качестве контроля.

3.3 Эмбрионы инкубируют при температуре $(37,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности 60-70% с ежедневной овоскопией: группы 1 – 12 суток, группы 2 и 3 - 6-7 суток.

3.4 Эмбрионы, павшие в первые 24 ч. после заражения, уничтожают, считая их гибель неспецифической. Гибель эмбрионов в последующие часы считают действием вируса и учитывают как специфическую гибель.

3.5 Испытание достоверно, если не менее 6 эмбрионов в каждой группе выжили в течение более 24 ч.

3.6 Проводят макроскопическое исследование на аномалии всех эмбрионов, которые погибли по истечении более 24 ч после инокуляции, или которые выжили в течение всего инкубационного периода. Исследуют также хорионаллантоисные оболочки эмбрионов на любые нарушения развития и проверяют аллантаоисную жидкость на присутствие гемагглютинирующих агентов в капельной реакции гемагглютинации (РГА) с 1%-ной суспензией эритроцитов петуха.

3.7 Проводят последующий пассаж на куриных эмбрионах, как описано выше. Материалом для следующего пассажа служат гомогенаты желточного мешка, полученные из эмбрионов 1 группы, аллантаоисная жидкость эмбрионов 2 группы и гомогенат хорионаллантоисной оболочки эмбрионов 3 группы, полученные в ходе первого пассажа.

3.8 Образец исследуемого материала соответствует требованиям испытания, если в ходе контроля не было ни одного случая специфической

гибели эмбрионов, отсутствовали патологические изменения эмбрионов, и РГА с аллантоисной жидкостью отрицательная.

3.9 Отрицательная РГА подтверждает отсутствие контаминации вирусами ньюкаслской болезни (НБ), синдрома снижения яйценоскости (ССЯ-76) и гриппа птиц.

4. Испытание на обнаружение (выявление) посторонних агентов в клетках фибробластов эмбрионов кур

4.1 Готовят 7 образцов монослоя клеток первичных и вторичных фибробластов из тканей эмбрионов кур 9-11-суточного возраста, каждый с площадью поверхности приблизительно 25 см².

4.2 Формируют две группы:

- контрольную – (2 образца); в которой ростовую среду заменяют на питательную,

- опытную группу (5 образцов).

4.3 В опытной группе культуральную среду удаляют, когда клетки сформируют сплошной монослой, и вносят по 1 мл испытуемого материала в каждый образец. Обеспечивают контакт вирусосодержащего материала с поверхностью монослоя клеток для адсорбции вируса в течение 1 ч, затем вносят поддерживающую среду. В контрольной группе ростовую среду заменяют на питательную среду. Инкубируют опытные и контрольные образцы при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 4-7 дней (в зависимости от проявления ЦПД вируса и сроков инкубации культуры клеток) с ежедневной микроскопией.

4.4 Проводят 3 последовательных пассажа, с ежедневной микроскопией культур на наличие цитопатических изменений или других признаков присутствия посторонних агентов в испытуемой вакцине. Каждый пассаж проводится с использованием объединенных от всех 5 образцов клеточного монослоя и культуральной жидкости после трехкратного проведения цикла замораживания-оттаивания. При каждом пассаже по 1 мл объединенного материала вносят на каждый из 5 свежеприготовленных образцов монослоя

фибробластов.

4.5 Образцы исследуемого материала соответствуют требованиям испытания, если в течение сроков инкубирования культуры клеток отсутствует специфическая дегенерация клеток в опытной группе и какие-либо деструктивные изменения в контрольной группе.

5. Испытание на обнаружение (выявление) вируса болезни Марека

5.1 Готовят 11 образцов монослоя первичных или вторичных фибробластов эмбрионов кур из тканей эмбрионов 9-11 суточного возраста, каждый – с площадью поверхности приблизительно 25 см².

5.2 Формируют группы для проведения испытаний:

- группа 1 – опытная группа (5 образцов);
- группа 2 – положительный контроль (4 образца);
- группа 3 – отрицательный контроль (2 образца).

5.3 В группе 1 (опытной) культуральную среду удаляют, когда клетки сформируют сплошной монослой, и вносят по 1 мл испытуемого материала в каждый образец, оставляют в контакте с монослоем клеток для обеспечения адсорбции вируса на 1 ч, затем вносят питательную среду.

5.4. В образцы группы 2 (положительный контроль) вносят штамм вируса болезни Марека 1-го серотипа из расчёта не более 10 ТЦД₅₀ в 0,1 мл в каждый образец;

5.5 В группе 3 (отрицательный контроль) ростовую среду заменяют на питательную среду.

5.6 Инкубируют опытные и контрольные образцы при температуре (37,0 ± 0,5)°С в течении 4-5 сут. с ежедневной микроскопией.

5.7 Проводят 3 последовательных пассажа. Каждый пассаж проводится с объединенными от всех образцов в каждой группе монослоя клетками и культуральной жидкостью, после проведения цикла (3-х кратного) замораживания-оттаивания. По 1 мл объединенного материала каждой группы вносят на свежеприготовленные образцы монослоя фибробластов, как описано выше.

5.8 Полученные образцы исследуют на присутствие вируса болезни Марека с помощью иммуноокрашивания клеток.

5.9 Испытание считают достоверным, если не менее чем в 3 из 4 образцах 2 группы (положительного контроля) обнаружено присутствие вируса болезни Марека.

5.10 В течение сроков инкубирования в образцах группы 1 (опытной) и группы 3 (контрольной отрицательной) вирус болезни Марека должен отсутствовать.

5.11 Образец соответствует требованиям испытания, если наличие вируса болезни Марека не выявлено.

6 Испытание на обнаружение (выявление) метапневмовирусной инфекции птиц (МПВИ) / вируса ринотрахеита индеек

6.1 В культуре клеток фибробластов эмбрионов кур

6.1.1 Данное испытание может проводиться одновременно с испытанием, изложенным в данной общей фармакопейной статье в п. 2, с использованием тех же испытуемых образцов клеток и отрицательных контролей на всех стадиях, вплоть до конечного специфического испытания на выявление МПВИ птиц/ вируса ринотрахеита индеек на клетках, приготовленных из последнего пересева.

6.1.2 Готовят 11 образцов монослоя первичных или вторичных фибробластов эмбрионов кур из тканей эмбрионов 9-11 суточного возраста, каждый с площадью поверхности приблизительно 25 см².

6.1.3 Формируют группы и проводят испытания, как описано в п. 5.2-5.7 данной общей фармакопейной статьи, с некоторыми специфическими правками:

- в образцы группы 2 (положительный контроль) вносят подходящий штамм МПВИ птиц либо вируса ринотрахеита индеек из расчёта не более 10 ТЦД₅₀ в 0,1 мл в каждый образец;

- полученные образцы исследуют на присутствие МПВИ птиц либо вируса ринотрахеита индеек с помощью иммуноокрашивания клеток

(иммунофлюоресценции).

6.1.4 Испытание считают достоверным, если не менее чем в 3 из 4 образцах 2 группы (положительного контроля) обнаружено присутствие вируса МПВИ птиц либо вируса ринотрахеита индеек.

6.1.5 В течение сроков инкубирования в образцах группы 1 (опытной) и группы 3 (контрольной отрицательной) вирус МПВИ птиц либо ринотрахеита индеек должен отсутствовать.

6.1.6 Образцы соответствуют требованиям испытания, если наличие вируса МПВИ птиц либо ринотрахеита индеек в культуре клеток куриных фибробластов не выявлено.

6.2 В культуре клеток Vero

6.2.1 Готовят 11 образцов монослоя перевиваемой культуры клеток Vero, каждый с площадью поверхности приблизительно 25 см².

6.2.2 Формируют группы и проводят испытания, как описано в п. 5.2-5.7 данной общей фармакопейной статье, с некоторыми специфическими правками:

- в образцы группы 2 (положительный контроль) вносят подходящий штамм вируса МПВИ птиц либо вируса ринотрахеита индеек (из расчёта не более 10 ТЦД₅₀ в 0,1 мл) в каждый образец;

- полученные образцы исследуют на присутствие вируса МПВИ либо ринотрахеита индеек с помощью иммуноокрашивания клеток (иммунофлюоресценции).

6.2.3 Испытание считают достоверным, если не менее чем в 3 из 4 образцов 2 группы (положительного контроля) обнаружено присутствие вируса МПВИ птиц/вируса ринотрахеита индеек.

6.2.4 В течение сроков инкубирования в образцах группы 1 (опытной) и группы 3 (контрольной отрицательной) вирус МПВИ птиц либо ринотрахеита индеек должен отсутствовать.

6.2.5 Образцы вакцины соответствуют требованиям испытания, если наличие вируса МПВИ птиц либо ринотрахеита индеек в культуре клеток

Vero не выявлено.

7. Испытание на обнаружение (выявление) вируса инфекционной анемии цыплят

7.1 Готовят 11 образцов суспензий, каждая по 20 мл, перевиваемой линии клеток MDCC-MSBI или другой линии клеток с аналогичной чувствительностью, в колбах для клеточных культур с поверхностью культивирования 25 см², содержащих приблизительно 5×10^5 кл/мл.

7.2 Формируют группы для проведения испытаний:

- группа 1 – опытная группа (5 образцов);
- группа 2 – положительный контроль (4 образца);
- группа 3 – отрицательный контроль (2 образца).

7.3 В образцы группы 1 (опытной) вносят по 1 мл испытуемого материала в каждый образец.

7.4. В образцы группы 2 (положительный контроль) вносят вирус инфекционной анемии цыплят из расчёта 10 ТЦД₅₀ в 0,1 мл в каждый образец.

7.5 Оставляют 2 неинокулированных образца (группа 3) в качестве отрицательного контроля.

7.6 Все клеточные культуры культивируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течении 3-4 дней. Проводят 3 последовательных пассажа.

7.7 При культивировании пассажей присутствие вируса инфекционной анемии цыплят может быть обнаружено по метаболическому изменению окраски инфицированных культур, при этом культуральная жидкость приобретает более яркое красное окрашивание по сравнению с контрольными культурами.

7.8 Регулярно в течение всего периода инкубации проводят микроскопическое исследование всех культур клеток на наличие любого цитопатического эффекта. В случае обнаружения ЦПД или в конце инкубационного периода клетки из каждой колбы центрифугируют при низкой скорости вращения центрифуги и ресуспендируют до содержания приблизительно 10^6

кл/мл. По 25 мкл восстановленной суспензии помещают в каждую из 10 ячеек камеры Горяева. Клетки исследуют с помощью иммуноокрашивания (иммунофлюоресценции).

7.9 Испытание считают достоверным, если не менее чем в 3 из 4 образцах 2 группы (положительного контроля) обнаружено присутствие вируса инфекционной анемии цыплят.

7.10 В течение сроков инкубирования образцах группы 1 (опытной) и группы 3 (контрольной отрицательной) вирус инфекционной анемии цыплят должен отсутствовать.

7.11 Образцы вакцины соответствует требованиям испытания, если наличие вируса инфекционной анемии цыплят не выявлено.

8. Испытание на обнаружение (выявление) вируса лейкоза птиц

8.1 Готовят 13 образцов монослоя первичных или вторичных фибробластов эмбрионов кур из тканей эмбрионов 9-11 суточного возраста, генетическая восприимчивость которых к подгруппам А, В, J вируса лейкоза птиц была установлена и которые поддерживают рост экзогенных, но не эндогенных вирусов лейкоза птиц (подходящими являются клетки от С/Е штамма цыплят). Каждый монослой клеток должен иметь поверхность площадью приблизительно 25 см².

8.2 Формируют группы для проведения испытаний:

- группа 1 –опытная группа (5 образцов);
- группа 2 – положительный контроль вируса лейкоза птиц подгруппы А (2 образца);
- группа 3 – положительный контроль вируса лейкоза птиц подгруппы В (2 образца);
- группа 4 – положительный контроль вируса лейкоза птиц подгруппы J (2 образца);
- группа 5 – отрицательный контроль (2 образца).

8.3 В образцы группы 1 (опытной) вносят по 0,1 мл испытуемого материала в каждый образец. Оставляют в течение 1 ч. для обеспечения

адсорбции вируса, затем добавляют питательную среду.

8.4 В образцы группы 2, 3 и 4 (положительный контроль) вносят вирус лейкоза птиц из расчёта 10 ТЦД₅₀ в 0,1 мл в каждый образец.

8.5 Оставляют 2 неинокулированных образца (группа 4) в качестве отрицательного контроля.

8.6 Все клеточные культуры культивируют при температуре (37±0,5)°С в течение не менее 9 дней, выполняя пересевы с 3-4-дневными интервалами.

8.7 От каждого пассажа клетки сохраняют и собирают в конце общего инкубационного периода.

8.8 Клетки каждого уровня пассажа каждого монослоя промывают и ресуспендируют из расчета 10⁷ клеток/миллилитров забуференным барбиталом физиологическим раствором. Полученные образцы исследуют на присутствие вируса лейкоза в реакции связывания комплемента (РСК) или фосфатным забуференным физиологическим раствором для испытания с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (т-ИФА).

8.9 Проводят 3 цикла замораживания и оттаивания с целью высвобождения любого группоспецифического антигена и выполнения РСК или ИФА испытания на каждый экстракт для выявления группоспецифического антигена вируса лейкоза птиц.

8.10 Испытание считается достоверным, если группоспецифический антиген определяется в не менее чем 5 из 6 образцов положительного контроля.

8.11 Образцы соответствуют требованиям испытания, если наличие вируса лейкоза птиц не выявлено.

9. Испытание на обнаружение (выявление) вируса

ретикулоэндотелиоза птиц

9.1 Готовят 11 образцов монослоя первичных или вторичных фибробластов эмбрионов кур из тканей эмбрионов 9-11 суточного возраста, или фибробластов из тканей эмбрионов уток 13-14-суточного возраста каждый с площадью поверхности приблизительно 25 см².

9.2 Формируют группы для проведения испытаний:

- группа 1 –опытная группа (5 образцов);
- группа 2 – положительный контроль вируса ретикулоэндотелиоза птиц (4 образца);
- группа 3 – отрицательный контроль (2 образца).

9.3 В образцы группы 1 (опытной) вносят по 0,1 мл испытуемого материала в каждый образец. Оставляют в течение 1 ч. для обеспечения адсорбции вируса, затем добавляют питательную среду.

9.4. В образцы группы 2 (положительный контроль) вносят вирус ретикулоэндотелиоза птиц из расчёта 10 ТЦД₅₀ в 0,1 мл в каждый образец.

9.5 Все клеточные культуры культивируют при температуре (37±0,5)°С в течение не менее 10 дней, выполняя пересевы с 3-4-дневными интервалами с ежедневной микроскопией.

- при последнем пересеве полученные образцы исследуют на присутствие вируса ретикулоэндотелиоза птиц с помощью иммунофлюоресценции (РИФ).

9.6 Испытание считают достоверным, если не менее чем в 3 из 4 образцах 2 группы (положительного контроля) обнаружено присутствие вируса ретикулоэндотелиоза птиц

9.7 Образцы соответствуют требованиям испытания, если наличие вируса ретикулоэндотелиоза птиц не выявлено.

10. Испытание на обнаружение (выявление) вируса энтерита уток

10.1 Испытание проводится для исследуемого материала, изготовленного на культурах клетках утиных эмбрионов.

10.2 Готовят 11 образцов монослоя первичных или вторичных клеток печени эмбрионов мускусной утки из тканей эмбрионов 21-22 суточного возраста, каждый с площадью поверхности приблизительно 25 см².

10.3 Формируют группы для проведения испытаний:

- группа 1 –опытная группа (5 образцов);
- группа 2 – положительный контроль (4 образца);

- группа 3 – отрицательный контроль (2 образца).

10.4 В группе 1 (опытной) культуральную среду удаляют, когда клетки сформируют сплошной монослой, и вносят по 1 мл испытуемой вакцины в каждый образец. Оставляют "на контакт" для обеспечения адсорбции вируса на 1 ч, затем вносят питательную среду.

10.5 В группе 2 (положительный контроль) культуральную среду удаляют, когда клетки сформируют сплошной монослой, и вносят подходящий штамм вируса энтерита уток (из расчёта не более 10 ТЦД₅₀ в 0,1 мл) в каждый образец. Оставляют "на контакт" для обеспечения адсорбции вируса на 1 ч., затем вносят питательную среду.

10.6 В группе 3 (отрицательный контроль) ростовую среду заменяют на питательную.

10.7 Инкубируют опытные и контрольные образцы при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С в течении 4-5 дней с ежедневной микроскопией.

10.8 Проводят 3 последовательных пассажа. Каждый пассаж выполняют следующим образом: клетки трипсинизируют, готовят отдельные пулы клеток от каждой из трех групп. Соответствующее количество каждого из пулов с суспензией свежеприготовленных первичных/вторичных клеток печени эмбрионов мускусной утки вносят по 1 мл в свежеприготовленные образцы монослоя, как описано выше.

10.9 Полученные образцы монослоя исследуют на присутствие вируса энтерита уток с помощью иммуноокрашивания (иммунофлюоресценции).

10.10 Испытание считают достоверным, если не менее чем в 3 из 4 образцах 2 группы (положительного контроля) обнаружено присутствие вируса энтерита уток.

10.11 В течение сроков инкубирования в образцах группы 1 (опытной) и группы 3 (контрольной отрицательной) вирус энтерита уток должен отсутствовать.

10.12 Образцы соответствуют требованиям испытания, если наличие вируса энтерита уток не выявлено.

11. Испытание на обнаружение (выявление)

парвовирусов уток и гусей

11.1 Испытание выполняется для исследуемого материала, изготовленного на культурах клетках от утиных или гусиных эмбрионов.

11.2 Готовят суспензию первичных и вторичных фибробластов эмбрионов мускусовой утки из тканей эмбрионов 16-18-суточного возраста в количестве, достаточном для получения не менее 11 образцов монослоя клеток с площадью каждого образца приблизительно 25 см².

11.3 Формируют группы и проводят испытания, как описано в п. 5.2-5.7 данной общей фармакопейной статье, с некоторыми специфическими изменениями:

- в образцы группы 2 (положительный контроль) вносят подходящий штамм парвовируса уток из расчёта не более 10 ТЦД₅₀ в 0,1 мл, по 0,4 мл в каждый образец;

- полученные образцы исследуют на присутствие парвовируса уток с помощью иммуноокрашивания (иммунофлюоресценции).

11.4 Испытание считают достоверным, если не менее чем в 3 из 4 образцах 2 группы (положительного контроля) обнаружено присутствие парвовируса уток.

11.5 В течение сроков инкубирования в образцах группы 1 (опытной) и группы 3 (контрольной отрицательной) парвовирус уток должен отсутствовать.

11.6 Образцы соответствуют требованиям испытания, если наличие парвовируса уток не выявлено.

12. Испытания на обнаружение (выявление) посторонних агентов с использованием цыплят

12.1 Испытание проводится как альтернативный метод, или в дополнении к *in vitro* испытаниям (если нет других указаний в фармакопейных

статьях).

12.2 Десяти СПФ-цыплятам либо цыплятам, полученным от стад здоровых кур, 14-сут. возраста вводят испытуемый образец внутримышечно в дозе, эквивалентной 100 иммунизирующим дозам данного исследуемого материала и не менее чем 10 цыплятам - интраокулярно в дозе, эквивалентной 10 дозам исследуемого материала. В случае, если вакцинный вирус является патогенным для птиц этого возраста, могут использоваться птицы более старшего возраста, если это требуется и обосновано. За цыплятами наблюдают в течение 21 дня. В течение периода испытания цыплятам запрещено вводить любые противомикробные вещества.

12.3 В конце периода испытания отбирают пробы крови от каждого цыпленка, получают сыворотку крови по общепринятой методике. Каждый образец сыворотки исследуют на наличие антител к каждому из возбудителей, указанных в п. 12.6 (за исключением вируса, входящего в состав вакцины).

12.4 Для проведения дополнительных (повторных) испытаний рекомендуется сохранять полученные сыворотки крови от данных птиц в замороженном виде при температуре не выше минус 20°C.

12.5 Образцы вакцины соответствуют требованиям контроля, если в течение испытания у цыплят отсутствуют клинические признаки заболеваний, отличные от симптомов, вызываемых вирусом, входящим в состав вакцины, а также не выявляются антитела к инфекциям птиц, за исключением антител к вирусу, входящему в состав вакцины.

12.6 Стандартные методы испытания на наличие антител в сыворотке крови цыплят:

Возбудитель	Метод анализа
Аденовирусы птиц, 1 группа	РН, РДП, ИФА
Вирус синдрома снижения яйценоскости (аденовирус птиц, 3 группа)	РТГА, ИФА
Вирус энцефаломиелита птиц	РДП, ИФА
Вирус инфекционного бронхита кур	ИФА
Вирус инфекционного ларинготрахеита птиц	РН, ИФА, РИФ
Вирус лейкоза птиц	РСК, ИФА

Реовирус птиц	РИФ, ИФА
Вирус инфекционной анемии цыплят	РИФ, ИФА, РН
Вирус инфекционной бурсальной болезни	РДП, ИФА, РН
Вирус гриппа птиц (видовой) тип А	РДП, ИФА, РТГА
Вирус болезни Марека	РДП
Вирус болезни Ньюкасла	РТГА, ИФА
Метапневмовирус птиц (ринотрахеит индеек)	ИФА

РДП- реакция диффузионной преципитации в агаровом геле

ИФА- иммуноферментный анализ

РТГА- реакция торможения гемагглютинации

РИФ- реакция иммунофлюоресценции

РН- реакция нейтрализации

РСК – реакция связывания комплемента

12.7 Дополнительные испытания на выявление посторонних возбудителей в препаратах против вирусных болезней индеек

Испытание на отсутствие лимфопролиферативного вируса индеек проводится путем внутрибрюшинного введения испытуемого образца 12 птенцам 4-суточного возраста в 10-кратной иммунизирующей дозе. За индюшатами наблюдают в течение 40 дней. Испытание считается недостоверным, если за данный период более 20 % индюшат погибли вследствие неспецифических причин (расклёв, травмы и пр.). Образцы соответствуют требованиям испытания, если отсутствуют макроскопические и микроскопические патологические изменения во фрагментах селезенки и зубной железы, отобранных у индюшат по завершении опыта (за исключением тех, что связаны с вирусом, входящим в состав вакцины).

12.8 Дополнительные серологические испытания на выявление посторонних возбудителей в препаратах против вирусных болезней уток и гусей проводятся в соответствии с п. 12.2 и 12.3.

12.8.1 Если вирусная вакцина имеет происхождение от инфекционного агента, вызвавшего заболевание уток, или вирус культивировался в эмбрионах или культурах клеток утки, проводятся испытания на наличие

антител в сыворотках крови к следующим возбудителям:

Возбудитель	Метод анализа
Парвовирусы гусей и уток	РН, ИФА
Вирус энтерита уток	РН

12.8.2 Образцы отвечают требованиям испытания, если не обнаружено наличие любого постороннего агента. При наличии антител к указанным возбудителям дальнейшие испытания проводятся в соответствии с п. 1.12.

12.8.3 Испытуемый образец в дозе, эквивалентной не менее 10 иммунизирующим дозам, вводят подкожно 10 восприимчивым гусятам суточного возраста. Гусят наблюдают в течение 28 дней. Испытание считается недостоверным, если более 20 % гусят погибли вследствие неспецифических причин.

12.8.4 Образцы отвечают требованиям испытания, если ни один из гусят не погиб по причинам, связанным с введением вакцины.

13. Испытания образцов вакцин против болезней сельскохозяйственных животных на контаминацию посторонними вирусами

13.1 При проведении испытаний на наличие чужеродных вирусов, главного посевного материала (Master Seed), исследуют на наличие пестивирусов: вирусная диарея КРС (BVDV) и/или классическая чума свиней (CSFV) и/или вирус пограничной болезни овец (BDV), а так же на другие вирусные агенты специфических инфекционных возбудителей, характерных для вида, от которого получены перевиваемые клетки и для вида, которому предназначена вакцина.

13.2 При проведении испытаний на наличие контаминации чужеродными вирусами готовой продукции проводят исследования на исключение присутствия пестивирусов. Другие вирусные контаминанты контролируются, если это указано в фармакопейной статье.

Исключение присутствия цитопатических вирусов проводится методом ПЦР (общая фармакопейная статья «Полимеразная цепная реакция»)

и/или ИФА (общая фармакопейная статья «Метод иммуноферментного анализа») и в случае положительного результата, проводят испытания на культурах клеток.

13.3 *Обнаружение цитопатических вирусов.*

Смесь «вирус+сыворотка», приготовленную по п. 1.6, вносят в культуры требуемых видов клеток (с высокой чувствительностью к вирусам, патогенным для телят, поросят и овец), с площадью поверхности монослоя по крайней мере 25 см² (не менее 3 образцов). Заражение культур может производиться на любой подходящей стадии роста, до образования 70-100 % сплошного монослоя. По крайней мере 1 образец монослоя каждого типа клеток должен сохраняться в качестве контроля. Культуры инкубируют при температуре (37±0,5)°С и ежедневно, в течение срока инкубирования проводят микроскопическое исследование всех культур клеток. По окончании этого периода культуры подвергают 3 циклам замораживания-оттаивания, центрифугируют для удаления остатков клеток в течение 15 мин при 1500 об/мин и производят пересев на клетки того же типа, что использовались первично.

Два образца монослоя окрашивают соответствующим цитологическим красителем. Один образец монослоя клеток должен сохраняться в качестве контроля. Вся область каждого окрашенного образца монослоя исследуется на наличие любых телец-включений, появления большого количества гигантских клеток или любых других повреждений клеток, которые могут быть вызваны посторонними агентами. Данные изменения в клетках монослоя должны отсутствовать. При микроскопическом исследовании клетки монослоя проверяемого образца должны быть такие же, как и в контрольном образце.

13.4 *Обнаружение нецитопатических вирусов.*

Зараженную культуру клеток в соответствии с п. 13.3 обрабатывают соответствующими флуоресцирующими антителами или подобными реактивами. При микроскопическом исследовании клетки монослоя проверяемого образца должны быть такие же, как и в контрольном образце.

13.5 *Обнаружение гемадсорбирующих вирусов.* Гемадсорбирующими свойствами обладают вирусы гриппа, вирус ПГ-3 и некоторые штаммы парвовирусов крупного рогатого скота и др. Чтобы наблюдать возможную гемадсорбцию, из образцов с зараженной культурой клеток удаляют культуральную жидкость и вносят 0,5%-ную взвесь эритроцитов (для вируса ПГ-3 — эритроциты морской свинки, для вирусов гриппа — эритроциты кур), оставляют на 5-10 мин., затем эритроциты со слоя клеток удаляют ополаскиванием физиологическим раствором. В зараженной культуре под малым увеличением микроскопа можно видеть эритроциты, адсорбированные на поверхности клеток, в которых идет репродукция вируса. В контрольных (незараженных) культурах клеток таковые должны отсутствовать.

13.6 *Обнаружение гемагглютинирующих вирусов.* Исследуемые образцы объединяют с достаточным объемом суспензии эритроцитов, соответствующих определяемому контаминирующему агенту. Агглютинация в проверяемых образцах, изготовленных из неагглютинирующих вирусов, должна отсутствовать.

13.7 *Обнаружение специфических вирусов.* Проводятся испытания на отсутствие определенных видоспецифических инфекционных возбудителей, характерных для вида, от которого получены клетки, и для вида, для которого предназначена вакцина. Получают достаточное для проведения испытаний на специфические агенты количество клеток. В каждом испытании дополнительно используется отрицательный контроль. Клетки подвергаются соответствующим испытаниям, например, с использованием антител, конъюгированных с флуоресцеином или подобными реактивами. Специфические вирусы в образцах проверяемых вакцин должны отсутствовать.

13.8 При наличии в образцах проверяемых вакцин или в главном посевном материале (MS) чужеродных вирусов дальнейшие испытания проводятся в соответствии с п. 1.12.

13.9 Допускается использование и других методы испытаний на

наличие контаминации посторонними вирусами, помимо описанных в данном разделе, которые должны быть валидированы и обладать соответствующей специфичностью и чувствительностью.