

## ГЛАВА 1.1.9.

### **ТЕСТИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ, НА СТЕРИЛЬНОСТЬ И СВОБОДУ ОТ КОНТАМИНАЦИИ**

#### **ВВЕДЕНИЕ**

*Передвижения биологических материалов, предназначенных для ветеринарного использования, в рамках международных торговых операций, регулируются ограничительными мерами с целью минимизации рисков распространения патогенов, вызывающих болезни животных и людей. Страны могут на свое усмотрение устанавливать требования о проведении тестирования с целью подтверждения свободы от патогенов, прежде чем выдавать разрешение на импорт материалов животного происхождения и веществ, содержащих такие материалы. Если неуместно или неэффективно проводить химические или физические обработки, или если не хватает доказательств эффективности применяемой обработки, то компетентные органы стран, получающих такие материалы, могут ввести общие или специальные требования к тестированию. В данной главе представлено руководство по регламентированному тестированию, которое в частности может применяться в случае передвижений исходного посевного материала для производства вакцины и исходных клеточных запасов и соответствующих биологических материалов, используемых в производственных процессах. Термин посевные материалы используется при тестировании «живых» продуктов, для «убитых» продуктов предпочтительней использовать термин исходные клеточные запасы. Несмотря на то, что обеспечение безопасности продукта остается обязанностью производителя и может регламентироваться соответствующими лечебно-профилактическими руководствами, в данной главе описаны процедуры, которые призваны в частности минимизировать риски наличия нераспознанных контаминантов в лечебно-профилактических препаратах ветеринарного назначения и в биологических препаратах, способных стать причиной трансграничного распространения возбудителей, являющихся объектом обеспокоенности для конкретных стран-импортеров. В данной главе не рассмотрены вопросы контроля контаминации возбудителями трансмиссивной губкообразной энцефалопатии (ТГЭ), так как физические и химические обработки не смогут обеспечить свободы от этих возбудителей.*

*Стерильностью называют отсутствие живых микроорганизмов, в данной главе к ним относят, в том числе, и вирусы. Состояние стерильности достигается с помощью методов асептической обработки и валидированных методов стерилизации, а именно: нагревания, фильтрации, химической обработки или ионизирующего излучения, в зависимости от поставленной цели. Свободой от контаминации называют отсутствие специфических живых микроорганизмов. Состояния свободы от контаминации можно достичь, отбирая материалы из источников свободных от специфически микроорганизмов, и путем проведения последующих процедур в асептических условиях. Адекватно гарантировать стерильность и свободу от контаминации можно только при надлежащем контроле используемых первичных материалов и контроле их последующей обработки. Для успешного контроля необходимо тестирование промежуточных продуктов в ходе производственного процесса.*

*Биологические материалы, которые подвержены контаминации, но стерилизовать которые до или во время производства вакцины невозможно (например, компоненты животного происхождения: сыворотка и трипсин, первичные и перевиваемые клетки и клеточные линии и вирусные или бактериальные посевные материалы, и пр.), следует тестировать на наличие живых посторонних организмов до использования. Выявить вирусные контаминанты, если*

таковые имеются, можно с помощью культуральных методов и при поддержке метода выявления цитопатогенного действия (ЦПД), методик флуоресцирующих антител и иных подходящих методов, таких как ПЦР (полимеразная цепная реакция) и твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Ниже в этой главе объясняется, что необходимо внимательно следить за процедурой применения ПЦР И ELISA с целью выявления, поскольку эти тесты не позволяют отличить выявление живых и неживых возбудителей.

Для выявления вирусов болезней птиц необходимо вводить материалы от птиц и вакцины в первичные клеточные культуры или яйца. Для увеличения вероятности выявления рекомендуется использовать сочетание общепринятых тестов, например для выявления гемадсорбирующих, и гемагглютинирующих и цитопатогенных свойств вируса, и специфических процедур, нацеленных на рост и выявление специфических вирусов.

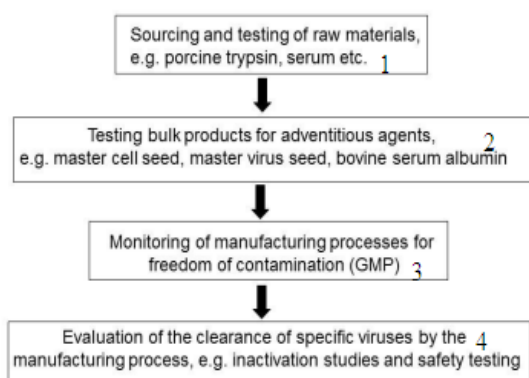
Здесь также описаны методы выявления других контаминантов: бактерий, грибов, простейших, риккетсий и микоплазм.

Применяемые процедуры должны быть валидированы и признаны подходящими для целей, обозначенных в Главе 1.1.6 Принципы и методы валидации диагностических тестов для инфекционных болезней, по мере возможности. Предоставление репрезентативной выборки и количества позиций для тестирования является обязанностью заказчика. Применяются принципы из Приложения 1.1.2.1 Эпизоотологические подходы к процессу отбора проб: расчеты размера образца (Глава 1.1.2 Сбор, подача и хранение диагностических образцов). Надлежащие процедуры транспортировки описаны в Главе 1.1.2 и Главе 1.1.3 Транспортировка образцов животного происхождения.

## А. ОБЗОР ОСНОВНЫХ ПОДХОДОВ К ПРОВЕДЕНИЮ ИСПЫТАНИЙ

1. Отбор первичных материалов следует производить из источников, в отношении которых показано, что они свободны от контаминации, манипуляции с первичными материалами следует осуществлять таким образом, чтобы минимизировать контаминацию и возможность размножения любых контаминантов (Рисунок 1).
2. Работать с материалами, которые еще не прошли стерилизацию или подлежат дальнейшей переработке после стерилизации, следует в асептических условиях. В отношении таких материалов на определенных этапах производства потребуется дополнительная оценка их свободы от контаминантов, гарантирующая чистоту от занесенных агентов.

**Рисунок 1.** Алгоритм тестирования для производства вакцины



1. Поиск и тестирование сырья, например, свиной трипсин, сыворотка и пр.)

2. Тестирование балк-продукта на наличие занесенных агентов, например, исходный клеточный посевной материал, исходный вирусный посевной материал, альбумин сыворотки КРС

3. Мониторинг процессов производства на предмет свободы от контаминации (GMP)

4. Оценка очищения специфических вирусов в ходе производственного процесса, например, исследования по инактивации и тесты на безопасность

3. Материалы, которые можно стерилизовать без лишнего отрицательного воздействия на их биологическую активность, следует подвергать стерилизации методом, который эффективен для указанных патогенов. Используемый метод должен снижать уровень контаминации до неподдающихся выявлению величин, что определяется с помощью соответствующего теста на стерильность (смотри Раздел D.1 ниже). Если используется процесс стерилизации, его следует валидировать для демонстрации его пригодности для указанных целей. Для мониторинга эффективности принимаемых мер в каждый процесс стерилизации включается подходящий вариант проверки.
4. Окружающая среда, в которой проводится любая асептическая манипуляция, должна поддерживаться в чистом состоянии и должна быть защищена от внешних источников контаминации, она должна контролироваться с тем, чтобы предотвратить внутреннюю контаминацию. Правила, регулирующие асептическое производство вакцин перечислены в Главе 3.7.1. *Минимальные требования к организации и управлению предприятия по производству вакцин.*
5. Некоторые процедуры прошли надлежащую валидацию и признаны соответствующими целевому назначению, в то время как другие прошли лишь ограниченную валидацию. Например, методы тестирования на стерильность (свободу от бактериальной и грибковой микрофлоры) не были официально валидированы, хотя и применяются уже долгие годы. В частности, *in-vivo* методы и методы на культуре клеток имеют, по сути, неизвестную чувствительность и специфичность (Sheets et al, 2012), хотя установлена теоретически принятая чувствительность – 1 колониеобразующая единица (КОЕ). Например, оценка методов выявления вирусов КРС и свиней в сыворотке и трипсине на основе Кодекса федеральных регламентов США, Раздел 9 выявила пробелы в чувствительности, даже в рамках семейств вирусов (Marcus-Secura et al., 2011). Следовательно, интерпретировать результаты надлежит исходя из специальных условий и с учетом чувствительности и специфичности системы выявления.
6. Более новые и чувствительные методы молекулярного тестирования позволяют выявлять контаминанты, которые в обычных системах культивирования могут амплифицироваться не достаточно продуктивно. Диапазон выявления можно расширить за счет применения правильно выработанных праймеров и зондов специфических для семейства. Однако большинство таких новых тестов, если не все, способно выявлять признаки наличия **неинфекционных** контаминантов, например, остатки нуклеиновых кислот от неактивированных контаминантов. Для определения природы контаминанта потребуется дополнительное контрольное тестирование, например, для неинфекционной нуклеиновой кислоты или инфекционного вируса. Исправить ситуацию возможно с помощью попыток выделения вируса или секвенирования. Примечание: Если молекулярные тесты разработаны таким образом, что не соответствуют целевому назначению, то они могут не выявить контаминирующие агенты или таким тестам может не хватать чувствительности (Hodinka, 2013).

Высокопроизводительное метагеномное секвенирование (HTS) недавно продемонстрировало свою способность контролировать качество биологических продуктов (van Borm et al., 2013) и вакцин (Baylis et al., 2011; Farsang & Kulcsar, 2012; Neverov & Chumakov, 2010; Onions & Kolman, 2010; Victoria et al., 2010), в частности для идентификации и характеристики в крайне степени отличающихся вариантов патогенов (Miller et al., 2010; Rosseel et al., 2011), которые могут быть не выявлены в ходе целевых диагностических тестов.

Тем не менее, целевые исследования, например, амплификация в культуре клеток с последующей ПЦР, могут превосходить по качеству HTS, если речь идет о выявлении специфических агентов (Wang et al., 2014), из-за нехватки чувствительности HTS. Аналогичным образом недавнее повышение эффективности процесса разделения белков и пептидов и высокоточной масс-спектрометрии повысило качество идентификации и количественного определения белков в заданном образце. Большинство указанных новых технологий является инструментами широкого скрининга, ограничением в применении которых является тот факт, что они не могут устанавливать различия между живыми и неживыми организмами.

## **V. ЖИВЫЕ ВИРУСНЫЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ ИНЪЕКЦИИ**

1. Материалы животного происхождения должны быть (а) стерилизованы или (б) получены от здоровых животных, в отношении которых по возможности должно быть продемонстрировано с помощью тестов на наличие посторонних агентов, что они свободны от патогенов, которые могут передаваться от видов происхождения видам, подлежащим вакцинации, или другим видам, контактирующим с ними.
2. Необходимо продемонстрировать, что посевные партии вируса или любые перевиваемые линии клеток, используемые для выращивания вируса, свободны от бактерий, грибов, микоплазм, простейших, риккетсий, посторонних вирусов и других патогенов, которые могут передаваться от видов происхождения видам, подлежащим вакцинации, или другим видам животных, находящимся в контакте с ними. Для производства вакцин на куриных эмбрионах и процедуру контроля качества таких вакцин рекомендуется (требуется многими странами) использоваться яйца от СПФ птиц.
3. Каждую партию вакцины необходимо тестировать на свободу от посторонних агентов методами, которые отвечают национальным требованиям к утверждению вакцины для использования. Опубликованные методы, описывающие допустимые процедуры тестирования в различных странах включают: (США) Кодекс федеральных регламентов (2015); Европейская фармакопея (2014); документацию Европейской Комиссии (2006); ВОЗ (1998, 2012) и Министерства сельского хозяйства Австралии (2013).
4. Тесты на стерильность целесообразно проводить для подтверждения свободы вакцины от посторонних агентов, бактерий, включая риккетсию и микоплазмы, грибов и простейших. В каждой стране свои требования относительного, какие агенты необходимо полностью исключить и какими процедурами пользоваться. К таким процедурам относятся амплификация жизнеспособных посторонних агентов за счет использования культуры клеток, чувствительной к определенным вирусам видов, представляющих интерес; тесты на яйцах с эмбрионами, методики культивирования бактерий, микоплазм и грибов, и при необходимости тесты с прививанием животных. С целями выявления (после амплификации с использованием методик культивирования) применяются ПЦР, метод флюоресцирующих антител (МФА), наличие колоний или цитопатогенное действие (ЦПД) и твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Если невозможно провести *in-vitro* или *in-vivo* амплификацию целевого агента, то можно использовать прямую ПЦР, если она валидирована для данной цели.

## **C. ЖИВЫЕ ВИРУСНЫЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ, РАСПЫЛЕНИЕМ ИЛИ ПОСРЕДСТВОМ СКРИФИКАЦИИ КОЖИ**

1. Применяется Раздел В.
2. Может быть разрешено присутствие ограниченного количества контаминирующих,

непатогенных бактерий и грибов (смотри Раздел I.2.2 *Общие процедуры тестирования живых вирусных вакцин, произведенных на эмбрионах птиц и введенных с питьевой водой, распылением или посредством скарификации кожи, на наличие бактерий и грибов*).

#### **D. ИНАКТИВИРОВАННЫЕ ВИРУСНЫЕ ВАКЦИНЫ**

1. Каждая партия вакцины должна проходить тест на инактивацию вакцинного вируса, который должен включать исследования инактивации репрезентативных посторонних агентов, если вирусный посевной материал еще не был протестирован и нет подтверждения того, что он свободен от посторонних агентов. Пример простой инактивации может включать оценку титров живой вакцины до и после инактивации и оценку снижения  $\log_{10}$  в титре во время процесса инактивации. Доказано, что методы титрации вируса могут обладать недостаточной чувствительностью для обеспечения полной инактивации. В этих обстоятельствах необходимо разработать и валидировать специфический тест на безвредность, отличающийся большей чувствительностью. В зависимости от вируса для увеличения чувствительности может потребоваться больше одного пассажа. Пример данного подхода можно найти по ссылке [https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/vet\\_biologics/publications/memo\\_800\\_117.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/memo_800_117.pdf).
2. Если требуется изучение репрезентативных посторонних агентов, то полезным будет обогащение инактивированной вакцины живыми репрезентативными агентами и следование примеру исследования на инактивацию в пункте D.1. Процесс инактивации и тесты, используемые для выявления живого вируса после инактивации должны быть валидированы, и необходимо подтверждение их соответствия поставленной цели. Кроме того, в каждой стране могут быть особые требования к подбору источников и проведению тестирования на стерильность, как описано выше в Разделе В.

#### **E. ЖИВЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ВАКЦИНЫ**

1. Применяется Раздел В.
2. Необходимо подтверждение того, что посевные партии бактерий свободны от других бактерий, грибов, микоплазм, простейших, риккетсий и посторонних вирусов. Список агентов, присутствие которых должно быть исключено, устанавливается страной, которая принимает вакцину к использованию. Для обеспечения чувствительности тестирования в культуре рекомендуется применить антибиотики для «инактивации» живого бактериального посевного материала или вакцины до исключения вирусов и грибов. Рекомендуется исследование на интерференцию, гарантирующее, что используемые антибиотики не влияют на рост числа посторонних вирусов и грибов, присутствие которых необходимо исключить.
3. Из-за сложностей и сниженной чувствительности при исключении посторонних бактерий и некоторых микоплазм, простейших и риккетсий из посевных партий бактерий с высокими показателями титров, рекомендуется использовать антибиотики узкого спектра действия, предназначенные специально для уменьшения посевной партии бактерий, если антибиотики не влияют на рост бактерий, подлежащих исключению. Оптимальную концентрацию антибиотиков можно определить в эксперименте на разведение, который описан в 9CFR Разделе 113.25(d). К другим методам исключения посторонних бактерий из бактериального посевного материала можно отнести фильтрацию по размеру, предполагающее удаление бактериального посевного материала с целью выявления контаминации микоплазмой, и использование селективных культуральных сред. Эти процессы необходимо валидировать, чтобы процесс не влиял на чувствительность исключения посторонних агентов.
4. Методики прямой ПЦР могут быть полезными, если процессы культивирования не обладают

необходимой чувствительностью для выявления посторонних бактерий в живом бактериальном посевном материале или вакцинах.

## **Г. ИНАКТИВИРОВАННЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ВАКЦИНЫ**

1. Применяется Раздел D. Необходимо провести тестирование на наличие посторонних вирусов, которые не будут расти в бактериальной культуральной среде, поскольку оно обеспечивает свободу от контаминации всех исходных материалов. Полную инактивацию вакцинных бактерий следует подтвердить с помощью титрации и тестов на безвредность – в некоторых случаях достаточно общего тестирования на стерильность (свободу от бактериальной микрофлоры).

## **Г. СЫВОРОТКИ и диагностические агенты ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫМ**

1. Применяется Раздел В.1 для неинактивированных сывороток.
2. Некоторые страны требуют карантина, сертификации здоровья и проведения тестов на специфические болезни в отношении всех животных - доноров сыворотки. Например, 9CFR (2015) и Стратегия карантина и требования Австралии к импорту живых вакцин, как недавно разработанных вакцин для животных, так и уже готовых (1999).
3. Рекомендуются, чтобы каждую партию неинактивированной сыворотки оценивали на наличие живых посторонних агентов, включая микоплазмы. Каждую партию сыворотки необходимо тестировать на наличие посторонних агентов. Для каждой страны опубликован список подходящих тестов, например, в Европейской фармакопее (2014); 9CFR (2015) и в Стратегии карантина и требованиях Австралии к импорту живых вакцин, как недавно разработанных вакцин для животных, так и уже готовых (1999) и документации департамента с/х (Австралии) (2013).
4. Инактивированная сыворотка, применяется Раздел D.
5. Можно применять разделы D и В, если в производстве диагностического агента используется какой-либо вирус; если применяется бактерия, то можно воспользоваться положениями Разделов Е и F.

## **Н. ЭМБРИОНЫ, ЯЙЦЕКЛЕТКИ И СПЕРМА**

При использовании эмбрионов, яйцеклеток и спермы необходимо соблюдать специальные меры предосторожности (Nage, 1985).

В большинстве стран действуют нормативные рекомендации для импорта данных биологических материалов для ветеринарного использования. Данные руководства можно найти на различных сайтах Европейской Комиссии и ФАО, хотя многие из этих рекомендации более полно изложены в контексте документации по пищевой безопасности.

## **І. ПРИМЕРЫ ПРОТОКОЛОВ**

## 1. Общие процедуры

По сути, предлагаемый вариант тестирования представляет собой попытку выделения жизнеспособных агентов в системах культивирования, которые считаются поддерживающими рост каждого конкретного агента или группы общих агентов. После амплификации потенциальные патогены можно при необходимости выявить с помощью чувствительных и специфических диагностических тестов (МФА или ПЦР). К общим системам выявления относятся методы гемадсорбции и ЦПД с помощью иммуногистохимического окрашивания. Описанные ниже примеры процедур тестирования на стерильность и процедур общего выявления жизнеспособных бактерий, микоплазм, грибов и вирусов взяты из стандартов 9CFR (2015), Европейской фармакопеи (2014), документации Европейской Комиссии (2006), ВОЗ (1998, 2012).

Отдельные страны или регионы должны воспользоваться подходом на основе оценки риска, чтобы установить подходящие тестовые протоколы, исходя из своей эпизоотической ситуации. Наряду с применением общих процедур тестирования, описанных в национальных и региональных стандартах (как описано выше), может быть необходимым применение тестирования на определенные агенты, подлежащие строжайшему исключению. Такие агенты являются экзотическими для конкретной страны или региона.

Общие процедуры не обязательно выявляют все посторонние агенты, которые могут присутствовать в биологических материалах; однако в качестве скрининговых тестов они весьма полезны. Некоторые агенты, для выявления которых в биологических материалах требуются специальные методы, указаны в Таблице 1. Процедуры, перечисленные в *Обзоре опубликованных тестов для выявления патогенов в ветеринарных вакцинах, предназначенных для импорта в Австралию* (2013) (предоставлено Министерством с/х и водных ресурсов Австралии) способны выявить такие агенты за счет чувствительных подходов, основанных на авторитетных научных статьях.

Исключение специфических агентов требует процедур, отличающихся максимальной чувствительностью, достичь которую можно за счет идеальной амплификации и выявления обсуждаемого патогена. Сложно вычислить такие посторонние агенты, как вирус Меди-Висна, вирус иммунодефицита КРС, *Tyranosoma evansi* и респираторный коронавирус свиней даже с помощью самых чувствительных методов. В такой ситуации, в качестве альтернативы можно воспользоваться молекулярными методами в отношении биологических материалов для оценки наличия нуклеиновой кислоты от занесенных агентов. См. таблицу 1. Необходимо учитывать (как сказано в Разделе А.6) , что нежизнеспособные агенты могут также быть обнаружены с помощью данной процедуры.

В таблице 1 даны некоторые примеры инфекционных агентов, которые могут присутствовать в биологических материалах от животных, предназначенных для ветеринарного использования. Это далеко не полный перечень агентов, который также не является списком агентов, исключения которых требует каждая страна, здесь просто приведены примеры инфекционные агенты, которые не поддаются культивированию с использованием общих процедур культивирования и которые требуют более специфических процедур выявления с помощью непрямого МФА, ПЦР или ИФА (если применимо). Например, аденовирус КРС подгруппы 1 (серотипы 1, 2, 3 и 9) могут быть легко выделены с помощью общих методов (культура клеток Vero), однако аденовирусы КРС подгруппы 2 (серотипы 4,5,6,7,8 и 10) требуют специальных методов выделения.

**Таблица 1.** *Примеры некоторых инфекционных агентов ветеринарного значения, требующих специальных методов культивирования и выявления*

Ротавирусы	Пестивирусы (не ЦПД)	Ринотрахеит индеек
Вирус эпидемической диареи свиней	Вирус блутанга	<i>Brucella abortus</i>
Цирковирусы свиней (ЦВС 1,	Вирус оспы свиней	Риккетсии

2)		
Грипп свиней /лошадей, некоторые штаммы	Некоторые аденовирусы	Простейшие
Синцитиальный респираторный вирус КРС	Вирус бешенства	Некоторые грибы (например, гистоплазмы)

## 2. Обнаружение бактерий и грибов

### 2.1. Общая процедура обнаружения оценки стерильности (отсутствие жизнеспособных бактерий и грибов)

Стандартными тестами для обнаружения посторонних бактерий и грибов (тесты на стерильность) в сырьевых материалах, исходном клеточном материале или конечном продукте являются метод мембранной фильтрации и тест на стерильность посредством прямой инокуляции.

Для метода мембранной фильтрации следует использовать фильтр с номинальным размером пор не более 0,45 мкм и минимальным диаметром 47 мм. Для водного или масляного материала следует использовать нитроцеллюлозные фильтры. Если материал представляет собой вещество с высоким содержанием спирта, масла или с добавлением масляного адьюванта, следует использовать ацетатцеллюлозные фильтры. Непосредственно перед фильтрованием содержимого контейнера или контейнеров, подлежащих тестированию, фильтр увлажняют 20-25 мл разбавителя А или В.

#### 2.1.1. Разбавитель А

Разбавитель А предназначен для водных продуктов или материалов. Растворить 1 г пепсинового перевара ткани животного в воде до получения 1 литра, фильтровать и центрифугировать для осветления, установить рН на отметке 7,1 ±0,2, распределить по контейнерам в количествах по 100 мл и стерилизовать паром.

#### 2.1.2. Разбавитель В

Разбавитель В предназначен для продуктов или материалов с масляным адьювантом. Добавить 1 мл полисорбата 80 к 1 литру разбавителя А, установить показатель рН на отметке 7,1 ±0,2, распределить по контейнерам в количествах по 100 мл, стерилизовать паром.

Если тестируемый биологический материал обладает антимикробными свойствами, после нанесения пробы мембрану промывают три раза приблизительно 100 мл соответствующего разбавителя (А или В). Затем мембрану целиком переносят в культуральные среды, асептически разрезают на равные части и помещают в среды, или среды переносят на мембрану в фильтровальном приборе. Если тестируемая проба содержит мертиолат в качестве консерванта, используется жидкая тиогликолевая среда (FTM) и мембраны инкубируют как при 30-35°C, так и при 20-25°C. Если тестируемая проба представляет собой инактивированный «убитый» биологический материал без мертиолата в качестве консерванта, то жидкая тиогликолевая среда используется при 30-35°C, а среда на основе соевого казеинового перевара (SCDM) при 20-25°C. Если тестируемая проба является биологическим препаратом, содержащим живой вирус, то среда на основе соевого казеинового перевара (SCDM) используются при обеих температурах инкубации. Недавно было предложено использовать сульфит-полимиксин-сульфадиазиновый агар для повышения уровня обнаружения *Clostridium* spp. при применении метода мембранной фильтрации (Tellez et al., 2005).

Если был выбран метод прямой инокуляции культуральных сред, то для асептического



переноса биологического материала непосредственно на жидкие среды необходимо использовать стерильную пипетку или шприц и иглу. Если тестируемый биологический материал обладает антимикробными свойствами, то до начала проведения теста следует определить соотношение инокулята и объёма культуральной среды. (пример объясняется в 9CFR 113.25 (d) , а подробное описание тестовых процедур можно найти в описании методов вспомогательного тестирования (SAM) 903).

Чтобы определить нужный объём среды для нейтрализации антимикробной активности, используют 100 колониобразующих единиц (КОЕ) контрольных микроорганизмов, перечисленных в Таблице 2. Если тестируемая проба в качестве консерванта содержит мертиолат, то в сосудах для тестирования, инкубируемых как при 30-35°C, так и при 20-25°C, используют жидкую тиогликолевую среду (FTM). После соответствующего времени инкубации должен быть отчетливо виден рост (см. Раздел I.2.1.3. *Стимулирование роста и тесты на интерференцию*).

Если тестируемая проба является инактивированным биологическим материалом без мертиолата или биологическим материалом, содержащим живые бактерии, то при температуре 30-35°C используют жидкую тиогликолевую среду (FTM), а при температуре 20-25°C используют среду на основе соевого казеинового перевара (SCDM). Если тестируемая проба является биологическим материалом, содержащим живой вирус, то при обеих температурах инкубации используют среду на основе соевого казеинового перевара (SCDM). Если инактивированная бактериальная вакцина является клостридиальным биопрепаратом или содержит клостридиальный компонент, то вместо жидкой тиогликолевой среды (FTM) желательнее использовать жидкую тиогликолевую среду (FTM) с добавленным в неё 0,5%-м мясным экстрактом (FTMB). Возможно, также было бы целесообразно для всех тестов использовать и жидкую тиогликолевую среду (FTM), и среду на основе соевого казеинового перевара (SCDM).

**Таблица 2:** Некоторые штаммы из Коллекции культур американского типа, “American type culture collection ”<sup>1</sup>, с соответствующими для них средами и условиями для инкубации.

Среда	Тестируемый микроорганизм	Инкубация	
		Температура (°C)	Условия
FTM	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC #6633	30-35	Аэробные
FTM	<i>Candida krusei</i> ATCC #6258	20-25	Аэробные
SCDM	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC #6633	30-35	Аэробные
SCDM	<i>Candida kursei</i> ATCC #6258	20-25	Аэробные
FTMB	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC #11473	30-35	Анаэробные
FTMB	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC #6538	30-35	Аэробные

American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA

Для проведения тестов на стерильность с использованием как мембранной фильтрации, так и прямой инокуляции, все среды инкубируют в течение не менее 14 дней. Через определённые интервалы во время инкубации, а также после 14-дневной инкубации, сосуды для тестирования исследуют на наличие микробного роста. Наличие микробного роста нужно подтвердить посредством субкультивирования и окрашивания по Граму.

### 2.1.3. Стимуляция роста и интерференция теста

Стерильность сред следует подтверждать посредством инкубирования репрезентативных

контейнеров при соответствующей температуре в течение периода времени, определенного для каждого теста.

Для каждого продукта, подлежащего тестированию, а также для каждой новой серии или партии культуральных сред (пример приведен в 9CFR 113.25 (b)) следует производить валидацию способности культуральной среды поддерживать рост в присутствии и в отсутствии продукта, компонентов продукта, клеток, посевного материала или других исследуемых материалов. Подробное описание процедур тестирования можно найти SAMs 900-902.

Чтобы протестировать способность сред поддерживать рост в отсутствие исследуемого материала, среды необходимо инокулировать с 10-100 жизнеспособными контрольными организмами предлагаемых штаммов из Коллекции культур американского типа (ATCC), перечисленных в Таблице 2, и инкубировать в соответствии с указанными условиями.

Чтобы протестировать способность культуральных сред поддерживать рост в присутствии исследуемого материала, контейнеры необходимо инокулировать одновременно как с исследуемым материалом (см. Раздел I.2.1.4 *Количество объектов, подлежащих тестированию*), так и с 10-100 жизнеспособными контрольными организмами. Количество контейнеров должно составлять, как минимум, половину количества контейнеров, используемых для тестирования продукта или компонентов продукта. Исследуемые среды считаются удовлетворительными, если в течение 7 дней во всех контейнерах с инокулированными средами имеется явное свидетельство роста контрольных организмов. В случае очевидного роста, организм необходимо идентифицировать, чтобы подтвердить, что он является организмом, который был изначально добавлен к среде. Тест на стерильность считается недействительным, если одна из сред демонстрирует недостаточную ростовую реакцию, или если выделенный организм не является организмом, использованным для инокуляции материала.

Если тестируемый материал делает среду мутной и наличие или отсутствие микробного роста невозможно определить при визуальном осмотре, то через 14 дней после начала инкубации следует перенести части среды (каждая не менее 1 мл) на новые сосуды той же среды, затем инкубировать сосуды с исходной и перенесенной средой в течение минимум 4 дней.

## **2.2. Общая процедура тестирования живых вирусных вакцин, полученных на яйцах и вводимых с питьевой водой, посредством распыления, скарификации кожи на наличие бактерий и грибов.**

Средний уровень контаминации биологического материала в конечном контейнере из каждой серии должен составлять не более одной колонии бактерий или грибов на дозу вакцины. Для каждой пробы контейнера каждую из двух чашек Петри инокулируют вакциной в объеме, равном 10 дозам, если вакцина рекомендована для домашней птицы, или одной дозе, если вакцина рекомендована для других животных. В каждую чашку добавляют 20 мл агара на основе сердечно-мозгового экстракта, содержащего 0,007 МЕ (международных единиц) пенициллиназы на мл. Одну чашку следует инкубировать при температуре 30-35°C в течение 7 дней, а другую - при температуре 20-25°C в течение 14 дней. Подсчёт колоний производится по окончании каждого периода инкубации. Для каждого из условий инкубации следует определить среднее количество колоний на всех чашках, представляющих серию. Если в первоначальном тесте среднее количество при любых условиях инкубации превышает одну колонию на дозу для вакцин, то чтобы исключить неправильную технологию можно провести один повторный тест с использованием двойного количества неоткрытых конечных контейнеров. Если среднее

количество для каждого из условий инкубации итогового теста превышает одну колонию на дозу, то серию вакцины следует считаться не отвечающей требованиям.

### **2.3. Основная процедура тестирования посевных серий бактерий и живого бактериального биологического материала на чистоту**

Каждая посевная серия бактерий или серия биологического материала, содержащего живые бактерии, должна быть протестирована на чистоту посредством её инокуляции в среду на основе соевого казеинового перевара (SCDM), которую инкубируют при 20-25°C в течение 14 дней, и посредством её инокуляции в жидкую тиогликолевую среду (FTM), которую инкубируют при 30-35°C в течение 14 дней (см. Раздел 1.2.1.4 Количество объектов, подлежащих тестированию для определения количества проб для тестирования и количества используемого инокулята). Для асептического переноса определённого количества биологического материала непосредственно на культуральную среду двух типов необходимо использовать стерильную пипетку или шприц и иглу. Минимальное соотношение инокулята и культуральной среды составляет 1/15.

Если инокулят или рост бактериальной вакцины приводит к помутнению среды настолько, что отсутствие атипичного микробного роста не может быть установлено при помощи визуального обследования, то из всех пробирок с мутной средой на 3-11 день следует приготовить субкультуры. Субкультивирование производится посредством переноса 0,1-1,0 мл в дифференциальные бульоны и агар и инкубации для уравнивания в течение 14 дней. Также необходимо производить микроскопическое исследование методом окрашивания по Граму.

Если при сравнении с положительным контролем, включенным в тест, ни в одном из сосудов для тестирования не было обнаружено атипичного роста, то партия биоматериала может считаться удовлетворительной по показателю чистоты. Если атипичный рост был обнаружен, однако при помощи контроля можно продемонстрировать, что среды или технология были непригодными, то первичный тест можно повторить. Если был обнаружен атипичный рост, но нет свидетельств недействительности теста, то тест можно провести повторно. В повторном тестировании используется двойное количество контейнеров с биоматериалом и сосудов для тестирования по сравнению с количеством, использованным в первом тесте. Если в повторном тесте атипичный рост не обнаружен, то биоматериал считается удовлетворительным по чистоте, но результаты первичного и повторного тестов должны быть переданы для оценки в регулирующие органы конкретных стран. Если атипичный рост наблюдали в каком-либо из сосудов, использованных в повторном тестировании, то биологический материал считается неприемлемым по показателю чистоты. Если, однако, при помощи контролей можно продемонстрировать, что среды или технология, использованные в повторном тесте, были непригодными, то повторный тест можно провести заново.

### **2.4. Пример процедуры исключения, когда общей процедуры тестирования недостаточно для выявления *Brucella abortus***

Следует подтвердить, что каждая партия культуральной среды поддерживает рост *B. abortus* при инокулировании чашек и флаконов двухфазной средой с неизвестным количеством клеток (около 100) прихотливого биовара 2 *B. abortus*. Если среда поддерживает рост этого биотипа, то она поддержит рост и всех других биоваров.

Введите 1.0 мл подготовленного исходного посевного материала или рабочего вирусного или клеточного посевного материала (без антибиотиков), добавив 50 мкл тестируемого продукта, в каждый из 10 флаконов с двухфазной средой. В это же время введите 50 мкл

инокулята в 10 чашек с сывороточно-декстрозным агаром (SDA) и распределите с помощью стерильной пастеровской пипетки из гнутого стекла или шпателем в виде хоккейной клюшки. В тоже время в качестве отрицательных контролей установите чашку, не инокулированную сывороточно-декстрозным агаром, и двухфазный флакон.

Для оценки ингибирующих веществ 50 мкл ранее подготовленного исходного посевного материала или рабочего вирусного или клеточного посевного материала и 10-100 КОЕ *B.abortus* инокулируют на дублирующие SDA чашки.

Все чашки и флаконы инкубируют при 37°C в среде с 5-10% CO<sub>2</sub>. Чашки инкубируют с расположенным в верхней части агаром, во флаконах агар размещают вертикально под наклоном. Флаконы инкубируют со свободно прилегающими колпачками.

Чашки проверяют на наличие роста колоний на 4 и 8 день инкубации. Двухфазную среду проверяют каждые 4-7 дней в течение 28 дней. Флаконы после каждой проверки поворачивают под наклоном, чтобы жидкая фаза перелилась через твердую фазу, затем выравнивают и возвращают в инкубатор.

Во время инкубации SDA чашек с положительными контролями и тестируемый материал визуально сравнивают с планшетами с положительными контролями, только если нет торможения роста организма в присутствии тестового материала, успешно проведен тест на интерференцию и подтверждена чувствительность тестирования.

Любые признаки роста подозрительных контаминирующих микроорганизмов на SDA чашках, замутнение или наличие колоний в двухфазных флаконах требуется тестирование последующего контроля с помощью ПЦР, чтобы подтвердить наличие *B.abortus*.

## **2.5. Пример общей процедуры выявления контаминации *Salmonella***

Каждая серия биологического материала, содержащего живой вирус и приготовленного в яйцах, должна быть свободна от контаминации *Salmonella*. Тестирование должно проводиться до добавки бактериостатических или бактерицидных агентов. Следует тестировать по пять проб от каждой серии; 5 мл пробы или половину содержимого контейнера (в зависимости от того, что меньше) следует использовать для инокуляции 100 мл триптозного бульона или тетрационатного бульона. Инокулированные бульоны следует инкубировать в течение 18-24 часов при температуре 35-37°C. Переносы из этих бульонов следует производить в агар MacConkey и в агар для *Salmonella-Shigella*, инкубировать в течение 18-24 часов и исследовать. Если не отмечено роста, характерного для *Salmonella*, следует инкубировать чашки с агаром дополнительно в течение 18-24 часов и снова обследовать. Если наблюдаются колонии, типичные для *Salmonella*, следует производить дальнейшее субкультивирование в соответствующих дифференциальных питательных средах с целью положительной идентификации. Чувствительные ПЦР тесты позволяют выявить *Salmonella* spp в культуральных материалах. Если *Salmonella* обнаружена, то серия биологического материала является неудовлетворительной.

## **3. Обнаружение контаминации *Mycoplasma***

### **3.1 Пример общей процедуры обнаружения контаминации *Mycoplasma***

Каждую серию живой вирусной вакцины, каждую партию исходного посевного вируса MSV, каждую партию первичного и исходного клеточного материала MCS, а также все ингредиенты животного происхождения, не прошедшие стерилизацию паром, следует проверять на отсутствие микоплазм. Следует использовать твердые и жидкие среды, которые будут поддерживать рост небольших количеств исследуемых микроорганизмов, таких как

типичные контаминирующие организмы *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *M. Fermentcins*, *M. hyorhinae*, *M. orale* и *M. synoviae*. Питательные свойства твердой среды должны быть таковыми, чтобы на каждый микроорганизм приходилось не менее 100 КОЕ, когда в каждую чашку инокулируют приблизительно 100-200 КОЕ. При инокуляции 20-40 КОЕ каждого исследуемого организма в жидкую среду должно произойти соответствующее изменение цвета. Следует валидировать способность культуральной среды поддерживать рост в присутствии продукта для каждого тестируемого продукта и для каждой новой серии или партии культуральной среды.

Следует тестировать один образец каждой серии вакцины, например, MSV или MCS. Инокулировать 0,25 мл образца, подлежащего тестированию, в каждую из четырех чашек с твердой средой, и инокулировать 10 мл пробы в 100 мл жидкой среды. Альтернативой является инокуляция 0,1 мл в каждую чашку и инокуляция 100 мл жидкой среды с 1 мл тестируемой пробы. Инкубировать две чашки при температуре 35-37°C в аэробных условиях (при содержании в воздухе 5-10% CO<sub>2</sub> и при соответствующей влажности) и две чашки в анаэробных условиях (при содержании в атмосфере азота 5-10% CO<sub>2</sub> и при соответствующей влажности) в течение 14 дней. На 3ий или 4ый день после инокуляции произвести субкультивирование 0,25 мл из жидкой среды на двух чашках с твердыми средами. Инкубировать одну чашку в аэробных условиях и вторую - в анаэробных условиях при температуре 35-37°C в течение 14 дней. Повторить процедуру субкультивирования на 6, 7 и 8 день и снова на 13 или 14 день. Альтернативный метод включает субкультивирование на 3, 5, 10 и 14 день на чашке с твердой средой. Все чашки с субкультурой следует инкубировать в течение 10 дней за исключением 14-дневной субкультуры, которую необходимо инкубировать в течение 14 дней. Производить обследование жидких сред через каждые два-три дня, и в случае изменения цвета, немедленно проводить субкультивирование.

### 3.2 Интерпретация результатов тестирования на наличие *Mycoplasma*

В конце инкубационного периода (день 28) произвести микроскопическое исследование твердых сред на наличие колоний микоплазмы. Считается, что тестируемая проба прошла тест, если рост колоний микоплазмы произошел на положительных контролях, и если рост отсутствует на твердых средах, инокулированных с тестируемым материалом. Если на какой-либо стадии тестирования более одной чашки с тестируемым материалом контаминировано бактериями или грибами, или разбито, тест считается недействительным, и его следует провести повторно. Если колонии микоплазмы обнаружены в какой-либо из чашек с агаром, следует провести подходящий подтверждающий тест (например, ПЦР). Некоторые микоплазмы невозможно культивировать. В таком случае MSV и MCS нужно тестировать с использованием индикаторной клеточной линии (клетки Vero), метода ДНК окрашивания или полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Дальнейшее описание процедур можно найти в следующих источниках

Veterinary Medicinal Products, VICH GL34:

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2013/03/WC500140352.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/03/WC500140352.pdf)

и

USDA SAM 910:

[https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/vet\\_biologics/publications/910.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/910.pdf). Оба источника

находятся в доступе с 8.03.2017.

### **3.3. Пример специальной процедуры исключения небольших колоний типа *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC (MmmSC)* из биологических препаратов, используемых в производстве ветеринарных вакцин.**

Перед началом тестирования необходимо определить, что каждая партия среды способствует росту штамма PG1 *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC (MmmSC)*. Используется общий бульон для микоплазм и агар, но они содержат в качестве добавки свиную сыворотку. В В каждую партию бульона и агара инокулируют 10-100 КОЕ *MmmSC*. Твердая среда считается подходящей, если на 3-7 дни инкубации при 37°C в 5-10% CO<sub>2</sub> обнаруживается достаточный рост *MmmSC*. Жидкая среда считается подходящей, если роста на агаровых чашках, субкультивированных из бульона обнаруживается как минимум при первом субкультивировании. Если обнаруживается снижение роста, тот необходимо получить еще одну партию сред и повторить тестирование.

1 мл клеточного или вирусного посевного материала, предназначенного для тестирования, инокулируют в 9 мл жидкой среды, а 100 мкл на твердый агар для микоплазмы. Объем инокулируемого продукта не должен составлять более 10% от объема среды. Жидкую среду инкубируют при 37°C в 5-10% CO<sub>2</sub>, а 100 мкл бульона субкультивируют на агаре на 7,14 и 21 дни. Чашки с агаром инкубируют при 37°C в 5-10% CO<sub>2</sub> в течение не менее 14 дней, за исключением тех, что соответствуют 21 дню субкультивации, которые инкубируют в течение 7 дней. Неинокулированный бульон для микоплазмы и чашку с агаром инкубируют в качестве отрицательных контролей. Для оценки ингибирующих веществ следует инокулировать 1мл образца, подлежащего тестированию, в 9 мл жидкой среды, а 100 мкл на твердую среду. Затем в каждую добавить 100-100 КОЕ *MmmSC*. Подготовить положительный контроль , инокулировав в 9 мл бульона для микоплазмы и в чашку с агаром для микоплазмы 10-100 КОЕ *MmmSC*. Инкубировать в условиях, применяемых для образцов и отрицательных контролей.

В течение периода инкубации следует визуально сравнить бульон положительного контроля с присутствующим образцом и положительный контрольный бульон. Если нет признаков ингибирования организма, то значит, что либо продукт не обладает антимикробной активностью в данных условиях теста, либо или эта активность успешно подавлена в результате разведения.

Если в жидкой и твердой среде с тестовой пробой при сравнении с положительным контролем не наблюдают роста или сниженного роста *MmmSC*, то это значит, что продукт обладает антимикробной активностью и тест неудовлетворительный. Требуется изменить условия для устранения антимикробной активности и повторить тест.

Если есть антимикробная активность, то тестируемый продукты необходимо разбавить еще раз. Повторите описанный выше тест, используя 1.0 мл пробы в 39 мл бульона для микоплазмы, затем инокулируйте 10-100 КОЕ *MmmSC* и инкубируйте по описанной выше схеме. Все бульоны и чашки следует проверять на наличие очевидных признаков роста. Доказательства роста определяются сравнением тестируемой культуры с отрицательным контролем, положительным контролем и ингибирующим контролем.

Если обнаруживают признаки микробного роста в тестовых пробах, то контаминирующие бактерии идентифицируют и подтверждают как *MmmSC* с помощью ПЦР.

## **4. Выявление риккетсий и простейших**

Общих процедур тестирования для исключения наличия риккетсий и простейших нет. В Обзоре по опубликованным тестам описаны процедуры для выявления специфических возбудителей *Coxiella burnetii* (Ку-лихорадка), *Ehrlichia canis*, *Trypanosoma evansi* и *Babesia caballi*, которые необходимы для обнаружения патогенов в ветеринарных вакцинах, предназначенных для импорта в Австралию (Департамент с/х Австралии (2013)). Обзор составлен на основе публикаций из авторитетных научных журналов и касается чувствительных методов выявления специфических возбудителей.

#### 4.1. Пример протокола на основе опубликованных методов для выявления *Babesia caballi* и *Theileria equi*

*Babesia caballi* и *Theileria equi* можно культивировать *in vitro* в 10% эритроцитах лошадей в поддерживающей среде, обогащенной 40% лошадиной сывороткой и в микроаэрофильной среде. Выделение культуры *Theileria equi* более чувствительный процесс по сравнению с *Babesia caballi*. Мазки крови, окрашенные красителем Гемза, ежедневно готовят из культур в течение 7 дней (Avarzed et al., 1997; Ikadai et al., 2001). *Babesia caballi* характеризуется парными мерозоитами, связанными в одном конце. *Theileria equi* характеризуется образованием тетрадным формированием мерозоитов или «Мальтийским крестом». Для подтверждения диагноза используется ПЦР (см Главу 2.5.8 Пироплазмоз лошадей). Молекулярная диагностика рекомендуется для тестирования биологических продуктов, которые не содержат цельную кровь или органы. Молекулярная диагностика с помощью ПЦР или петлевой изотермической амплификации (LAMP) является наиболее чувствительным и специфичным методом тестирования для выявления возбудителей пироплазмоза лошадей (Alhassan et al., 2007).

### 5. Обнаружение вирусов в биологических материалах

Общее тестирование обычно включает использование перевиваемых и первичных культур клеток исходных вирусов, например, клеток с известной чувствительностью к вирусным контаминантам, которые инокулируют еженедельными субкультурами течение срока до 4 недель. Вирусные посевные материалы также необходимо тестировать на первичных клеточных линиях вида, для которого предназначен готовый продукт. А на 21 или 28 день проводится оценка монослоев с использованием окрашивания Н&Е для оценки цитопатогенного действия и гемадсорбции с эритроцитами морских свинок и кур, что позволяет оценить наличие гемадсорбирующих агентов.

Общее тестирование важно в качестве инструмента скрининга, но оно не является достаточно чувствительным для выявления всех имеющих значение вирусов.

Для специального тестирования требуется ввести тестовый материал на чувствительные, восприимчивые клеточные линии, чтобы исключить присутствие вируса; процесс амплификации в культуре клеток обычно занимает до 28 дней, но в зависимости от вируса может потребовать более длительного периода. Выявление специфических вирусных контаминантов осуществляется путем распознавания ЦПД в связи с выявлением более чувствительного антигена или с помощью молекулярных исследований (ФАТ, ПЦР, ИФА) после процесса амплификации в культуре клеток.

Все тестирование с использованием клеточных линий для амплификации целевых вирусов зависит от чувствительности клеток для целевого возбудителя и способности распознавать наличие возбудителя в клетках. Количество, характеристики и вирусный профиль безопасности используемых клеточных линий следует согласовать с поставной целью и обеспечить им надлежащее сохранение. Необходимо использовать положительные и отрицательные контроли во всех пассажах культуры клеток для определения чувствительности и специфичности. Тестирование на интерференцию необходимо проводить при первом пассаже, чтобы гарантировать, что тестовая проба не ингибирует рост исключаемого вируса.

### **5.1. Пример общего тестирования для исключения вирусов из вирусных и клеточных посевных материалов, используемых в производстве ветеринарных вакцин**

Если инокулят тестируемого вируса является цитопатогенным, то его действие необходимо специально нейтрализовать, не нарушая при этом вероятность выделения целевого возбудителя. Для пораженного клеточного типа 1 мл тестируемого (или рабочего) исходного вирусного материала (MVS) оттаивают или восстанавливают и нейтрализуют путем добавления 1 мл моноспецифической антисыворотки. Необходимо показать, что сыворотка свободна от антител против любых возбудителей, для выявления которых предназначен тест. Антисыворотку необходимо проверить на неспецифические ингибирующие свойства. Сыворотка должна отличаться довольно высоким показателем титра, чтобы эффективно нейтрализовать посевной вирус при применении приблизительно равных или меньших объемов сыворотки. Титрование на микропланшете используется для определения титра антисыворотки, необходимого для нейтрализации MVS. Допускается, чтобы антисыворотка нейтрализовала MVS при 37°C в течение часа. Смесь MVS и антисыворотки затем высеивают на 75 см<sup>2</sup> матрас с подходящими клетками. Если известно, что MVS отличается высокими показателями титра или его трудно нейтрализовать, то блокирующую антисыворотку можно добавить к ростовой среде до итоговой концентрации 1-2%.

Исходные клеточные посевные материалы не требуют процесса нейтрализации.

Клетки необходимо еженедельно подвергать пассажу в течение 28 дней. Некоторые релевантные вирусы могут быть отобраны в качестве индикаторов чувствительности и интерференции (положительные контроли), но они не обеспечат валидацию для более широкого диапазона возбудителей, обнаруживаемых при общем тестировании. Итоговую культуру проверяют на цитопатологию и гемадсорбцию.

Для оценки цитопатологических изменений, связанных с ростом вируса используют процедуры окрашивания по Май — Грюнвальду — Гимзе или Н&Е. Площадь поверхности монослоев должна быть минимум 6 см<sup>2</sup>, и подготовить их можно на предметных стеклах для тканевых культур, размеченных на ячейки, и инкубируют в течение 7 дней. Пластиковые лунки предметных стекол удаляют, оставляя резиновое уплотнение прикрепленным к предметному стеклу.

Предметные стекла ополаскивают теплым забуференным фосфатом физиологическим раствором Дульбекко, фиксируют в ацетоне, метаноле или формалине в зависимости от используемого красителя и помещают на подставку для окрашивания.

При окрашивании по методу Май — Грюнвальду — Гимзе: предметные стекла окрашивают в течение 15 минут при комнатной температуре красителем Май - Грюнвальда, разведенным в отношении 1/5 с абсолютным метанолом. Переворачивая предметные стекла, удаляют краситель Май - Грюнвальда. Затем стекла окрашивают в течение 20 минут красителем Гимзе, разбавленным в отношении 1/15 деионизированной водой. Краситель Гимзе удаляют, переворачивая предметные стекла, и ополаскивая их в деионизированной воде в течение 10-20 секунд. Затем стекла сушат на воздухе, наносят парафиновое масло и накрывают покровными стеклами. При окрашивании по Май - Грюнвальду - Гимзе, нуклеопротеины ДНК и РНК окрашиваются по-разному. Нуклеопротеины ДНК окрашиваются в лилово-красный цвет, в то время как нуклеопротеины РНК приобретают голубой цвет. Монослои исследуют при помощи традиционного микроскопа на присутствие телец-включений, на наличие отклоняющегося от нормы количества гигантских клеток или другой цитопатологии, причиной которой является вирусная контаминация тестируемого продукта.

Инокулированные монослои сравнивают с подходящими контрольными неинокулированными монослоями. Если была обнаружена специфическая цитопатология, причиной которой является посторонний вирус, оформляется отчет о результатах и может быть проведено дополнительное



специфическое тестирование.

Для тестирования на гемадсорбцию используют монослои площадью 75см<sup>2</sup>, установленные в матрасах с культурами клеток после описанного выше 28-дневного пассажа. Для проведения этого анализа отбирают кровь морских свинок, цыплят или другую кровь в равный объем раствора Олсвера. Кровь можно хранить при температуре 4°С до семи дней. Непосредственно перед использованием, хранящиеся эритроциты повторно промывают посредством добавления 5 мл крови в растворе Олсвера к 45 мл фосфатно-буферного раствора, свободного от кальция и магния, и центрифугирования в 50 мл центрифужных пробирках при 500 g в течение 10 минут.

Супернатант удаляют посредством отсасывания, эритроциты суспендируют в фосфатно-буферном растворе и повторно центрифугируют. Процедуру отмывки повторяют, как минимум, 2 раза, пока супернатант не станет прозрачным. Эритроциты от каждого вида объединяют посредством добавления 0,1 мл каждого типа упакованных клеток крови к 100 мл фосфатно-буферного раствора. Эритроциты от разных видов можно хранить отдельно или совместно, по желанию. К каждому матрасу необходимо добавить 5 мл суспензии эритроцитов и инкубировать матрасы при температуре 4°С в течение 30 минут.

Монослои промывают дважды в фосфатно-буферном растворе и исследуют на гемадсорбцию. Если нет очевидной гемадсорбции, в каждый матрас добавляют 5 мл суспензии эритроцитов, и матрасы инкубируют при температуре 20 — 25°С в течение 30 минут, ополаскивают, как раньше и исследуют на гемадсорбцию. Для каждой инкубационной температуры по желанию можно использовать разные матрасы. Монослои исследуют на наличие гемадсорбции, используя освещаемый световой бокс, так и микроскопически. Неинокулированные монослои можно использовать в качестве отрицательных контролей. Использование свободного от кальция и магния фосфатно-буферного раствора и свежих эритроцитов должно предотвратить возникновение неспецифической гемадсорбции. В случае обнаружения специфической гемадсорбции, характерной для присутствия постороннего агента, результаты оформляются в виде отчета, и может быть проведено дополнительное специфическое тестирование.

Специфическое тестирование требует специальных процедур, которые достаточно чувствительны для амплификации конкретного возбудителя в культуре, и последующего выявления этого возбудителя методами флуоресценции, ИФА с захватом антигена или ПЦР, в зависимости от того, что более чувствительно. Обычно специфическое тестирование требуется, когда общие процедуры недостаточно подходят для эффективного обнаружения вирусов, требующих более скрупулезных методов выявления. Некоторые примеры даны в Таблице 1.

## **5.2. Пример специфического тестирования для исключения вируса из биологических продуктов, используемых в производстве ветеринарных вакцин**

### **5.2.1. Вирус эпидемической диареи свиней (ЭДС)**

Для выделения вируса эпидемической диареи свиней (ЭДС) в Vero клетках (CCL81, ATCC) необходим трипсин при инокулировании и в культуральной среде. Необходимы конфлюэнтные монослои, поскольку они более чувствительны к наличию трипсина и разрушаются задолго до 7 дней, необходимых для каждого пассажа в культуре. Излишне конфлюэнтный или стареющий монослой не будет чувствительным к росту вируса ЭДС. Серия поддерживающей среды (ММ) состоит из минимальной поддерживающей среды Игла (с 5,6 М HEPES [N-2-гидроксиэтилпиперазин, N-2-этансульфоновая кислота] и глутамином) + 0,3% триптозо-фосфатного бульона, 0,02% экстракта дрожжей и 4 мкг/мл трипсина, обработанного ТРСК. Трипсин следует добавлять к ММ в день использования среды.

Перед инокуляцией конфлюэнтные 75 см<sup>2</sup> монослои дважды промывают в ММ (с добавлением трипсина) и удаляют FCS. В каждый монослой добавляют вирус или клеточный посевной материал (1 мл) с 1 мл ММ; инкубируют при 37°C в течение 2 часов, затем добавляют 30 мл/матрас ММ. Отрицательные контрольные монослои подготавливают последними в отдельных лабораторных помещениях. Оценка чувствительности и интерферирующих веществ требует оценки вируса ЭДС с известным титром. Контроль интерференции с использованием совместной инокуляции тестовой пробы и вируса ЭДС необходим только при проведении первого пассажа. Положительные контроли необходимо ставить при каждом пассаже, чтобы каждый монослой выдавал ожидаемую чувствительность.

Вирус ЭДС титруется в лог-разведениях, начиная с 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-6</sup> в ММ (в зависимости от конечного титра референтного вируса), в двойных рядах по 6 лунок 24-луночного планшета для тканевых культур. Для теста на интерференцию вирус ЭДС титруется в таких же сериях разведений, но с использованием ММ, обогащенной 10% объемом тестируемого материала. Необходимо отцедить ростовую среду и снять ее. Промойте планшеты, чтобы гарантировать наличие FCS. Достаточно двух циклов промывания с использованием приблизительно 400 мкл/лунку ММ (с добавлением трипсина).

Добавить 100 мкл разведенного вируса в каждую из сдвоенных лунок. Взболтайте инокулированные планшеты для равномерного распределения инокулята по поверхности монослоя. Инкубируйте при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 часов, затем добавьте 1 мл объем/лунку ММ.

После 7 дней клетки в 75 см<sup>2</sup> монослоях разрушают с использованием циклов замораживания и оттаивания при температуре -80°C. Показатели конечных титров считают с положительных контрольных планшетов и сравнивают с наличием вируса в тестируемом материале, чтобы убедиться в том, что показатели титров сопоставимы и нет признаков интерференции.

Лизаты, полученные в ходе циклов замораживания и оттаивания, очищают при 2000 g в течение 5 минут и подвергают повторному пассажу на вновь сформированных монослоях (тех же, что и для первого пассажа). Пассажи повторяют до завершения 4-го цикла, когда оценивают клеточные лизаты с помощью ПЦР для выявления вируса ЭДС, а 7-дневные монослои в 24-луночных планшетах фиксируют и окрашивают с помощью РИФ. Если необходимо протестировать посевной вирус и для этого необходима нейтрализация с использованием антисыворотки, то при изоляции вируса ЭДС необходима дополнительная осторожность. Трипсин инактивируют в присутствии сывороточных протеинов и уже без трипсина вирус ЭДС не способен расти в клеточной культуре. Необходимо смыть инокулят двумя ММ обработками после положительной адсорбции (до 4 часов), чтобы получить приемлемую чувствительность.

## **Ж. ИНФОРМАЦИЯ, КОТОРУЮ СЛЕДУЕТ ПРЕДСТАВЛЯТЬ ПРИ ПОДАЧЕ ЗАЯВКИ НА ИМПОРТНУЮ ЛИЦЕНЗИЮ**

При проведении анализа риска в отношении биологических препаратов ветеринарные органы должны выполнять указания *Руководства по наземным животным*. Производитель или ветеринарный орган экспортирующей страны должен делать доступной подробную информацию, (если необходимо, то в конфиденциальном порядке), об источнике материалов, используемых в производстве препарата (например, субстратах). Они должны предоставлять подробную информацию о способе производства (и, где необходимо, об инаktivации) субстратов и составляющих материалов, процедурах обеспечения качества на каждом этапе производства, режимах тестирования конечных продуктов и фармакопее, которой должен соответствовать

продукт в стране происхождения. Они должны также информировать о контрольных организмах, их биотипах и референтных сыворотках, и других средствах надлежащего тестирования препаратов.

## **К. ПРОЦЕСС АНАЛИЗА РИСКА**

Анализ риска должен быть как можно более объективным и транспарентным, и он должен проводиться согласно Разделу 2 *Кодекса по наземным животным*, а сертификация должна соответствовать Разделу 5 *Кодекса по наземным животным*. По необходимости оценка факторов страны и товара и меры по снижению риска должны базироваться в основном на данных производителей. Эти данные зависят от гарантии качества на всех этапах производства, а не только от тестирования конечного продукта.

Заражение внутри страны может контролироваться соответствующим использованием продукта. Ветеринарные органы могут накладывать ограничения на применение некоторых продуктов (например, ограничения на использование продуктов учреждениями соответствующего уровня биозащиты).

## **L. БИОСДЕРЖИВАНИЕ**

Соответствующее биосодерживание может быть необходимо для многих видов биологических препаратов. В частности, импорт экзотических микроорганизмов следует осуществлять в соответствии с Главой 1.1.4. «Биобезопасность и биозащита в ветеринарной микробиологической лаборатории и виварии».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ALHASSAN A., GOVIND Y., TAM N.T., THEKISOE O.M., YOKOYAMA N., INOUE N. & IGARASHI I. (2007). Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piro-plasmosis. *Parasitol. Res.*, 100, 1165–1168.

AUSTRALIAN QUARANTINE POLICY AND REQUIREMENTS FOR THE IMPORTATION OF LIVE AND NOVEL VETERINARY BULK AND FINISHED VACCINES (1999). Available online at: [http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/ba/memos/1999/animal/99\\_085acleaned.pdf](http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/ba/memos/1999/animal/99_085acleaned.pdf) (accessed 8 March 2017)

AVARZED A., IGARASHI I., KANEMARU T., HIRUMI, K., OMATA T., SAITOU., OYAMADA A., NAGASAWA H., TOYODA Y. & SUZUKI N. (1997). Improved in vitro cultivation of *Babesia caballi*. *J. Vet. Med. Sci.*, 59, 479–481.

BAYLIS S.A., FINSTERBUSCH T., BANNERT N., BLUMEL J. & MANKERTZ A. (2011). Analysis of porcine circovirus type 1 detected in Rotarix vaccine. *Vaccine*, 29, 690–697.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (CFR) (2015). Subchapter E. Viruses, serums, toxins and analogous products; organisms and vectors. In: Code of Federal Regulations, Animals and Animal Products. Title 9, Parts 101–124. US Government Printing Office, Washington DC, USA.

DEPARTMENT OF AGRICULTURE (OF AUSTRALIA) (2013). Review of Published Tests to Detect Pathogens in Veterinary Vaccines Intended for Importation into Australia, Second Edition. CC BY 3.0. Available online at: [http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/ba/animal/2013/review-of-pathogens/Review\\_of\\_published\\_tests\\_to\\_detect\\_pathogens\\_2013\\_second\\_edition.pdf](http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/ba/animal/2013/review-of-pathogens/Review_of_published_tests_to_detect_pathogens_2013_second_edition.pdf) (accessed 8 March 2017)

EUROPEAN COMMISSION (2006). The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Eudralex. Volumes 4–9. European Commission, DG Health and Food Safety, Public health, EU Pharmaceutical information, Eudralex. Available online at [http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/index_en.htm) (accessed 8 March 2017).

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.2. (2014). European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France. Available online at <http://online.edqm.eu/> (accessed 8 March 2017)

FARSANG A. & KULCSAR G. (2012). Extraneous agent detection in vaccines – a review of technical aspects. *Biologicals*, 40, 225–230.

HARE W.C.D. (1985). Diseases Transmissible by Semen and Embryo Transfer Techniques. OIE Technical Series No. 4. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France.

HODINKA R.L. (2013). Point: is the era of viral culture over in the clinical microbiology laboratory? *J. Clin. Microbiol.*, 51, 2–4.

IKADAI H., MARTIN M.D., NAGASAWA H., FUJISAKI K., SUZUKI N., MIKAMI T., KUDO N., OYAMADA T. & IGARASHI I. (2001). Analysis of a growth-promoting factor for *Babesia caballi* cultivation. *J. Parasitol.*, 87, 1484–1486.

MARCUS-SECURA C., RICHARDSON J.C., HARSTON R.K., SANE N. & SHEETS R.L. (2011). Evaluation of the human host range of bovine and porcine viruses that may contaminate bovine serum and porcine trypsin used in the manufacture of biological products. *Biologicals*, 39, 359–369.

MILLER P.J., AFONSO C.L., SPACKMAN E., SCOTT M.A., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., BROWN J.D., FULLER C.M., UHART

M.M., KARESH W.B., BROWN I.H., ALEXANDER D.J. & SWAYNE D. (2010). Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.*, 84, 11496–11504.

NEVEROV A. & CHUMAKOV K. (2010). Massively parallel sequencing for monitoring genetic consistency and quality control of live viral vaccines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 107, 20063–20068.

ONIONS D. & KOLMAN J. (2010). Massively parallel sequencing, a new method for detecting adventitious agents. *Biologicals*, 38, 377–380.

ROSSEEL T., LAMBRECHT B., VANDENBUSSCHE F., VAN DEN BERG T. & VAN BORM S. (2011). Identification and complete genome sequencing of paramyxoviruses in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) using random access amplification and next generation sequencing technologies. *Virol. J.*, 8, 463.

SHEETS R., LOEWER, J., RAYDCHAUDHURI G. & PETRICCIANI J. (2012). Adventitious agents, new technology, and risk assessment, 19–20 May 2011, Baltimore, MD. *Biologicals*, 40, 162–167.

TELLEZ S., CASIMIRO R., VELA A.I., FERNANDEZ-GARAYZABAL J.F., EZQUERRA R., LATRE M.V., BRIONES V., GOYACHE J., BULLIDO R., ARBOIX M. & DOMINGUEZ L. (2005). Unexpected inefficiency of the European pharmacopoeia sterility test for detecting contamination in clostridial vaccines. *Vaccine*, 24, 1710–1715.

VAN BORM S., ROSSEEL T., STEENSELS M., VAN DEN BERG T. & LAMBRECHT B. (2013). What's in a strain? Viral metagenomics identifies genetic variation and contaminating circoviruses in laboratory isolates of pigeon paramyxovirus type 1. *Virus Res*, 171, 186–193.

VICTORIA J.G., WANG C., JONES M.S., JAING C., MCLOUGHLIN K., GARDNER S. & DELWART E.L. (2010). Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J. Virol.*, 84, 6033–6040.

WANG J., LUNT R., MEEHAN B., et al. (2014). Evaluation of the potential role of next-generation sequencing (NGS) in innocuity testing. Technical Report CSIRO, Australian Animal Health Laboratory.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1998). WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization Technical Report Series, Report No. 858. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2012). WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization Technical Report Series, Report No. 964. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Available online at: [http://www.who.int/biologicals/WHO\\_TRS\\_964\\_web.pdf](http://www.who.int/biologicals/WHO_TRS_964_web.pdf) (accessed 8 March 2017).

### **ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ЧТЕНИЕ**

Details of methods and culture media will be found in the following books and also in commercial catalogues.

BARROW G.I. & FELTHAM R.K.A., eds. (1993). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

COLLINS C.H., LYNE P.M. & GRANGE J.M., eds. (1995). Collins and Lyne's Microbiological Methods, Seventh Edition. Butterworth Heinemann, Oxford, UK.

MURRAY P.R., ed. (2003). Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA.

\*

\* \*

NB: FIRST ADOPTED IN 1989. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017