

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение контаминации посторонними агентами (чужеродными вирусами) в вирусных вакцинах

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы обнаружения посторонних агентов (чужеродных вирусов) в серии готового продукта вакцин против вирусных инфекций.

1. Общие положения

1.1 Испытания на наличие чужеродными вирусами готовой продукции, выпускаемой в виде инактивированных препаратов, не проводят. Контролируют только живые вирусвакцины.

1.2 Для испытаний на наличие чужеродными вирусами готовой продукции используют эмбрионы птиц, культуры клеток, цыплят и полимеразно-цепную реакцию (ПЦР).

1.3 Цыплята или эмбрионы птиц должны быть получены от стад кур, свободных от специфической патогенной микрофлоры (SPF), если в нормативной документации нет других указаний.

1.4 Клеточные культуры для испытания на посторонние агенты должны отвечать требованиям к культурам клеток, изложенным в ОФС "*Культуры клеток для ветеринарного применения*", за исключением испытания на карิโอтип и анализа на канцерогенность, которые не проводятся.

1.5 В испытаниях, описанных в данном разделе, используют жидкие вакцины или лиофилизированные препараты, которые восстанавливают стерильным раствором натрия хлорида изотонического 0,9 % (физиологический раствор, рН 7,2-7,4), дистиллированной водой или др. разбавителем. Если не установлено или не указано иначе, испытываемое вещество должно содержать

количество вируса, эквивалентное не менее 10 дозам вирусвакцины в 0,1 мл посевного материала для культуры клеток и в 0,2 мл для эмбрионов птиц.

1.6 Если вирус, входящий в состав вакцины, может оказывать влияние на ход и чувствительность испытания, данный вирус в испытуемом образце нейтрализуют с помощью моновалентной антисыворотки, при этом смесь "вирус+сыворотка" инкубируют при заданной температуре в течение 1-2 ч, необходимых для нейтрализации вакцинного штамма вируса (если нет других указаний в нормативной документации).

1.7 Все сыворотки, используемые в испытании на посторонние агенты для нейтрализации вирусов в вакцине или в качестве компонента клеточной питательной среды, не должны содержать антител к перечисленным в п. 2.1 вирусам, что должно быть подтверждено с помощью соответствующих чувствительных испытаний, за исключением одного типа, то есть антител к вирусу, который они предполагают нейтрализовать.

1.8 Нет необходимости проводить повторное испытание сывороток, полученных от цыплят из SPF стад.

1.9 В случае, когда это оговорено в фармакопейной статье или иначе обосновано, если требуется нейтрализация вируса вакцины, но её провести затруднительно, *in vitro* испытания, описанные далее, при необходимости адаптируются и валидируются, с целью гарантирования отсутствия контаминации посторонними агентами.

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

1.11 Допускается использование и других типов испытаний на наличие контаминации посторонними вирусами, помимо описанных в данном разделе, которые должны быть провалидированы и обладать соответствующей специфичностью и чувствительностью.

2. Испытание образцов на контаминацию посторонними вирусами в ПЦР

2.1 При проведении испытаний в ПЦР на наличие чужеродных вирусов, посевной вирусный материал (Master Seed) исследуют 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 лимфоидного лейкоза птиц;
- реовирус птиц;
- вирус инфекционной анемии цыплят;
- вирус синдрома снижения яйценоскости;
- вирус болезни Марека;
- вирус болезни Ньюкасла;
- вирус реовирусной инфекции птиц;
- вирус метапневмовирусной инфекции птиц;
- вирус оспы птиц;
- вирусы гриппа птиц.

2.3 На наличие чужеродными вирусами готовой продукции проводят испытания в ПЦР каждой пятой серии препарата. Контроль проводят на наличие следующих вирусов:

- вирус инфекционного бронхита кур;
- вирус инфекционной бурсальной болезни;
- вирус инфекционного ларинготрахеита птиц;
- вирус инфекционного энцефаломиелита птиц;
- вирус болезни Марека;
- вирус болезни Ньюкасла;

- вирус реовирусной инфекции птиц;
- вирус метапневмовирусной инфекции птиц;
- вирус оспы птиц.

2.4 Если в серии готового продукта вакцин против вирусных инфекций в ПЦР обнаружен геном вируса, то дальнейшие исследования на обнаружение возможной контаминацию проводятся классическими методами (эмбрионы птиц, культуры клеток или цыплята).

2.5 Если в серии готового продукта вакцин против вирусных инфекций в ПЦР геном вируса не обнаруживается, то данный препарат считается свободным от вирусных контаминантов.

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

3.1 Используют испытуемый образец, при необходимости разведенный, содержащий количество нейтрализованного иммунной сывороткой, как было указано выше, вируса, эквивалентное, по крайней мере, 10 дозам вакцины 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 аллантоисную полость эмбрионов 8-10-суточного возраста;
- группа 2 – на хорионаллантоисную оболочку эмбрионов 10-12-суточного возраста;
- группа 3 – в желточный мешок эмбрионов 4-6-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 и 2 в течении 6-7 дней, группу 3 – 12 суток.

3.4 Эмбрионы, павшие в первые 24 ч после заражения, уничтожают, считая их гибель неспецифической. Гибель эмбрионов в последующие часы

относят за счет действия вируса.

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 аллантоисную жидкость на присутствие гемагглютинирующих агентов в капельной реакции гемагглютинации (РГА) с 1%-ной суспензией эритроцитов петуха.

3.7 Проводят 2 последующих пассажа на куриных эмбрионах, как описано выше. Материалом для следующего пассажа служат гомогенаты хорионаллантоисной оболочки, желточного мешка и аллантоисная жидкость, полученные из эмбрионов первого пассажа. Эмбрионы второго пассажа заражают соответствующими материалами, как описано выше.

3.8 Образец вакцины соответствует требованиям испытания, если в ходе контроля не было ни одной специфической гибели эмбрионов, отсутствовали патологические изменения 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 контрольную группу – без вакцины (2 образца культуры клеток), в которой ростовую среду заменяют на питательную, и опытную группу (5 образцов).

4.3 В опытной группе культуральную среду удаляют, когда клетки

сформируют сплошной монослой, и вносят по 0,1 мл испытуемой вакцины в каждый образец. Оставляют "на контакт" для обеспечения адсорбции вируса на 1 ч, затем вносят питательную среду и 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, периодически просматривая их под микроскопом на наличие цитопатических изменений или других признаков присутствия посторонних агентов в испытуемой вакцине. Каждый пассаж проводится с объединенными от всех 5 образцов монослоя клетками и культуральной жидкостью, после проведения цикла (3-х кратного) замораживания-оттаивания. При каждом пассаже по 0,1 мл объединенного материала вносят на каждый из 5 свежеприготовленных образцов монослоя фибробластов.

4.5 Образцы вакцины соответствует 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 см^2 .

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 0,1 мл испытуемой вакцины в каждый образец. Оставляют "на контакт" для обеспечения адсорбции вируса

на 1 ч, затем вносят питательную среду.

5.4. В образцы группы 2 (положительный контроль) вносят подходящий штамм вируса болезни Марека (не более $10^{5,0}$ CCID₅₀ в 0,1 мл) в каждый образец;

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

5.6 Инкубируют опытные и контрольные образцы при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течении 4-5 сут. с ежедневной микроскопией.

4.7 Проводят 3 последовательных пассажа. Каждый пассаж проводится с объединенными от всех образцов в каждой группе монослая клетками и культуральной жидкостью, после проведения цикла (3-х кратного) замораживания-оттаивания. По 0,1 мл объединенного материала каждой группы вносят на свежеприготовленные образцы монослая фибробластов, как описано выше.

4.8 Полученные образцы исследуют на присутствие вируса болезни Марека в реакции иммунофлюоресценции (РИФ).

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

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

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

6 Испытание на обнаружение (выявление) вируса ринотрахеита индеек

6.1 В культуре клеток фибробластов эмбрионов кур

6.1.1 Данное испытание может проводиться одновременно с *Испытанием 3*, изложенным в данной ОФС, с использованием тех же испытуемых образцов клеток и отрицательных контролей на всех стадиях, вплоть до ко-

нечного специфического испытания на выявление 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 ОФС, с некоторыми специфическими правками:

- в образцы группы 2 (положительный контроль) вносят подходящий штамм вируса ринотрахеита индеек (не более 10 CCID₅₀ в 0,1 мл) в каждый образец;

- полученные образцы исследуют на присутствие вируса ринотрахеита индеек в реакции иммунофлюоресценции (РИФ).

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

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

6.1.6 Образцы вакцины соответствует требованиям испытания, если наличие вируса ринотрахеита индеек не выявлено.

6.2 В культуре клеток Vero

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

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

- в образцы группы 2 (положительный контроль) вносят подходящий штамм вируса ринотрахеита индеек (не более 10 CCID₅₀ в 0,1 мл) в каждый образец;

- полученные образцы исследуют на присутствие вируса ринотрахеита

индеек в реакции иммунофлюоресценции (РИФ).

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

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

6.2.5 Образцы вакцины соответствует требованиям испытания, если наличие вируса ринотрахеита индеек не выявлено.

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

7.1 Готовят 11 образцов суспензий, каждая по 20 мл, 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 0,1 мл испытуемой вакцины в каждый образец.

7.4. В образцы группы 2 (положительный контроль) вносят 10 CCID₅₀ в 0,1 мл вируса инфекционной анемии цыплят в каждый образец.

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

7.6 Все клеточные культуры культивируют при температуре (37±0,5)°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 стано-

вится красной, по сравнению с контрольными культурами.

7.8 Регулярно в течение всего периода инкубации проводят микроскопическое исследование всех культур клеток на наличие любого цитопатического эффекта. На данном этапе 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 реакции иммунофлюоресценции (РИФ).

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 энтерита уток

8.1 Испытание проводится для вакцин, изготовленных на клетках уток или гусей.

8.2 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 см^2 .

8.3 Формируют группы для проведения испытаний:

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

8.4 В группе 1 (опытной) культуральную среду удаляют, когда клетки сформируют сплошной монослой, и вносят по 0,1 мл испытуемой вакцины в каждый образец. Оставляют "на контакт" для обеспечения адсорбции вируса на 1 ч, затем вносят питательную среду.

8.5 В группе 2 (положительный контроль) культуральную среду удаляют, когда клетки сформируют сплошной монослой, и вносят подходящий штамм вируса энтерита уток (не более 10 CCID₅₀ в 0,1 мл) в каждый образец. Оставляют "на контакт" для обеспечения адсорбции вируса на 1 ч, затем вносят питательную среду.

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

8.7 Инкубируют опытные и контрольные образцы при температуре (37,0 ± 0,5)°C в течении 4-5 дней с ежедневной микроскопией.

8.8 Проводят 3 последовательных пассажа. Каждый пассаж выполняют следующим образом: клетки трипсинизируют, готовят отдельные пулы клеток от каждой из трех групп. Смешивают соответствующее количество каждого из пулов с суспензией свежеприготовленных первичных и вторичных клеток печени эмбрионов мускусной утки и вносят по 0,1 мл свежеприготовленные образцы монослоя, как описано выше.

8.9 Полученные образцы монослоя исследуют на присутствие вируса энтерита уток в реакции иммунофлюоресценции (РИФ).

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

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

8.12 Образцы вакцины соответствует требованиям испытания, если наличие вируса энтерита уток не выявлено.

9. Испытание на обнаружение (выявление) парвовирусов уток и гусей

9.1 Испытание выполняется для вакцин, изготовленных на клетках от утиных или гусиных эмбрионов.

9.2 Готовят суспензию первичных и вторичных фибробластов эмбрио-

нов мускусной 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.

9.3 Формируют группы и проводят испытания, как описано в п.4.2-4.8 данной ОФС, с некоторыми специфическими правками:

- в образцы группы 2 (положительный контроль) вносят подходящий штамм парвовируса уток (не более 10 CCID₅₀ в 0,1 мл) по 0,4 мл в каждый образец;

- полученные образцы исследуют на присутствие парвовируса уток в реакции иммунофлюоресценции (РИФ).

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

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

9.6 Образцы вакцины соответствует требованиям испытания, если наличие парвовируса уток не выявлено.

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

10.1 Испытание проводится как альтернативный метод, или в дополнении к *in vitro* испытаниям (если в нормативной документации нет других указаний).

10.2 10 СПФ-цыплятам 14-сут. возраста вводят испытуемый образец внутримышечно в дозе, эквивалентной 100 дозам данной вакцины, и не менее чем 10 цыплятам - интраокулярно в дозе, эквивалентной 10 дозам данной вакцины. Если вакцинный вирус является патогенным для птиц этого возраста, в этом случае 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 проти-

вомикробные вещества.

10.3 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 ниже (за исключением вируса, входящего в состав вакцины).

10.4 Рекомендуются, чтобы полученные сыворотки крови от данных птиц сохранялись для того, чтобы могло быть проведено дополнительное испытание при изменении требований.

10.5 Образцы вакцины соответствует 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 входящим в состав вакцины.

10.6 Стандартные испытания на контаминацию посторонними вирусами

Возбудитель	Метод анализа *
Аденовирусы птиц, 1 группа	РН, РДП, ИФА
Вирус энцефаломиелита птиц	РДП, ИФА
Вирус инфекционного бронхита кур	РТГА, ИФА
Вирус инфекционного ларинготрахеита птиц	РН, ИФА, РИФ
Вирус лимфоидного лейкоза птиц	РН, ИФА
Реовирус птиц	РИФ, ИФА
Вирус инфекционной анемии цыплят	РИФ, ИФА, РН
Аденовирус птиц, 3 группа (вирус синдрома снижения яйценоскости)	РТГА, ИФА
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
Пневмовирус птиц (ринотрахеит индеек)	ИФА

* - в начале исследований допускается определение контаминации в ПЦР

РДП- реакция диффузионной преципитации в агаровом геле

ИФА- иммуноферментный анализ

РТГА- реакция торможения гемагглютинации

РИФ- реакция иммунофлюоресценции

РН- реакция нейтрализации

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

10.7.1 Если вирусная вакцина имеет происхождение от возбудителя заболеваний индеек или вирус культивировался в культурах клеток индейки, проводятся испытания на антитела к следующим возбудителям:

Возбудитель	Метод анализа
Возбудитель хламидиоза (Chlamydia spp.)	ИФА
Вирус геморрагического энтерита индеек	РДП

10.7.2 Испытание на отсутствие лимфопролиферативного вируса индеек проводится путем внутрибрюшинного введения испытуемого образца 12 птенцам 4-суточного возраста. За индюшатами наблюдают в течение 40 дней. Испытание считается недостоверным, если более 20 % индюшат погибли вследствие неспецифических причин. Образцы соответствуют требованиям испытания, если отсутствуют макроскопические и микроскопические патологические изменения во фрагментах селезенки и зубной железы, отобранных у 10 индюшат через 2 недели после инокуляции, (за исключением тех, что связаны с вирусом, входящим в состав вакцины).

10.8 Дополнительные испытания на выявление посторонних возбудителей в препаратах против вирусных болезней уток

10.8.1 Если вирусная вакцина имеет происхождение от возбудителей заболеваний уток или вирус культивировался в эмбрионах или культурах клеток утки, проводятся испытания на антитела к следующим возбудителям:

Возбудитель	Метод анализа
Возбудитель хламидиоза (Chlamydia spp.)	ИФА
Парвовирусы гусей и уток	РН, ИФА
Вирус энтерита уток	РН
Вирус гепатита уток, тип 1	РН

10.8.2 Образцы вакцины отвечают требованиям испытания, если не обнаружено наличие любого постороннего агента.

10.9 Дополнительные испытания на выявление посторонних возбудителей в препаратах против вирусных болезней гусей

10.9.1 Если вирусная вакцина имеет происхождение от возбудителей заболеваний гусей или вирус культивировался в эмбрионах или культурах клеток гусей, проводятся также испытания на антитела к следующим возбудителям:

Возбудитель	Метод анализа
Парвовирусы гусей и уток	РН, ИФА
Полиомавирусы геморрагические гусей	Испытание на гусятах, описанное ниже или другое подходящее испытание

10.9.2 Испытуемый образец в дозе, эквивалентной не менее 10 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.

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

12. Рекомендации при проведении контроля контаминации чужеродными вирусами в вирусных вакцинах

12.1 Смесь вирус-сыворотка вносят в культуры требуемых видов клеток (чувствительных к определяемому контаминанту), с площадью поверхности монослоя по крайней мере 25 см². Посев культур может производиться на любой подходящей стадии роста, до образования 70 % сплошного монослоя. По крайней мере 1 образец монослоя каждого типа клеток должен сохраняться

в качестве контроля. Культуры инкубируют при температуре $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ 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 и производят пересев на клетки того же типа, что использовали первично.

12.2 *Обнаружение цитопатических вирусов.* Два образца монослоя, площадью по крайней мере 25 см^2 каждый, окрашивают соответствующим цитологическим красителем. 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.

12.3 *Обнаружение гемадсорбирующих вирусов.* Образцы монослоя промывают несколько раз соответствующим буферным раствором и достаточным объемом суспензии подходящих эритроцитов для равномерного покрытия поверхности монослоя. Через определенные периоды инкубации клетки исследуют на наличие гемадсорбции.

12.4 *Обнаружение гемагглютинирующих вирусов.* Образцы суспензии клеток объединяют с достаточным объемом суспензии подходящих эритроцитов. Через определенные периоды инкубации клетки исследуют на наличие гемагглютинации.

12.5 *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 подходящий положительный контроль. Клетки подвергаются соответствующим испытаниям, например, с использованием антител, конъюгированных с флуоресцеином или подобными реактивами.