

На правах рукописи

КАЛАШНИКОВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ
КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КОМБИНИРОВАННЫХ ВАКЦИН
ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ДИФТЕРИИ, СТОЛЬБНЯКА И КОКЛЮША
НА ОСНОВЕ ЭКСПРЕССНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА**

14.04.01 – технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2014

Диссертационная работа выполнена в ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России и филиале ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»

Научный руководитель:

Николаева Алевтина Максимовна доктор биологических наук, профессор ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Петров Александр Юрьевич доктор фармацевтических наук, профессор, ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, заведующий кафедрой фармации

Ценева Галина Яковлевна доктор медицинских наук, профессор, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, заведующая лабораторией бактериальных капельных инфекций

Ведущая организация: ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России.

Защита состоится 23 декабря 2014 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.01 при ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2. Тел./факс (342) 233-55-01.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России по адресу: 614070, г. Пермь, ул. Крупской, д. 46.

Текст диссертации размещен на сайте ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России <http://www.pfa.ru> 18 сентября 2014 г.

Дата размещения объявления о защите диссертации на сайте Министерства образования и науки Российской Федерации <http://www.mon.gov.ru> 22 октября 2014 г.

Автореферат, отзыв научного руководителя и объявление о защите диссертации размещены на сайте ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России <http://www.pfa.ru> 22 октября 2014 г.

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Н.В. Слепова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Массовая вакцинация населения – самый действенный, доступный и экономически эффективный инструмент борьбы с инфекционными заболеваниями. В настоящее время в России для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша используются как отечественные вакцинные препараты (АДС-М, АКДС, АКДС-Геп В), так и зарубежные с бесклеточным коклюшным компонентом (Инфанрикс, Пентаксим). В филиале ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед» разработана технология производства бесклеточной коклюшной вакцины (БКВ) (патент № 2504399 от 06.12.2012) и проведены исследования по включению ее в состав комбинированных вакцинных препаратов.

Производство вакцин является сложным и длительным процессом, требующим постоянного контроля качества специфического продукта при осуществлении многообразных технологических стадий. Совершенствование технологий производства и создание новых вакцинных препаратов ставит задачу разработки и внедрения методов их контроля и стандартизации (Онищенко Г.Г., 2010). Современные тенденции мировой промышленности иммунобиологических препаратов направлены на гармонизацию методов контроля государственных стандартов различных стран. Одними из главных показателей качества вакцинных препаратов являются подлинность и специфическая активность. В настоящее время в нормативных документах на отечественные комбинированные вакцины показатели «Подлинность» и «Специфическая активность» трактуются однозначно и определяются по иммуногенной активности в длительных и дорогостоящих тестах на животных (биопроба). В Европейской Фармакопее для контроля «Подлинности» вакцинных препаратов рекомендуется использовать тесты «in vitro». Следует также отметить, что несмотря на длительное применение во многих странах комбинированных вакцин с бесклеточным коклюшным компонентом, до сих пор не утверждены единые методы контроля БКВ, каждый производитель разрабатывает свои оригинальные методики для оценки специфической активности бесклеточного коклюшного компонента.

Таким образом, для обеспечения качества выпускаемых отечественных вакцин препаратов необходимо совершенствование системы их контроля и стандартизации на основе международных требований. В связи с этим разработка простых, недорогих и экспрессных методов контроля вакцинных препаратов является весьма актуальной. Таким критериям отвечают реакция коагулирования (РКОА) и иммуноферментный анализ (ИФА).

Цель исследования – экспериментально обосновать и разработать технологию получения тест-систем для контроля качества вакцинных препаратов для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша на основе РКОА и ИФА.

Основные задачи исследования:

1. Разработать технологию получения антительных реагентов для конструирования тест-систем.

2. Сконструировать оптимальные композиции тест-систем на основе РКОА и ИФА.

3. Оценить качество разработанных тест-систем по основным валидационным критериям.

4. Определить область применения разработанных тест-систем в системе контроля качества препаратов для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша.

Научная новизна.

1. Экспериментально обоснована и разработана оригинальная конструкция тест-системы для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в РКОА «ТН-ДСК-КОА» с окрашенными коаггутинационными диагностическими реагентами, отвечающая по своим валидационным характеристикам требованиям действующих нормативных документов.

2. Впервые показана возможность применения для оценки подлинности, полноты сорбции дифтерийного, столбнячного и коклюшного компонентов комбинированных вакцин и экспрессного слежения за целевым продуктом в условиях производства БКВ и столбнячного анатоксина метода «in vitro» - РКОА с использованием разработанной тест-системы «ТН-ДСК-КОА».

3. Экспериментально обоснована и разработана оригинальная конструкция иммуноферментной тест-системы (ИФТС) для определения специфической активности субстанции БКВ «ИФА КАГ» на основе амплифицирующей системы авидин-биотин. Впервые аттестован отечественный стандарт субстанции БКВ. Разработана методика определения количественного содержания антигенной фракции *Bordetella pertussis* в сравнении с разработанным референс-препаратом специфической активности субстанции БКВ.

Практическая значимость работы, внедрение результатов исследования.

1. Разработана технология изготовления тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в РКОА («ТН-ДСК-КОА»). Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на производство тест-системы «ТН-ДСК-КОА» (инструкция по применению (утв. 29.05.2012), технические условия 9388-164-14237183-2012, промышленный регламент № 04862997-84-12).

2. По результатам испытания набора «ТН-ДСК-КОА» в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России сделано заключение, что метод РКОА с использованием разработанной тест-системы пригоден для определения подлинности и полноты сорбции дифтерийного, столбнячного и коклюшного (цельноклеточного и бесклеточного) компонентов вакцинных препаратов. Метод контроля вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша по показателям «Подлинность» и «Полнота сорбции» с применением набора «ТН-ДСК-КОА» в РКОА включен в проекты ФСП «Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетиче-

ская (Вакцина АКДС-Геп В+Ніb)» и «Вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетическая (Вакцина аАКДС-Геп В+Ніb)».

3. Разработана технология изготовления ИФТС для определения специфической активности субстанции БКВ «ИФА КАГ». Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на производство тест-системы «ИФА КАГ» (инструкция по применению (утв. 20.11.2013), технические условия 9388-167-14237183-2013, проект опытно-промышленного регламента).

4. Метод контроля субстанции БКВ по показателю «Специфическая активность» с использованием разработанной ИФТС включен в проект ФСП «Вакцина коклюшная бесклеточная очищенная, субстанция».

Апробация работы. Результаты проведенных исследований были доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» (г. Москва, 2010); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Курского государственного медицинского университета (г. Курск, 2010); Научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию ПГФА «Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов – от разработки до коммерциализации» (г. Пермь, 2011); X съезде ВНПОЭМП «Инфекция и иммунитет» (г. Москва, 2012).

Личное участие автора в получении научных результатов. Данные, приведенные в диссертации, получены при непосредственном участии автора на всех этапах планирования и проведения экспериментальных исследований, статистической обработки полученных результатов, внедрения их в производство и написании публикаций.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Исследования выполнены в соответствии с планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, номер государственной регистрации 01.9.50 007426.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Технология получения тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в РКОА «ТН-ДСК-КОА». Валидация разработанной тест-системы.

2. Использование «ТН-ДСК-КОА» в системе контроля качества вакцинных препаратов для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша.

3. Технология получения тест-системы иммуноферментной для определения специфической активности вакцины коклюшной бесклеточной очищенной, субстанции «ИФА КАГ». Валидация разработанной тест-системы.

4. Использование «ИФА КАГ» в системе контроля качества коклюшного компонента вакцинных препаратов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (главы 2-5), выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 185 страницах машинописного текста (из них 26 страниц приложения), содержит 16 рисунков, 42 таблицы. Указатель литературы состоит из 200 источников, из них 101 на иностранных языках.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2, 7 паспорта специальности – технология получения лекарств.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава посвящена анализу данных литературы, касающихся классификации современных комбинированных вакцин и их роли в практике здравоохранения, а также методов специфической оценки компонентов вакцин и их стандартизации. Приведены сведения, обосновывающие необходимость совершенствования технологий производства и методов контроля вакцинных препаратов.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования.

При конструировании и оценке тест-систем были использованы препараты производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», а также реагенты производства фирмы «Sigma», США (пероксидаза хрена высокоочищенная, авидин-пероксидаза, N-гидроксисукцинимидобиотин); цианбромированная сефароза 4В фирмы «GE healthcare» (Швеция); субстрат хромогенный фирмы «Хема» (Россия); полистироловые планшеты однократного применения фирмы «Microlon Griener» (Германия).

Для получения гипериммунных сывороток использовали кроликов породы шиншилла весом 2,5-3,0 кг (отделение воспроизводства филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»). Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Белок определяли методом Лоури и спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Серологические реакции (реакцию флоккуляции (РФ), реакцию агглютинации (РА), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), метод радиальной иммунодиффузии (РИД)) выполняли в соответствии с общепринятыми методиками. РА для определения коклюшных антител проводили с помощью диагностикума коклюшного

жидкого (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, г. Москва) и коклюшной суспензии инактивированной (филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»). РНГА для определения дифтерийных и столбнячных антител проводили в микроварианте с помощью эритроцитарных антигенных диагностикумов (экспериментальные серии, филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»). РИД выполняли с использованием моноспецифических сывороток для количественного определения иммуноглобулинов сыворотки крови человека. Реакцию коаггутинации (РКОА) и реакцию бактериосорбции иммунных комплексов (РБИК) выполняли на стекле. Результаты учитывали в пределах 5-10 мин визуально по 4-х крестной системе. Для аффинной хроматографии и гельхроматографии использовали оборудование фирмы «LKB» (Швеция). Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) выполняли с помощью жидкостного хроматографа, включающего хроматографическую колонку GE Healthcare Superdex 200 10/300 GL. Статистический анализ результатов был проведен с использованием методов описательной статистики. В работе использовали электронные таблицы Excel для Windows (Microsoft), а также компьютерную программу «Minitab16». Результаты, полученные при проведении иммуноферментного анализа, обрабатывались с помощью компьютерной программы «Паралайн», разработанной в ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича».

Третья глава содержит результаты исследований по получению антительных компонентов для конструирования тест-систем.

При конструировании диагностических тест-систем, рассчитанных на выявление антигенов, основными индикаторными препаратами являются антитела. Поэтому первым этапом наших исследований по разработке коаггутинационного набора и ИФТС было получение и подбор иммунных сывороток для выделения антител. С этой целью нами апробированы различные схемы иммунизации кроликов дифтерийным и столбнячным очищенными анатоксинами, а также клеточным и бесклеточным коклюшными антигенами.

Поскольку очищенным анатоксинам свойственна относительно невысокая иммуногенность, с целью стимуляции иммунного ответа у животных применяли цикловую иммунизацию с предварительным грундрованием, используя адьюванты. Наши исследования охватывали наблюдения более чем на 100 животных. Анализ сывороток проводили с помощью РНГА. Лучшие показатели продукции антител были у кроликов, иммунизированных по схемам, представленным в таблице 1, причем в ряде групп отмечалась положительная сероконверсия у 100 % животных.

Таблица 1. Схемы иммунизации кроликов для получения гипериммунных противодифтерийных и противостолбнячных сывороток

| Схема иммунизации | Результаты титрования противодифт. сывороток (РНГА)* | Результаты титрования противостолб. сывороток (РНГА)* |
|--|--|---|
| Адьювант: гель гидроксида алюминия. Грундирующее: 30 – 100 Lf анатоксина (внутримышечно). I цикл иммунизации (через 3-4 недели): до 6 инъекций (подкожно) нарастающих доз анатоксина (10, 20, 30, 40, 50, 60 Lf), с интервалом в 3-5 дней. II - IV цикл иммунизации (через 2 недели): по 2-4 инъекции (подкожно) в дозах анатоксина 20-50 Lf. | 135353,26 [104631,52 ÷ 175095,48] | 62413,5 [37064,77 ÷ 87762,23] |
| I иммунизация: 2 инъекции (внутримышечно) в дозе 40 Lf анатоксина с ПАФ и гелем гидроксида алюминия. II иммунизация (через 4 недели): 2 инъекции в дозе анатоксина 400 Lf с гелем гидроксида алюминия. | 25600 [15186,7 ÷ 43153,5] | 42001,17 [32563,85 ÷ 51438,49] |

Примечание: * величина, обратная разведению сыворотки

Для получения гипериммунных противокклюшных сывороток животных иммунизировали как клеточным (КС), так и бесклеточным (КАГ) антигенами. Сыворотки анализировали в РА, а также определяли титр с применением разработанной нами экспериментальной ИФТС на основе белка А, меченного пероксидазой хрена (табл. 2).

Таблица 2. Схемы иммунизации кроликов для получения гипериммунных противокклюшных сывороток

| Схема иммунизации | Результаты титрования сывороток | |
|---|---------------------------------|--------|
| | РА* | ИФА* |
| Иммунизация клеточным антигеном: Первый цикл: 4 инъекции с интервалом 5-7 дней. Для первой и второй инъекции использовали КС, разведенную до концентрации 2,5 МЕ/мл, для 3-й и 4-й - до 5 МЕ/мл, введение - подкожно. Второй цикл (через 2 недели после окончания первого): 2 инъекции с интервалом 5-7 дней. КС разводили до концентрации 5 МЕ/мл, введение - внутривенно и подкожно. | 12800 – 102400 | ≥25600 |
| Иммунизация КАГ: I иммунизация: 2 инъекции (внутримышечно) в дозе 100 мкг КАГ с ПАФ и гелем гидроксида алюминия. II иммунизация (через 4 недели): по 2 инъекции (внутримышечно) в дозе 400 мкг с гелем гидроксида алюминия. | 25600 – 102400 | ≥51200 |

Примечание: * величина, обратная разведению сыворотки

У кроликов, иммунизированных по обеим схемам, отмечалась положительная сероконверсия у 100 % животных. При этом высокие титры антител в сыворотках 60 % иммунизированных животных оставались длительно на стабильном уровне.

В ранее проведенных в Пермском НПО «Биомед» экспериментах было установлено, что рутинная методика получения стафилококковых реагентов с использованием нативных сывороток не обеспечивает полного выявления высоких потенциальных возможностей РКОА, в связи с чем для приготовления диагностикумов была показана целесообразность использования аффинноочищенных антител. С целью получения из гипериммунных кроличьих сывороток антительных препаратов нами сконструированы антигенные иммуносорбенты и отработаны условия проведения аффинной хроматографии. В качестве матрицы была выбрана цианбромированная сефароза 4В, при получении иммуносорбентов учитывались рекомендации фирмы-изготовителя, а также опыт, накопленный в Пермском НПО «Биомед». В ходе экспериментов по отработке условий иммуносорбции установлено, что предварительное изоосаждение антигенов с использованием натрия хлорида, а также их концентрирование способствует повышению уровня связывания с матрицей с 50-60 % до 95-100 % для дифтерийного и столбнячного анатоксинов и с 10 до 90-95 % для коклюшного антигена. При этом оптимальная нагрузка иммуносорбента по белку достигается при соотношении 10 мг антигена на 1 г сухой цианбромированной сефарозы. При сравнительном анализе исходных сывороток и аффинноочищенных антител применяли ИФА. Показано, что высокая емкость приготовленных антигенных иммуносорбентов обеспечивает получение антител с высокой удельной активностью, в 20-50 раз (для дифтерийных и столбнячных антител) и в 8-12 раз (для коклюшных антител) превышающей удельную активность исходной сыворотки (табл. 3).

Таблица 3. Оценка степени очистки антител из кроличьих сывороток

| Специфичность | Удельная активность исходной сыворотки (mME/1 мг белка) | Удельная активность аффинноочищенных антител (mME/1 мг белка) | Коэффициент очистки |
|---------------|---|---|---------------------|
| Дифтерийные | 825,0±394,0 | 24250±6100,0 | 34,5±14,6 |
| Столбнячные | 894,0±310,0 | 22650±5340,0 | 26,3±4,2 |
| | УИЕ* на 1 мг белка | УИЕ на 1 мг белка | |
| Коклюшные | 5899,0±409,6 | 59134,5±5486,5 | 10,08±1,24 |

Примечание. *УИЕ – условные иммуноферментные единицы

Анализ методами гельхроматографии на ультрагеле АсА-44 и ВЭЖХ на колонке Superdex 200 10/300 GL подтвердил высокую степень очистки и монофракционность выделенных антител, представляющих собой иммуноглобулины класса G.

Таким образом, разработанная технология обеспечивает получение аффинноочищенных антител с высокой удельной активностью, что позволило их использовать при конструировании тест-систем на основе экспрессных методов анализа – РКОА и ИФА.

Четвертая глава содержит результаты по разработке тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в РКОА.

При существующей в настоящее время практике антигенные свойства дифтерийных токсинов-анатоксинов в процессе производства и при оценке полноты сорбции в составе комбинированных препаратов определяют в реакции флокуляции, столбнячных - биологическим методом на белых мышах. При производстве цельноклеточной коклюшной вакцины регламентированным методом оценки антигенных свойств «*in vitro*» является классическая реакция агглютинации, однако данный метод неприменим для контроля бесклеточного коклюшного компонента. При контроле готового препарата по показателю «Подлинность» согласно нормативным документам на отечественные вакцины используют биологические тесты на животных. Однако Европейская Фармакопея рекомендует для этой цели применять тесты «*in vitro*». Это важно не только по чисто этическим соображениям, но научно и практически обосновано: животные дорогостоящи и не могут быть стандартизованы. В связи с этим задача расширения используемых методов контроля вакцинных препаратов является весьма актуальной. Одним из наиболее экспрессных серологических методов является реакция коаггутинации. В ее основе лежит взаимодействие определяемого антигена с антителами, фиксированными на естественном бактериально-клеточном иммобилизате – стафилококковой клетке, содержащей белок А.

В связи с этим в начале выполнения данного раздела работы нами была отработана технология получения стафилококкового бактериально-клеточного реагента (БКР), содержащего белок А: отработаны и оптимизированы стадии реакторного культивирования золотистого стафилококка штамма Cowan 1, ультрафильтрации, обезвреживания и стабилизации бактериальной суспензии. Предложен экспрессный метод контроля белка А на стадиях технологического процесса получения БКР – реакция бактериосорбции иммунокомплексов (РБИК), основанная на том, что нативная лошадиная антитоксическая сыворотка при соединении с гомологичным анатоксином приобретает способность активно взаимодействовать с белком А стафилококка. Контролируя с помощью РБИК активность белка А на этапах ультрафильтрации и стабилизации, мы отработали технологию, позволяющую получать БКР с высокой иммуноглобулинсвязывающей способностью и с оптимальными агглютинабельными свойствами.

В дальнейших исследованиях отработывались условия приготовления специфических коаггутинационных диагностикумов на основе БКР. Был проведен ряд экспериментов по подбору концентрации кроличьих антител, обеспечивающей максимально возможное насыщение рецепторного аппарата стафилококковых клеток. Показано, что оптимальная концентрация антител для конструирования диагностикумов в зависимости от их удельной активности составляла 0,8-1,2 мг по белку на 1 мл 10 % суспензии БКР. При определении чувствительности дифтерийного и столбнячного диагностикумов показано, что минимально выявляемая концентрация гомологичных анатоксинов составляла 0,03-0,06 Lf/мл. При определении специфичности и чувствительности коклюшного диагностикума мы столкнулись с проблемой отсутствия единых единиц активности для КС и БКВ. Для этого нами были введены условные коаггутинационные

единицы (КЕ), соответствующие содержанию МЕ в КС. При параллельном титровании в РКОА было рассчитано содержание КЕ в БКВ. Определено, что минимально выявляемая концентрация коклюшных антигенов – 0,3-0,6 КЕ/мл.

При разработке тест-набора мы учитывали современные тенденции по цветовой идентификации реагентов, обеспечивающие удобство работы потребителя и оптимизацию учета результатов реакции с использованием диагностикумов различной специфичности. На данном этапе работы были проведены исследования по окрашиванию БКР: подбору красителей и отработке вариантов окраски. В качестве красителей применяли окрашивающие агенты из анилиновой группы с контрастными цветами: сафранин, метиленовый синий, бриллиантовый зеленый. Далее на основе окрашенного БКР и полученных антител были приготовлены диагностикумы, представляющие собой аффинноочищенные антитела кролика к дифтерийному, столбнячному и коклюшному антигенам, фиксированные на белке А стафилококка штамма Cowan I (рис. 1). При этом антительная молекула соединяется с поверхностным белком А через Fc-фрагмент, а Fab-фрагменты остаются свободными, приобретая пространственную ориентацию, благоприятную для связывания гомологичного антигена (рис. 2).

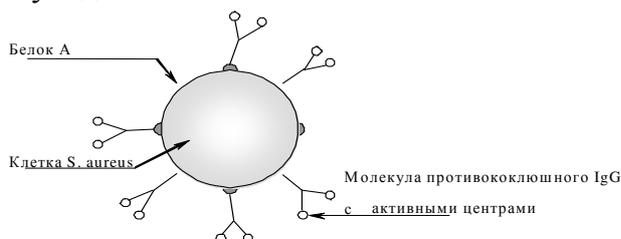


Рис. 1. Схема строения диагностикума

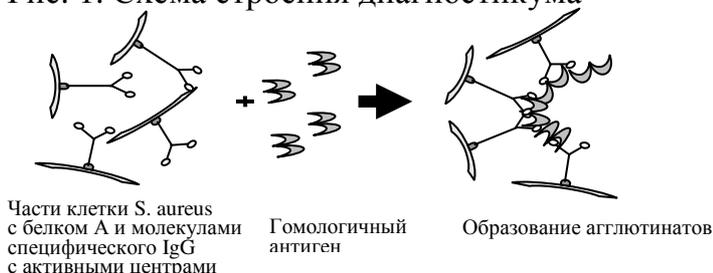


Рис. 2. Схема реакции коаглютинации

Кроме разработанных окрашенных диагностикумов для выявления дифтерийного (красного цвета), столбнячного (синего цвета) и коклюшных антигенов (зеленого цвета) тест-набор был укомплектован контрольными положительными образцами, концентратом для приготовления 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора, рН (7,3 ± 0,1). Для увеличения срока хранения диагностикумы и контрольные образцы подвергали лиофильному высушиванию.

На разработанный тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаглютинации «ТН-ДСК-КОА» составлен пакет документов, предложена технологическая схема производства (рис. 3), в соответствии с которой получены 3 экспериментально-производственные серии тест-набора.

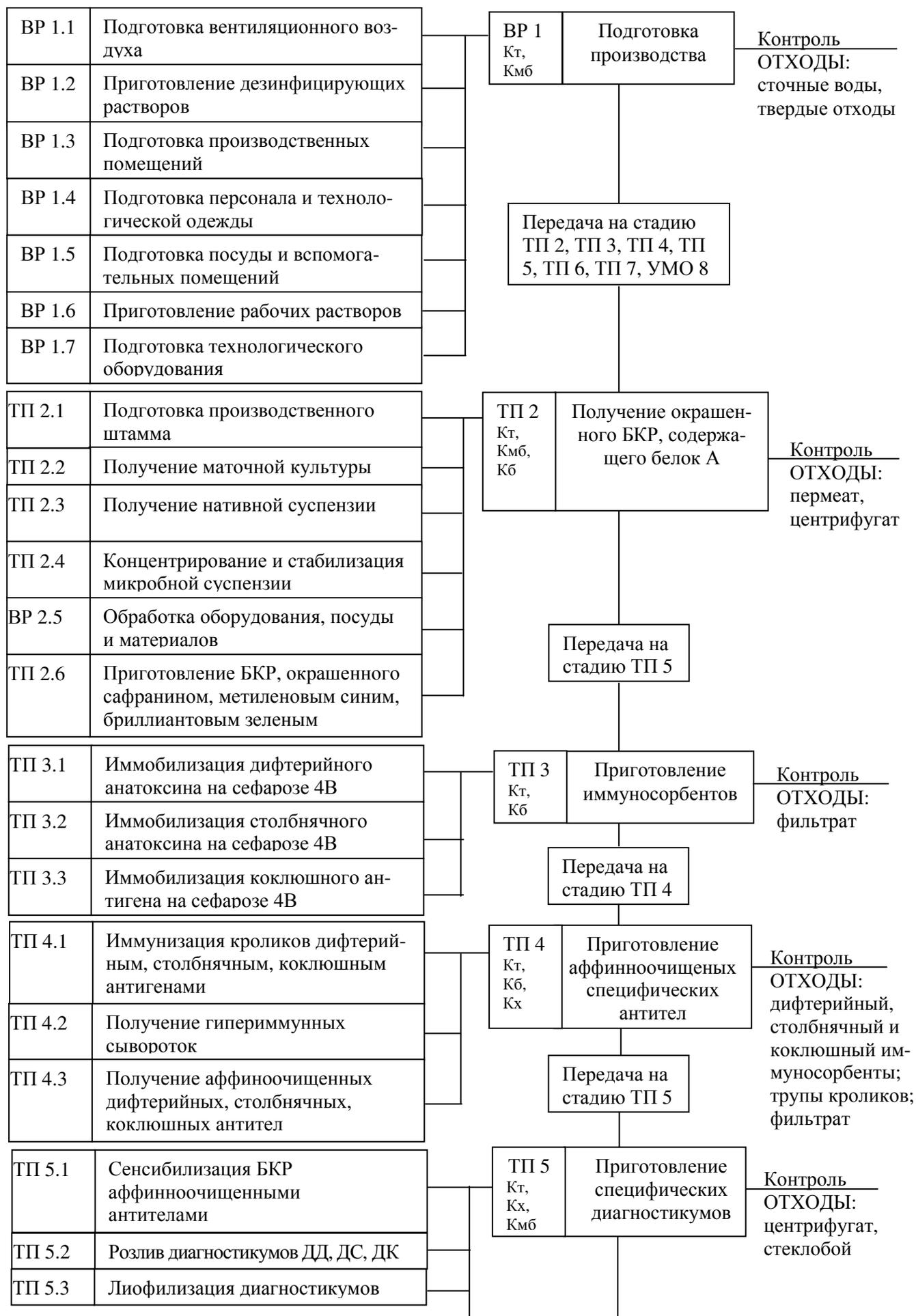




Рис. 3. Технологическая схема производства тест-набора «ТН-ДСК-КОА»

Основным условием для включения вновь разработанных тест-систем в нормативную документацию на иммунобиологические препараты является их валидация. В связи с этим нами были проведены валидационные исследования по оценке чувствительности, прецизионности (сходимости и воспроизводимости) и специфичности разработанного тест-набора. Установлено, что минимально определяемое количество специфических антигенов с использованием набора «ТН-ДСК-КОА» составляет $0,042 \pm 0,016$ Лф/мл для дифтерийного диагностикума, $0,049 \pm 0,014$ Лф/мл для столбнячного диагностикума и $0,455 \pm 0,155$ КЕ/мл для коклюшного диагностикума. Контроль специфичности показал, что диагностикумы обеспечивают образование агглютинатов в реакции с гомологичными положительными контрольными образцами и сохраняют однородность при добавлении гетерологичных контрольных образцов. Была продемонстрирована высокая точность результатов РКОА в условиях сходимости и воспроизводимости, так как доверительные интервалы при определении содержания антигенов в образцах перекрывались как при внутрилабораторном, так и межлабораторном эксперименте, проведенном в научно-исследовательской и в производственной лабораториях.

Таким образом, на основании полученных статистических данных установлено, что РКОА позволяет получать стабильные и точные результаты, обладает высокой специфичностью и достаточной чувствительностью.

Следующим этапом нашей работы стало определение области применения разработанного набора. Доказана возможность его использования для анализа готовых вакцин по показателю подлинности. Адсорбированные вакцины предварительно десорбировали.

Таблица 4. Оценка вакцинных препаратов по показателю «Подлинность» в РКОА

| Образец | Кол-во серий | Кол-во измерений | Диагностикум | | |
|-----------------------------------|--------------|------------------|--------------|------|------|
| | | | ДД | ДС | ДК |
| АКДС | 15 | 10 | ++++ | ++++ | ++++ |
| АКДС-геп В | 15 | 10 | ++++ | ++++ | ++++ |
| аАКДС* | 9 | 10 | ++++ | ++++ | ++++ |
| аАКДС-Геп* | 6 | 10 | ++++ | ++++ | ++++ |
| Вакцина Инфанрикс (Бельгия) | 3 | 10 | ++++ | ++++ | ++++ |
| Вакцина Инфанрикс Гекса (Бельгия) | 1 | 10 | ++++ | ++++ | ++++ |
| Вакцина Тетраксим (Франция) | 1 | 10 | ++++ | ++++ | +++ |
| Вакцина Пентаксим (Франция) | 3 | 10 | ++++ | ++++ | +++ |
| АДС-М-анатоксин | 14 | 10 | ++++ | ++++ | - |
| АС-анатоксин | 5 | 10 | - | ++++ | - |
| АД-М-анатоксин | 5 | 10 | ++++ | - | - |
| Вакцина Хаврикс (Бельгия) | 3 | 10 | - | - | - |
| Вакцина Энджерикс В (Бельгия) | 3 | 10 | - | - | - |
| Вакцина гепатита В рекомбинантная | 3 | 10 | - | - | - |
| АКТ-ХИБ (Франция) | 3 | 10 | - | ++++ | - |
| Хиберикс (Бельгия) | 3 | 10 | - | ++++ | - |
| ХИБ-вакцина (Индия) | 3 | 10 | - | ++++ | - |
| Кими-ХИБ (Куба) | 3 | 10 | - | ++++ | - |

Примечание. * экспериментально-производственные серии

При постановке РКОА с комбинированными вакцинами, содержащими дифтерийный, столбнячный и коклюшный компоненты (АКДС, АКДС-Геп В, аАКДС, аАКДС-Геп В, Инфанрикс, Инфанрикс Гекса, Тетраксим, Пентаксим), наблюдалась четкая положительная реакция со всеми диагностикумами. При этом отсутствовала неспецифическая реакция диагностикумов с препаратами, не содержащими гомологичных антигенов (табл. 4). Кроме того, столбнячный диагностикум позволяет подтвердить в РКОА подлинность белка-носителя (столбнячного анатоксина) в составе конъюгированных вакцин (АКТ-ХИБ, Хиберикс, ХИБ-вакцина, Кими-ХИБ). Была доказана возможность использования РКОА для оценки по показателю «Подлинность» субстанций, которые используются для получения адсорбированных комбинированных вакцин: очищенных концентрированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов, КС и БКВ.

Показано, что РКОА является достаточно информативным методом при оценке полноты сорбции антигенов на геле гидроксида алюминия. С использованием набора «ТН-ДСК-КОА» была подтверждена полнота сорбции антигенов непосредственно в процессе производства 53 серий сорбированных вакцин (АДС-М, АД-М, АС, АКДС, АКДС-Геп В, аАКДС, аАКДС-Геп В). Установлено, что все исследованные препараты соответствуют требованиям нормативной документации по полноте сорбции дифте-

рийного и столбнячного анатоксинов (для дифтерийного – не более 1 Лf/мл, для столбнячного – не более 0,1 ЕС/мл в надосадочной жидкости). С помощью РКОА рассчитано максимально допустимое количество неадсорбированного бесклеточного коклюшного антигена в надосадочной жидкости вакцинных препаратов - 1,25 КЕ/мл. Данный показатель был включен в ФСП на вакцину аАКДС-Геп В+Ніb.

Нам представлялось важным оценить возможность применения РКОА как экспрессного метода для оперативного слежения за целевым продуктом непосредственно в условиях биотехнологического производства, в частности, в процессе получения БКВ. Показано, что использование РКОА для слежения в режиме «онлайн» за целевой фракцией как в процессе диафильтрации с целью очистки от низкомолекулярных балластных примесей, так и на всех последующих технологических стадиях, обеспечивает оперативное получение результатов, что создает возможность экстренной коррекции технологического процесса. Кроме того, показана возможность использования РКОА для контроля производства столбнячного анатоксина. Особенно следует подчеркнуть, что как биологический тест, применяемый для контроля столбнячного компонента, так и традиционно используемые серологические методы, требуют значительного времени как на подготовительные работы, так и на осуществление самого анализа, в то время как для проведения РКОА необходимо 5 – 10 мин (табл. 5).

Таблица 5. **Продолжительность методов анализа для оценки вакцинных препаратов**

| Тесты, используемые для оценки | Продолжительность анализа |
|--------------------------------|---------------------------|
| Биопроба | 28-37 дней |
| Преципитационные методы | 36-48 ч |
| Предлагаемая РКОА | 5-10 мин |

Таким образом, нами была показана возможность применения разработанного тест-набора «ТН-ДСК-КОА» для контроля дифтерийного, столбнячного и коклюшного компонентов вакцинных препаратов. РКОА с использованием «ТН-ДСК-КОА» включена в проекты ФСП «Вакцина АКДС-Геп В+Ніb» и «Вакцина аАКДС-Геп В+Ніb» для оценки по показателям «Подлинность» и «Полнота сорбции».

Пятая глава посвящена конструированию ИФТС на основе авидин-биотинового взаимодействия для оценки специфической активности субстанции БКВ. На базе Пермского НПО «Биомед» разработана технология производства БКВ и проведены исследования по включению ее в состав комбинированных вакцинных препаратов. В связи с отсутствием утвержденных на международном уровне методов контроля субстанции БКВ, а также стандарта субстанции актуальной являлась разработка метода определения специфической активности антигенной фракции *Bordetella pertussis* в ИФА и оценка возможности включения его в нормативную документацию на БКВ.

Чувствительность и специфичность твердофазных иммуноферментных методов в значительной степени зависит от качества входящих в комплект тест-систем ингредиентов. В своих исследованиях мы пошли по пути создания ИФТС, основанной на сэндвич-варианте ИФА: ее основными компонентами являются специфические антитела, иммобилизованные на полистироловых планшетах, и конъюгаты, полученные на основе амплифицирующего комплекса авидин-биотин.

На первом этапе проводились исследования по отработке методики фиксации антител на твердой фазе, на основании которых были выбраны оптимальные условия сенсибилизации планшетов: доза аффинноочищенных антител 2 мкг/мл (по белку), карбонат-бикарбонатный буферный раствор pH $9,6 \pm 0,1$, время и температура инкубации 18-20 часов при 4 °С. Для решения проблемы хранения иммуносорбента нами введена стадия дополнительной обработки сенсибилизированных планшетов 4 % раствором сахарозы, содержащим БСА в концентрации 1 мг/мл, что способствовало сохранению свойств иммобилизованных антител в течение 12 месяцев.

Известно, что использование авидина и биотина является одним из наиболее эффективных методов введения ферментной метки при конструировании конъюгата, в значительной степени повышающим специфичность и чувствительность анализа. В связи с этим нами была отработана методика получения биотинилированных коклюшных антител кролика. При оценке конъюгата использовали коэффициент позитивности (КП) - отношение средней оптической плотности (ОП) лунок с исследуемым образцом к средней оптической плотности отрицательного контрольного образца (ОП К+ / ОП К-). При этом определяли специфическую активность, соответствующую минимально определяемой концентрации антигенной фракции *B. pertussis* (КАГ), выражаемой в титре - величине, обратной максимальному разведению, КП которого ≥ 3 . Оптимальным считали конъюгат, при использовании которого ОП К- составляла $\leq 0,150$; титр КАГ - ≥ 6400 . Показано, что антитела, полученные с применением колоночного метода аффинной хроматографии из сывороток кроликов, иммунизированных КАГ, позволяют получить конъюгат с достаточно высокой чувствительностью в сочетании с минимальным уровнем фоновых реакций.

Кроме того, при определении оптимальных условий постановки иммуноферментной реакции были исследованы варианты возможных реагентов и параметры их применения: выбор буферных растворов, блокирующего агента, системы детекции, субстрата; определены оптимальные концентрации реагентов, а также оптимальная температура и время проведения отдельных этапов реакции.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработана конструкция ИФТС, основанная на взаимодействии аффинноочищенных антител, иммобилизованных на полистироловом планшете, с антигенной фракцией *B. pertussis*. После фиксации на твердой фазе коклюшных антигенов не прореагировавшие компоненты системы удаляют из сферы реакции путем последовательных промывок белково-солевым раствором с детергентом. Образовавшийся комплекс антиген-антитело выяв-

ляют с помощью амплифицирующей авидин-биотиновой системы, состоящей из аффинноочищенных коклюшных антител кролика, меченных биотином, и авидина, меченного пероксидазой хрена, которая обуславливает гидролиз перекиси водорода, регистрируемый по изменению окраски индикатора.

Использование данной тест-системы требует стандартизации учета результатов, что ставит задачу разработки положительного контрольного образца с заданной специфической активностью. В связи с этим нами разработан стандартный образец, в котором была определена специфическая активность, соответствующая минимально определяемой концентрации, выражаемой в титре.

Итогом исследований явилась разработка набора реагентов «ИФА КАГ» для определения специфической активности субстанции БКВ (табл. 6). На разработанную ИФТС был составлен пакет документов, включающий инструкцию по применению, технические условия и проект опытно-промышленного регламента.

Таблица 6. Состав разработанной ИФТС

| Компонент | Состав |
|--|---|
| Иммуносорбент | Полистироловый планшет с иммобилизованными аффинноочищенными коклюшными антителами кролика |
| Раствор для промывания планшетов, разведения антигенов и конъюгата | Фосфатно-солевой буферный раствор с твином-20 (рН 7,2-7,4) |
| Блокатор | Белково-солевой раствор на основе казеина |
| Контрольный положительный образец | Субстанция БКВ |
| Конъюгат | Аффинноочищенные коклюшные антитела кролика, меченные N-гидроксисукцинимидобиотином, и авидин-пероксидаза |
| Субстратный раствор | Раствор 3,3',5,5' -тетраметилбензидина |
| Стоп-реагент | 5 % раствор серной кислоты |
| Инструкция по применению | |

С целью экспериментального доказательства пригодности разработанной ИФТС нами были определены ее основные валидационные характеристики в соответствии с требованиями ВОЗ, предъявляемыми к наборам для иммунологических испытаний. Каждый образец анализировали не менее 3 раз (внутрипостановочный коэффициент вариации - ВКВ), а также с использованием разных серий тест-систем и сменой оператора в различные дни (межпостановочный коэффициент вариации - МКВ).

Правильность метода оценивали посредством анализа корреляции между значением специфической активности стандартного образца, которое было принято как условно истинное, и полученным в нескольких постановках значением, которое, согласно критерию приемлемости, должно составлять 80-120% от истинного значения. Установлено, что измеренная специфическая активность стандартного образца лежит в пределах допустимого диапазона (103,1%), что свидетельствует о правильности методики. Для оценки прецизионности (сходимости и воспроизводимости) мы сравнили относительное стандартное отклонение, рассчитанное для 9 определений, выполненных тремя исполнителями в разные дни.

Таблица 7. Результаты определения прецизионности методики оценки специфической активности субстанции БКВ

| Образец | Исполнитель | \bar{x} | ВКВ, % | Норма | МКВ, % | Норма |
|-------------|-------------|-----------|--------|-------|--------|-------|
| Стандартный | 1 | 10080,1 | 4,23 | <5 | 6,04 | <10 |
| | 2 | 9244,8 | 3,74 | | | |
| | 3 | 10416,9 | 1,95 | | | |
| Исследуемый | 1 | 5426,9 | 3,31 | | | |
| | 2 | 4614,0 | 3,16 | | 7,82 | |
| | 3 | 4870,6 | 4,13 | | | |

Как видно из данных таблицы 7, как внутри- так и межпостановочные коэффициенты вариации находятся в пределах нормы, что свидетельствует о достаточно высокой точности результатов измерений.

Дисперсионный анализ, проведенный с помощью компьютерной программы «Паралайн», разработанной в ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича», показал наличие линейности и параллелизма результатов измерения стандартного препарата, калибратора и экспериментальной серии БКВ (табл. 8, рис. 4), что свидетельствует о правильности выбора контрольного положительного образца, а также схемы и способа приготовления разведений для определения специфической активности выпускаемых серий БКВ с помощью иммуноферментного анализа.

Таблица 8. Результаты сравнения специфической активности стандарта, положительного контрольного образца и экспериментальной серии БКВ

| Источник вариации | Степень свободы | Сумма квадратов | Средний квадрат | F-теор. | F-экспер. | Вывод |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|-----------|---------|
| Измерения (дозы) | 14 | 6,4197 | 0,4585 | 1,92 | 593,58 | Значимо |
| Препараты | 2 | 0,0154 | 0,0077 | 3,20 | 9,98 | Значимо |
| Линейная регрессия | 1 | 6,4014 | 6,4014 | 4,06 | 8286,49 | Значимо |
| Параллелизм | 2 | 0,0017 | 0,0008 | 3,20 | 1,09 | Да |
| Линейность | 9 | 0,0012 | 0,0001 | 2,10 | 0,17 | Да |

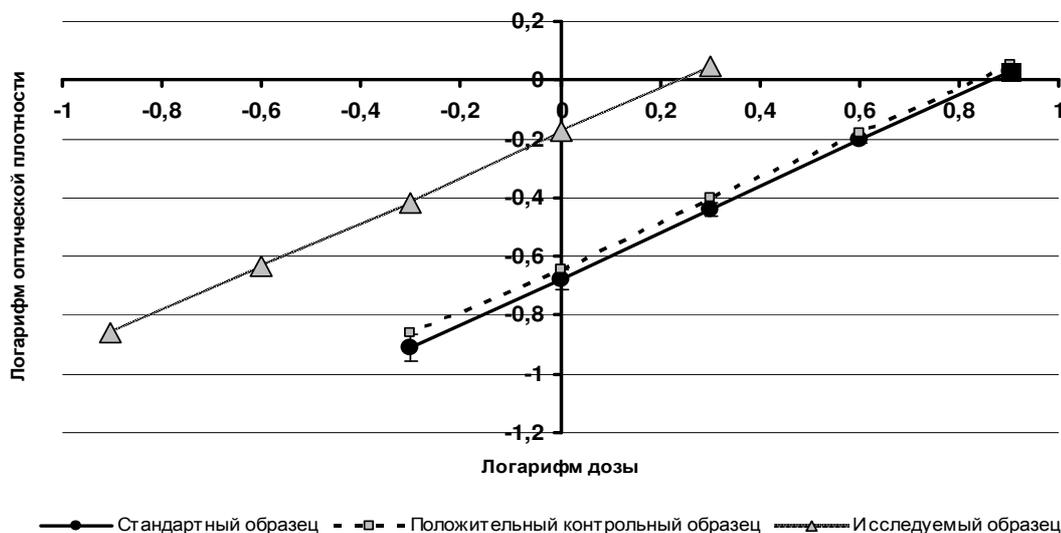


Рис. 4. Сравнение специфической активности стандартного, контрольного положительного образцов и экспериментальной серии БКВ в ИФА

Подтверждена специфичность разработанной тест-системы. Показано, что при постановке реакции с использованием дифтерийного и столбнячного анатоксинов – полуфабрикатов комбинированных вакцин, взаимодействие с неспецифичными антигенами отсутствовало.

При оценке робастности установлено, что изменение температурного режима на 2 °С и времени инкубации на 10 мин не влияют на результаты определения специфической активности. Коэффициент вариации при этом не превышал 10 %, что подтверждает надежность методики.

Определение диапазона применения при анализе каждой точки калибровочной кривой показало, что значения относительного стандартного отклонения (RSD) и t критерия Стьюдента для всех точек удовлетворяют критериям приемлемости, что свидетельствует о правильности выбора схемы и способа приготовления разведений контрольного положительного образца для использования его в качестве калибратора в разработанной ИФТС. При оценке чувствительности установлено, что минимальная определяемая концентрация коклюшного антигена составляет 0,54 ИЕ/мл.

Таким образом, проведенные исследования показали, что ИФТС для определения специфической активности субстанции БКВ по своим качествам в полной мере отвечает требованиям ВОЗ, предъявляемым к наборам для иммунологических испытаний, обеспечивая достаточно высокую степень достоверности результатов анализа.

Далее нами была изучена возможность использования разработанной ИФТС для оценки специфической активности субстанции БКВ. Анализу подвергались экспериментально-производственные серии субстанции БКВ (табл. 9).

Таблица 9. Результаты определения специфической и удельной активности субстанции БКВ

| Серия субстанции БКВ | Белок, мг | Специфическая активность, ИЕ/мл | Удельная активность, ИЕ на 0,1 мг белка |
|----------------------|-----------|---------------------------------|---|
| 31 | 0,90 | 24789,6 | 2754,4 |
| 32 | 1,00 | 26468,3 | 2646,8 |
| 33 | 1,40 | 40400,6 | 2885,8 |
| 34 | 1,20 | 35337,3 | 2944,8 |
| 35 | 1,30 | 48534,6 | 3733,4 |
| 36 | 1,45 | 40695,0 | 2806,6 |
| 37+38 | 1,20 | 48684,7 | 4057,1 |
| 39+40+41 | 1,00 | 31356,0 | 3135,6 |
| | | M±m | 3120,6±506,5 |

Полученные результаты позволили установить нормы показателей для вновь получаемых серий субстанции БКВ: специфическая активность - не менее 10000 ИЕ/мл, удельная активность - не менее 1000 ИЕ на 0,1 мг белка. Значения

данных показателей были включены в раздел «Спецификация» проекта ФСП «Вакцина коклюшная бесклеточная очищенная, субстанция».

Таким образом, в результате проведенных исследований экспериментально обоснованы и разработаны оригинальные конструкции тест-систем для контроля вакцинных препаратов «ТН-ДСК-КОА» и «ИФА КАГ», проведена их валидация и оценка возможности применения в производственном процессе.

В заключение следует отметить, что применение РКОА с использованием разработанной тест-системы «ТН-ДСК-КОА» для определения подлинности и полноты сорбции позволяет гармонизировать методы контроля вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша с требованиями международных нормативных документов. Кроме того, разработанный тест-набор может быть использован для контроля подлинности зарубежных вакцинных препаратов, поступающих на отечественный рынок. Создание ИФТС для количественной оценки специфической активности субстанции БКВ «ИФА КАГ» является важным звеном в разработке системы контроля вакцинных препаратов с бесклеточным коклюшным компонентом.

Выводы

1. Разработана технология получения антительных препаратов с использованием аффинной хроматографии для конструирования тест-систем на основе РКОА и ИФА.

2. Разработан тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в РКОА «ТН-ДСК-КОА», в состав которого входят окрашенные коаггутинационные диагностикумы. Впервые с применением амплифицирующей системы авидин-биотин разработана конструкция иммуноферментной тест-системы для оценки специфической активности субстанции БКВ.

3. Качество разработанных тест-систем соответствует требованиям ВОЗ, предъявляемым к наборам для иммунологических испытаний, по критериям прецизионности (сходимости и воспроизводимости), чувствительности, специфичности. Для количественной тест-системы «ИФА КАГ» дополнительно показано соответствие валидационных параметров линейности, параллелизма, диапазона применения и робастности критериям, регламентированным действующими нормативными документами.

4. Методы контроля качества вакцинных препаратов с использованием разработанных тест-систем «ТН-ДСК-КОА» и «ИФА КАГ» включены в нормативную документацию (регламенты, проекты ФСП «Вакцина АКДС-Геп В+Нib», «Вакцина аАКДС-Геп В+Нib», «Вакцина коклюшная бесклеточная очищенная, субстанция»).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Калашникова, Е.А. Разработка и оценка иммуноферментной тест-системы для выявления коклюшных антигенов / Калашникова Е.А., Николаева А.М., Сперанская В.Н., Соснина О.Ю. // Вестник ПГФА. – 2010. - №7. – С. 268-270.
2. Николаева, А.М. Разработка метода контроля комбинированных вакцин по показателю подлинности в тесте *in vitro* / Николаева А.М. Сперанская В.Н., Соснина О.Ю., Калашникова Е.А. // Биопрепараты. - 2010. – № 3 (39). – С. 40.
3. Николаева, А.М. Разработка метода контроля комбинированных вакцин по показателю подлинности в тесте *in vitro* / Николаева А.М., Сперанская В.Н., Соснина О.Ю., Калашникова Е.А. // Тез. Всеросс. науч.-практич. конф. «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – М., 9-10 ноября 2010 г. – С. 89.
4. **Николаева, А.М. Новый подход к определению подлинности комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша / Николаева А.М., Сперанская В.Н., Соснина О.Ю., Калашникова Е.А., Грязнова Д.В., Пушкарева Е.В. // Сибирский медицинский журнал. – 2011. - №2. – с. 70-74.**
5. Сперанская, В.Н. Разработка иммуноферментных тест-систем для определения дифтерийного и столбнячного анатоксинов / Сперанская В.Н., Соснина О.Ю., Калашникова Е.А. // III Всеросс. науч.-практич. конф. с международ. участием, посв. 75-л. Курского гос. мед. университета. – Курск, 2010. – С. 148-150.
6. Калашникова, Е.А. Использование цветных реагентов для определения дифтерийного, столбнячного анатоксинов и коклюшных антигенов в реакции коагуляции / Калашникова Е.А., Сперанская В.Н., Соснина О.Ю. // Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов – от разработки до коммерциализации: мат-лы науч.-практич. конф. с международ. участием, посв. 75-летию ПГФА. – Пермь, 7-9 декабря 2011 г. – С. 87.
7. **Калашникова, Е.А. Оценка подлинности гепатитного компонента в составе комбинированных вакцин с использованием реакции коагуляции / Калашникова Е.А., Сперанская В.Н., Соснина О.Ю. // Инфекция и иммунитет: мат-лы X съезда ВНПОЭМП. – М., 12-13 апреля 2012 г. – Т2, №1-2. – С. 445.**
8. Калашникова, Е.А. Разработка тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коагуляции и его экспериментальная оценка / Калашникова Е.А., Николаева А.М., Сперанская В.Н., Соснина О.Ю. // Биопрепараты. – 2013. - № 4 (48). – С. 18-23.
9. **Соснина, О.Ю. Бактериально-клеточный реагент на основе белка А: технология получения и опыт использования / Соснина О.Ю., Калашникова Е.А., Грязнова Д.В., Сперанская В.Н., Николаева А.М. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. –2013. – № 1. – С. 28-36.**

Калашникова Екатерина Александровна (Россия)

Совершенствование системы обеспечения контроля качества комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша на основе экспрессных методов анализа

Экспериментально обоснованы и разработаны оригинальные конструкции тест-систем для контроля вакцинных препаратов «ТН-ДСК-КОА» и «ИФА КАГ», проведена их валидация. Показано, что качество разработанных тест-систем полностью соответствует требованиям ВОЗ, предъявляемым к наборам для иммунологических испытаний. Реакция коаггутинации с использованием разработанной тест-системы «ТН-ДСК-КОА», в состав которой входят окрашенные коаггутинационные диагностикумы на основе аффинноочищенных кроличьих антител и бактериально-клеточного реагента, содержащего белок А, включена в нормативную документацию на вакцинные препараты для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша для контроля показателей «Подлинность» и «Полнота сорбции» (регламенты, проекты ФСП «Вакцина АКДС-Геп В+Hib» и «Вакцина аАКДС-Геп В+Hib»). Показана возможность применения реакции коаггутинации для экспрессного слежения за целевым продуктом в условиях производства бесклеточной коклюшной вакцины и столбнячного анатоксина. Метод контроля субстанции бесклеточной коклюшной вакцины по показателю «Специфическая активность» с использованием разработанной иммуноферментной тест-системы «ИФА КАГ» включен в нормативную документацию на производство бесклеточной коклюшной вакцины.

Kalashnikova Ekaterina (Russia)

Perfection the System of Quality Assurance of Combined Vaccines against Diphtheria, Tetanus, and Pertussis by the Rapid Methods of Analysis

Original constructions of test systems «TN-DSK-COA» and «IFA KAG» have been developed and validated for the purpose of controlling vaccines. It is shown that the quality of the developed test systems fully satisfies the WHO requirements for the immunological kits. The coagglutination reaction with the use of the designed test system «TN-DSK-COA» with the painted coagglutination diagnosticums based on a staphylococcal reagent containing protein A and affinity-purified antibodies has been included into the specification and technical documentation on vaccines against diphtheria, tetanus and pertussis (DTP-HepB+Hib and DTaP-HepB+Hib) as a method of control of identity index and the sorption completeness. The possibility of using the coagglutination reaction has been shown for the rapid tracking of the product in the production process of acellular pertussis vaccine and tetanus toxoid. The specific activity control method of the acellular pertussis vaccine substance with the designed ELISA system «IFA KAG» has been included into the specification and technical documentation on acellular pertussis vaccine.