

**V návaznosti na vydání pokynu ÚSKVBL/REG 8/01 vydaného ve Věstníku
ÚSKVBL č. 4/01 vydáváme české verze následujících pokynů:**

OBECNÉ POŽADAVKY PRO PRODUKCI A KONTROLU ŽIVÝCH SAVČÍCH BAKTERIÁLNÍCH A VIROVÝCH VAKCÍN PRO VETERINÁRNÍ POUŽITÍ

DEFINICE A OBECNÉ POŽADAVKY

DEFINICE

Matečné inokulum – soubor podílů nějakého přípravku, pro použití v přípravě nebo testování produktu, rozdělený do nádobek během jedné operace a společně zpracovaný takovým způsobem, aby byla zaručena jednotnost, a zpracovaný a skladovaný takovým způsobem, aby byla zaručena stabilita.

Základní inokulum buněk – soubor podílů nějakého přípravku buněk, pro použití v přípravě produktu, rozdělený do nádobek během jedné operace a společně zpracovaný takovým způsobem, aby byla zaručena jednotnost, a zpracovaný a skladovaný takovým způsobem, aby byla zaručena stabilita.

Systém jednotné inokulace – systém, podle kterého jsou připraveny po sobě následující šarže přípravku při použití stejných výchozích základních buněk nebo matečného inokula.

Pracovní inokulum – soubor podílů přípravku, sestávající z úrovně pasáže mezi matečným inokulem a poslední pasáží, který tvoří finální produkt pro použití v přípravě finálního produktu, rozdělený do nádobek během jedné operace a společně zpracovaný takovým způsobem, aby byla zaručena jednotnost, a zpracovaný a skladovaný takovým způsobem, aby byla zaručena stabilita.

Pracovní inokulum buněk – soubor podílů přípravku buněk pro použití v přípravě a testování produktu, sestávající z úrovně pasáže buněk mezi výchozími základními buňkami a buňkami použitými pro produkci, rozdělený do nádobek během jedné operace a společně zpracovaný takovým způsobem, aby byla zaručena jednotnost, a zpracovaný a skladovaný takovým způsobem, aby byla zaručena stabilita.

Kultury primárních buněk – kultury buněk, které se podstatně neliší od buněk v savčích tkáních, ze kterých byly připraveny, a se kterými nebylo provedeno více než 5 pasáží in vitro na produkční úroveň od úvodní přípravy ze tkáně zvířete.

Šarže – definované množství výchozího materiálu, obalového materiálu nebo přípravku zpracovaného v jednom postupu nebo sériích postupů tak, že může být očekáváno, že je homogenní.

Pro dokončení určitých etap výroby může být nutné rozdělit šarže do řady podšarží, které jsou dále zpracovány v jednom postupu nebo sériích postupů tak, že může být očekáváno, že každá podšarže je homogenní.

OBECNÉ POŽADAVKY

Všechny živé vakcíny musí být za normálních okolností v souladu s těmito obecnými pokyny, pokud zvláštní specifické pokyny neuvádějí jinak.

Musí být také dodrženy další požadavky s ohledem na specifická kontaminující agens (např. BSE), stanovené v jiných dokumentech.

Soulad s pokyny poskytuje jistotu, že vynaložená výzkumná a vývojová práce bude považována za platnou všemi členskými státy. Nicméně, aby nedocházelo k nevhodným omezením ve vědeckém výzkumu, může být v případě, že je to oprávněné, použit alternativní přístup, než je popsán v pokynech.

Přednost však vždy musí být dána testům a metodám popsaným v Evropském lékopisu nebo, v případě že tam nejsou, v lékopisu členského státu. Jestliže jsou použity jiné testy a metody, musí být poskytnut důkaz, že tyto umožňují splnit požadavky kvality uvedeného lékopisu.

1. VÝCHOZÍ MATERIÁLY

1.1 Látky živočišného původu

Látky živočišného původu (např. sérum, trypsin a sérový albumin) mohou být použity během výroby veterinárních imunologických přípravků, jako součástí kultivačních médií atd., nebo jako přidané součásti vakcín nebo zředovačů. Kde je to prakticky možné, doporučuje se výrobcům snížit použití takových látek na minimum.

Určitá omezení jsou na použití těchto látek uvedeným způsobem, aby se snížilo na minimum riziko spojené s patogeny, které se mohou v těchto surovinách vyskytovat. Tato omezení neplatí pro látky sterilizované vhodnou platnou metodou.

Použití látek živočišného původu jako součástí vakcín nebo zředovačů není obecně přijatelné s výjimkou, kde jsou takové látky sterilizované vhodnou platnou metodou. Kde se použití takových látek ukázalo být podstatným a sterilizace není možná, aplikují se požadavky popsané v odstavcích 1.1.1 až 1.1.4.

Látky živočišného původu použité během výroby musí být buď sterilizovány nebo podrobeny inaktivačnímu postupu platnou metodou nebo vyšetřeny na nepřítomnost cizích mikroorganismů podle odstavců 1.1.1 – 1.1.4.

Navíc k omezením dále popsaným mohou výrobci potřebovat splňovat omezení, která mohou být uložena na manipulaci s látkami živočišného původu v budovách, kde se vyrábí vakcína.

Uložená omezení těmito částmi se mohou lišit podle změn v nálezových situacích v zemi původu a v Evropě.

1.1.1 Zdroj

Musí se pečlivě zvážit riziko spojené s nakaženým zvířetem vyskytující se v navržené zemi původu látky a možnost infekčních chorob vyskytujících se u zdrojového živočišného druhu, ve vztahu k navrženému živočišnému druhu – příjemci. Musí být aplikována nejprísnější možná selekční kritéria, zejména pro

látky pro použití v přípravcích pro stejný živočišný druh a pro látky prasečího, hovězího, kozího a ovčího původu.

1.1.2 Příprava

Látky živočišného původu musí být připraveny z homogenní várky, označené číslem šarže. Šarže může obsahovat látky získané od takového množství zvířat jak je žádoucí, ale jednou označená a číslem opatřená šarže nesmí být přidána k jiné šarži nebo kontaminována žádným jiným způsobem.

Protokol o testování šarže musí obsahovat číslo šarže a zemi původu všech použitých látek živočišného původu. Kde je to vhodné, musí také obsahovat podrobnosti inaktivačního postupu, kterému byla látka podrobena, a podrobnosti vyšetřování provedených s látkou a získaných výsledků.

U všech šarží látek musí být prokázáno, že jsou prosté kontaminant, jak je popsáno dále, a/nebo musí být podrobeny vhodnému platnému inaktivačnímu postupu. Výrobce je zodpovědný za rozhodnutí, zda vyšetření provedené dodavatelem je postačující pro to, aby byly splněny požadavky.

1.1.3 Inaktivace

U vybraného inaktivačního postupu musí být prokázáno, že je schopný snížit titer, v příslušné látce, určitých možných kontaminant o nejméně 10^6 . Jestliže toto snížení titru nemůže být experimentálně prokázáno, potom musí být provedeny kinetické studie pro inaktivační postup a musí být vyhovující, berouce v úvahu možnou úroveň úvodní kontaminace.

Vzhledem k přesnému živočišnému druhu původu látky musí být seznam možných kontaminujících mikroorganismů, u kterých je prokázáno, že je inaktivační postup schopný tyto mikroorganismy přiměřeně inaktivovat. Důkaz pro účinnost postupu, který musí být ve vztahu k běžným okolnostem, může být také ve formě odkazů na publikovanou literaturu nebo experimentálního důkazu zajištěného výrobcem.

1.1.4 Testy

Pro vyšetření látky na nepřítomnost kontaminant musí být každá pevná látka rozpuštěna/suspendována ve vhodném médiu tak, aby došlo k vytvoření roztoku/suspenze, představující nejméně 30 % látky (hmotnost/objem). Jestliže látka není rozpustná nebo když se vyskytují cytotoxické reakce, může být použita nižší koncentrace.

1.1.4.1 Nepřítomnost cizích virů

Roztok/suspenze pevné látky nebo neředěné tekuté látky se musí vyšetřit na kontaminanty vhodnými citlivými metodami. Použité metody musí zahrnovat testování na vhodných citlivých buněčných kulturách zahrnujících primární buňky ze stejného živočišného druhu jako testovaná látka. Část buněk musí být pasážována nejméně dvakrát. Buňky musí být pozorovány pravidelně po 21 dnů na cytopatické účinky. Koncem každého období 7 dnů během této doby musí být část původních kultur fixována, obarvena a vyšetřena na cytopatické účinky a část vyšetřena na hemadsorbující původce. Část musí být také vyšetřena na specifické původce přiměřenými sérodiagnostickými testy.

V případě virové kontaminace musí být šarže vyřazena.

1.1.4.2 Sterilita a mykoplazmy

Před použitím musí být látky vyšetřeny na sterilitu nebo správně sterilizovány, aby se vyloučily všechny bakteriální, plísňové nebo mykoplazmové kontaminanty.

Každá šarže látky, u které se zjistí, že obsahuje živé mikroorganismy jakéhokoliv druhu, nevyhovuje a musí být vyřazena. Alternativně může být provedeno jedno nové zpracování a nové vyšetření. Jestliže se u šarže znovu prokáže, že je kontaminovaná, musí být vyřazena. Jestliže je po tomto novém zpracování zjištěno, že je šarže prostá kontaminace, potom může být materiál použit, ale současně s protokolem o vyšetření šarže musí být předloženy důvody, proč došlo k úvodnímu nedostatku.

1.2 Buněčné substráty

1.2.1 Obecné požadavky

Jestliže může být úspěšně pomnožen virus na buněčných kulturách založených na systému jednotné inokulace založených buněčných linií, nesmí být použity žádné savčí primární buňky.

Permanentě infikované buňky musí být v souladu s přiměřenými požadavky popsanými dále. Buňky musí být prokazatelně infikovány pouze požadovaným agens.

1.2.2 Požadavky na buněčné linie

Buněčné substráty použité ve výrobě musí být normálně vyprodukovány podle systému jednotné inokulace. Každé základní inokulum buněk musí být označeno zvláštním kódem pro identifikační účely. Základní inokulum buněk musí být uchováváno v podílech při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo méně. Produkce vakcíny by normálně neměla být provedena na buňkách vyšších pasáží než je 20 pasáží ze základního inokula buněk.

Kde jsou použity suspensní kultury, zvýšení počtu buněk ekvivalentní přibližně trojnásobnému zdvojení populace by mělo být považováno za ekvivalentní jedné pasáží.

Jestliže mají být použity pro produkci buňky o vyšší než uvedené pasáží, žadatel musí prokázat validací nebo dalším testováním, že produkční buňky jsou v podstatě podobné základnímu inokulu buněk vzhledem k jejich základním biologickým vlastnostem a čistotě a že použití takových buněk nemá škodlivý účinek na produkci vakcíny.

Historie buněčné linie musí být známá podrobně a zaznamenána písemně (např. původ, počet pasáží a média použitá pro jejich multiplikaci, skladovací podmínky).

Výrobce musí popsat metodu konzervování a používání buněk, včetně podrobností, jak je zaručeno, že maximální počet povolených pasáží není během výroby přípravku překročen. Dostatečný počet buněk základního inokula a buněk pracovního inokula musí být uchováván k dispozici pro testování úředními povolujícími autoritami.

Kontroly popsané dále musí být provedeny s kulturou základního inokula a pracovního inokula nebo s buňkami z pracovního inokula nejvyšší pasáže použité pro produkci (viz tabulku 1), získanými z homogenního reprezentativního vzorku. Reprezentativní charakter tohoto vzorku musí být dokázán.

Tabulka 1: stadia buněčné kultury, ve kterých musí být provedeno testování

	základní inokulum buněk	pracovní inokulum buněk	buňky pracovního inokula v nejvyšší pasáži
obecná mikroskopie	+	+	+
bakterie/plísně	+	+	–
mykoplazmy	+	+	–
viry	+	+	–
identifikace živočišného druhu	+	–	+
karyologie	+	–	+
tumorogeneze	+	–	–

1.2.2.1 Cizí kontaminanty

1.2.2.1.1 Všeobecné

Buňky musí být posouzeny pod mikroskopem na jejich vzhled, na jejich stupeň pomnožení a na ostatní okolnosti, které mohou poskytnout informace o zdravotním stavu buněk.

1.2.2.1.2 Bakterie a plísně

Buňky musí být vyšetřeny na kontaminaci bakteriemi nebo plísněmi. Kontaminované buňky musí být vyřazeny.

1.2.2.1.3 Mykoplazmy

Buňky musí být zkontrolovány na nepřítomnost mykoplazem.

1.2.2.1.4 Viry

Buňky nesmí být kontaminovány viry a kontroly musí být provedeny následujícím způsobem:

testované monolayery musí být nejméně 70 cm², připraveny a udržovány při použití média a přísad a pomnoženy za podobných podmínek jako monolayery použité pro přípravu biologického přípravku.

Monolayery musí být udrženy v kultuře po celkem nejméně 28 dnů. Subkultivace musí být provedeny v intervalech 7 dnů, ledaže by nepřeživaly po takto dlouhé časové období, kdy by subkultivace měly být provedeny v nejposlednější možný den. Dostatek buněk ve vhodných nádobách musí být vyprodukován pro závěrečnou subkultivaci pro provedení níže specifikovaných testů.

Monolayery musí být vyšetřovány pravidelně po celé období inkubace na možnou přítomnost cytopatických efektů (CPE) a na konci období vyšetřeny na CPE, hemadsorbující viry a specifické viry imunofluorescencí a dalšími přiměřenými testy, jak je uvedeno dále.

1.2.2.1.4.1 Detekce cytopatogenních virů

Dva monolayeru o nejméně 6 cm², každý musí být obarven vhodným cytologickým barvením. Vyšetří se celá plocha každého obarveného monolayeru na inkluzní tělíska, abnormální počet obrovských buněk nebo všechny další změny poukazující na buněčnou abnormalitu, které by mohly být přičteny na vrub kontaminantě.

1.2.2.1.4.2 Detekce hemadsorbujících virů

Monolayeru o celkové ploše nejméně 70 cm² musí být několikrát promyty vhodným puřem a dostatečný objem suspenze vhodných červených krvinek přidán tak, aby byl rovnoměrně pokryt celý povrch monolayeru. Po různých dobách inkubace se buňky vyšetří na přítomnost hemadsorpcce.

1.2.2.1.4.3 Detekce specifikovaných virů

Je třeba provést testy na nepřítomnost kontaminant specifických pro živočišný druh, z něhož pochází buněčná linie, a pro živočišný druh, pro který je přípravek určen.

Musí být připraven dostatek buněk na vhodných nosičích pro provedení testů na specifikované původce. V každém testu musí být zařazeny přiměřené pozitivní kontroly. Buňky jsou podrobeny vhodným testům při použití protilátek konjugovaných s fluoresceinem nebo podobnými reagensy.

1.2.2.1.4.4 Testy na dalších buněčných kulturách

Jsou potřebné monolayeru o celkem nejméně 140 cm². Buňky musí být nejméně 3x zmrazeny a rozmrazeny a potom se buněčná drť odstraní odstředěním. Podíly se inokulují na následující buňky v době, když souvislost monolayeru dosahuje 70 %:

- primární buňky zdrojového druhu zvířat;
- buňky citlivé k virům patogenním pro druh zvířat, kterému je vakcína určena;
- buňky citlivé k pestivirům.

Inokulované buňky musí být udrženy v kultuře po nejméně 7 dnů, potom se připraví střídavým zmrazováním a rozmrazováním extrakty jak je výše uvedeno a provede se inokulace na dostatek čerstvých kultur buněk stejného typu pro testování, jak je uvedeno dále. Buňky jsou inkubovány po nejméně dalších 7 dnů.

Všechny kultury musí být pravidelně vyšetřovány na přítomnost cytopatických změn, poukazujících na živé mikroorganismy.

Na konci tohoto období 14 dnů musí být inokulované buňky podrobeny následujícím kontrolám:

- nepřítomnost cytopatogenních a hemadsorbujících mikroorganismů musí být testována použitím metod specifikovaných v odstavcích 1.2.2.1.4.1 a 1.2.2.1.4.2;
- relevantní substráty jsou testovány na nepřítomnost pestivirů a dalších specifických kontaminant imunofluorescencí, jak je uvedeno v 1.2.2.1.4.3.

1.2.2.2 Identifikace živočišného druhu

Musí být prokázáno, že základní inokulum buněk a buňky z pracovního inokula v nejvyšší pasáži použité pro produkci jsou z druhu zvířat uvedeného výrobcem. To musí být prokázáno platnou metodou.

Když se provede fluorescenční test a je použito příslušné sérum proti druhu zvířat původu buněk a test ukazuje, že všechny vyšetřované buňky fluoreskují, není nutné provádět další testy s reagensy schopnými zjistit kontaminaci buňkami jiného druhu zvířat.

1.2.2.3 Karyologie

Použité buněčné linie musí být vyšetřeny následujícím způsobem:

nejméně 50 buněk procházejících mitózou musí být vyšetřeno u základního inokula buněk a nejméně 50 buněk u úrovně pasáže, která je nejvyšší pro použití ve výrobě. Každý chromozomální marker přítomný u základního inokula buněk musí být také zjištěn ve vysoké pasáži buněk. Modální počet chromozomů v těchto buňkách nesmí být více než o 15 % vyšší, než modální počet základního inokula buněk. Karyotypy musí být totožné. Jestliže modální počet převyšuje uvedenou hladinu, chromozomální markery nejsou zjištěny v buňkách pracovního inokula, nebo se liší karyotyp, nemůže být buněčná linie použita pro výrobu biologického přípravku.

1.2.2.4 Tumorogeneze

Je třeba zhodnotit možné riziko buněčné linie pro cílový druh zvířat a v případě potřeby je třeba provést testování.

1.2.3 Požadavky pro primární buňky

Pro většinu savčích vakcín není použití primárních buněk pro výrobce vakcín přijatelné. Jestliže má být vakcína připravena na primárních buňkách, tyto musí být získány ze stáda nebo hejna prostého specifikovaného patogena, majícího kompletní ochranu před zavlečením nálezů (např. protinákazové bariéry, filtry na přívodech vzduchu, nezastavena žádná zvířata bez přiměřené karantény). V případě hejn kuřat musí tato splňovat požadavky monografie Evropského lékopisu pro SPF kuřata. Pro všechna ostatní zvířata a druhy ptáků, musí být stádo nebo hejno prokazatelně prosté příslušných patogenů. Všichni chovní jedinci ve stádě nebo hejně, kteří mají být použiti k přípravě primárních buněk pro výrobu vakcíny, musí být podrobena vhodnému režimu, jako jsou pravidelné sérologické kontroly provedené nejméně dvakrát ročně a dvě dodatečná sérologická vyšetření provedená u 15 % chovných jedinců ve stádě mezi dvěma kontrolami uvedenými výše.

Všude, kde je to možné, zejména pro savčí buňky, je třeba využít systém jednotné inokulace, například základní inokulum buněk, vytvořené méně než 5 pasážemi, pracovní inokulum buněk, které nemá více než 5 pasáží od úvodní přípravy buněčné suspenze ze živočišných tkání.

Každé základní inokulum buněk, pracovní inokulum buněk a buňky nejvyšší pasáže primárních buněk musí být kontrolovány v souladu s tabulkou 2 a níže popsaným postupem. Testovaný vzorek musí pokrývat všechny zdroje buněk použitých pro výrobu šarže. Se žádnou vyrobenou šarží vakcíny připravenou na buňkách nesmí být obchodováno, jestliže kterákoli z provedených kontrol dává nevhovující výsledky.

Tabulka 2. Etapy primární buněčné kultury, ve kterých musí být provedeno testování

	základní inokulum buněk	pracovní inokulum buněk	buňky z pracovního inokula buněk v nejvyšší pasáži
obecná mikroskopie	+	+	+
bakterie/plísň	+	+	–
mykoplazmy	+	+	–
viry	+	+	–
identifikace živočišného druhu	+	–	–

1.2.3.1 Cizí kontaminanty

1.2.3.1.1 Všeobecné

Buňky musí být kontrolovány na jejich vzhled pod mikroskopem, na jejich stupeň pomnožení a na ostatní okolnosti, které mohou poskytnout informace o zdravotním stavu buněk.

1.2.3.1.2 Bakterie a plísň

Buňky musí být zkontrolovány na kontaminaci bakteriemi a plísněmi. Kontaminované buňky musí být vyřazeny.

1.2.3.1.3 Mykoplazmy

Buňky musí být zkontrolovány na nepřítomnost mykoplazem.

1.2.3.1.4 Viry

Buňky nesmí být kontaminovány viry a kontroly musí být provedeny následujícím způsobem:

testované monolayery musí být nejméně 70 cm², připraveny a udržovány při použití média a přísad a pomnoženy za podobných podmínek jako monolayery použité pro přípravu biologického přípravku.

Monolayery musí být udrženy v kultuře po celkem nejméně 28 dnů. Subkultivace musí být provedeny v intervalech 7 dnů, ledaže by buňky nepřežily po takto dlouhé časové období, kdy by subkultivace měly být provedeny v nejposlednější možný den. Dostatek buněk ve vhodných nádobách musí být vyprodukován pro závěrečnou subkultivaci pro provedení níže specifikovaných testů.

Monolayery musí být vyšetřovány pravidelně po celé období inkubace na možnou přítomnost cytopatických efektů (CPE) a na konci období vyšetřeny na CPE, hemadsorbující viry a specifické viry imunofluorescencí a dalšími přiměřenými testy, jak je uvedeno dále.

1.2.3.1.4.1 Detekce cytopatogenních virů

Dva monolayeru o nejméně 6 cm², každý musí být obarven vhodným cytologickým barvením. Vyšetří se celá plocha každého obarveného monolayeru na inkluzní tělíška, abnormální počet obrovských buněk nebo všechny další změny poukazující na buněčnou abnormalitu, které by mohly být přičteny na vrub kontaminantě.

1.2.3.1.4.2 Detekce hemadsorbujících virů

Monolayeru o celkové ploše nejméně 70 cm² musí být několikrát promyty vhodným puřem a dostatečný objem suspenze vhodných červených krvinek přidán tak, aby byl rovnoměrně pokryt celý povrch monolayeru. Po různých dobách inkubace se buňky vyšetří na přítomnost hemadsorpcce.

1.2.3.1.4.3 Detekce specifikovaných virů

Je třeba provést testy na nepřítomnost kontaminant specifických pro živočišný druh, z něhož pochází buňky, a pro živočišný druh, pro který je přípravek určen.

Musí být připraven dostatek buněk na vhodných nosičích pro provedení testů na specifikované původce. V každém testu musí být zařazeny přiměřené pozitivní kontroly. Buňky jsou podrobeny vhodným testům při použití protilátek konjugovaných s fluoresceinem nebo podobnými reagensy.

1.2.3.1.4.4 Testy na dalších buněčných kulturách

Jsou potřebné monolayeru o celkem nejméně 140 cm². Buňky musí být nejméně 3x zmrazeny a rozmrazeny a potom se buněčná drť odstraní odstředěním. Podíly se inokulují na následující buňky v době, když souvislost monolayeru dosahuje 70 %:

- buňky citlivé k virům patogenním pro druh zvířat, kterému je vakcína určena;
- buňky citlivé k pestivirům.

Inokulované buňky musí být udrženy v kultuře po nejméně 7 dnů, potom se připraví střídavým zmrazováním a rozmrazováním extrakty jak je výše uvedeno a provede se inokulace na dostatek čerstvých kultur buněk stejného typu pro testování, jak je uvedeno dále. Buňky jsou inkubovány po nejméně dalších 7 dnů.

Všechny kultury musí být pravidelně vyšetřovány na přítomnost cytopatických změn, poukazujících na živé mikroorganismy.

Na konci tohoto období 14 dnů musí být inokulované buňky podrobeny následujícím kontrolám:

- nepřítomnost cytopatogenních a hemadsorbujících mikroorganismů musí být testována použitím metod specifikovaných v odstavcích 1.2.3.1.4.1 a 1.2.3.1.4.2;
- relevantní substráty jsou testovány na nepřítomnost pestivirů a dalších specifických kontaminant imunofluorescencí, jak je uvedeno v 1.2.3.1.4.3.

1.2.3.2 Identifikace živočišného druhu

Musí být prokázáno, že základní inokulum buněk je z druhu zvířat uvedeného výrobcem (viz tabulku 2). To musí být prokázáno platnou metodou.

Když se provede fluorescenční test a je použito příslušné sérum proti druhu zvířat původu použitých buněk a všechny testované buňky fluoreskují, není nutné provádět další testy s reagensy schopnými zjistit kontaminaci buňkami jiného druhu zvířat.

- 1.2.4 Požadavky na embryonovaná vejce
Embryonovaná vejce musí být získána z SPF hejna.
- 1.2.5 Požadavky na zvířata
Zvířata musí být prostá specifikovaných patogenů, příslušících zdrojovému druhu zvířete a cílovému zvířeti.
- 1.3 Výchozí virus
- 1.3.1 Obecné požadavky
Viry použité ve výrobě musí být získány ze systému jednotné inokulace. Každé matečné inokulum viru musí být testováno, jak je popsáno dále. Pro každé jednotné inokulum musí být uchováván záznam o jeho původu, historii pasážování (včetně postupů purifikace a studia základních vlastností) a podmínkách skladování. Každé matečné inokulum viru musí být označeno zvláštním kódem pro účely identifikace. Matečné inokulum viru musí být normálně uchováváno v podílech při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo nižší teplotě, jestliže je v tekutém stavu, nebo při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo nižší teplotě, jestliže je v lyofilizované podobě. Produkce vakcíny nesmí být normálně provedena při použití viru o více než 5 pasáží od matečného inokula viru. Při testech popsanych v části 1.3.3, 1.3.4 a 1.3.5 nesmí mít použité mikroorganismy normálně více než 5 pasáží od matečného inokula viru při začátku těchto testů, pokud není uvedeno jinak.
- Kde je matečné inokulum viru obsaženo v permanentně infikovaném základním inokulu buněk, musí být následující testy provedeny s přiměřeným objemem viru z rozrušeného základního inokula buněk. Kde byly provedeny relevantní testy z rozrušených buněk pro vyhodnocení vhodnosti základního inokula buněk, nemusí být tyto testy opakovány.
- 1.3.2 Pomnožování
Matečné inokulum viru a všechny následující pasáže musí být pomnoženy na buňkách, na embryonovaných vejcích nebo na zvířatech, které se ukázaly být vhodnými pro produkci vakcíny (viz část 1.2) a všechna taková pomnožování musí zahrnovat pouze látku živočišného původu, která splňuje požadavky 1.1.
- 1.3.3 Totožnost
U matečného inokula viru musí být prokázáno, že obsahuje pouze uvedený virus. Musí být zajištěna vhodná metoda k identifikaci vakcinačního kmene viru a k jeho odlišení co nejvíce je možné od příbuzných kmenů.
- 1.3.4 Sterilita a mykoplazmy
Matečné inokulum viru musí projít testy na sterilitu a nepřítomnost mykoplazem.
- 1.3.5 Cizí původci
Musí se připravit sérum obsahující vysokou hladinu neutralizující protilátky proti viru matečného inokula, přičemž se použije antigen, který není získán ze žádné pasáže izolovaného viru, který vedl k vytvoření matečného inokula viru. Kde není možné takové sérum připravit, musí se použít jiné metody pro odstranění selektivity viru matečného inokula.

Séra se musí připravit na základě šarže. U každé šarže musí být prokázáno, že je prostá protilátek proti možným kontaminantům výchozího viru. U každé šarže musí být prokázáno, že je prostá všech nespecifických inhibičních účinků na schopnost virů infikovat buňky a pomnožovat se v buňkách (nebo ve vejcích – jestliže se jich to týká). Každá šarže musí být ošetřena při 56 °C po 30 minut pro inaktivaci komplementu.

Použitím minimálního množství séra připraveného výše uvedeným způsobem se ošetří matečné inokulum viru tak, že je neutralizována nebo odstraněna veškerá vakcína. Konečná směs virus/sérum musí obsahovat nejméně množství viru deseti dávek vakcíny v mililitru, jestliže je to možné. Směs potom musí být testována na nepřítomnost cizích agens následujícím způsobem.

Směs se inokuluje na kultury nejméně 70 cm² požadovaných buněčných typů. Kultury mohou být inokulovány v jakémkoliv stadiu pomnožování až do 70 % souvislého buněčného povrchu. Nejméně jeden monolayer každého typu musí být ponechán jako kontrola. Kultury musí být posuzovány denně po dobu jednoho týdne. Na konci tohoto období jsou kultury 3x zmrazeny a rozmrazeny, odstředěny pro odstranění buněčné drtě a znovu inokulovány na stejný typ buněk, jak je uvedeno výše. To se opakuje dvakrát. Konečná pasáž musí poskytnout dostatek buněk ve vhodných nádobách, aby se provedly testy uvedené dále.

Cytopatogenní a hemadsorbující agens se testují použitím metod popsaných v odstavcích 1.2.2.1.4.1 a 1.2.2.1.4.2. Techniky jako je imunofluorescence se použijí pro detekci specifických kontaminantů, jak je popsáno v odstavcích 1.2.2.1.4.3. Matečné inokulum viru je inokulováno na:

- primární buňky druhu zvířat původu viru;
- buňky citlivé k virům patogenním pro druh zvířat, pro který je vakcína určena;
- buňky citlivé k pestivirům.

Jestliže se u matečného inokula viru prokáže, že obsahuje živé mikroorganismy jakéhokoli druhu, jiného než je virus uvedeného druhu a kmene, potom je matečné inokulum viru nevhodné pro produkci vakcíny.

1.4 Výchozí bakterie

1.4.1 Obecné požadavky

U bakterií použitých ve vakcíně musí být uveden rod a druh (kde je to vhodné, také varianta). Je třeba uvést původ, datum izolace a označení bakteriálních kmenů a podle možnosti poskytnout podrobnosti o historii pasáže, včetně podrobností o médiích použitých v každém stadiu. Bakterie použité ve výrobě musí pocházet ze systému jednotné inokulace všude tam, kde je to možné. Každé matečné inokulum (nadále označované jako inokulum) musí být vyšetřeno, jak je uvedeno dále. Pro každé inokulum musí být uchováván záznam o původu, historii pasážování (včetně purifikace a postupů studia základních vlastností) a podmínkách uchování. Pro identifikační účely musí být každé inokulum označeno specifickým kódem.

1.4.2 Totožnost a čistota

U každého inokula musí být prokázáno, že obsahuje pouze uvedený druh a kmen bakterie. Musí být k dispozici krátký popis metody identifikující každý kmen biochemickými, sérologickými a morfologickými základními vlastnostmi a

rozlišujícími kmen, pokud je to možné, od příbuzných kmenů. Stejně musí být k dispozici metody určující čistotu kmene. Jestliže se u inokula prokáže, že obsahuje živé jiné mikroorganismy, než je uvedený druh a kmen, potom je inokulum nevhodné pro přípravu vakcíny.

1.4.3 Požadavky na inokulum

Je třeba specifikovat minimální a maximální počet subkultivací každého inokula před produkčním stadiem. Musí být popsány metody použité pro přípravu inokul, přípravu suspenzí pro kultivaci inokul, techniky pro inokulaci inokul, titr a koncentrace inokul a použitá média. Musí se prokázat, že základní vlastnosti výchozího materiálu (např. disociace nebo antigenicita) nejsou těmito subkultivacemi změněny.

Musí být popsány podmínky, za jakých je skladováno každé inokulum.

1.5 Média pro bakteriální vakcíny

Musí být uvedeno nejméně kvalitativní složení médií použitých pro přípravu inokula a pro produkci. Postupně musí být specifikovány jednotlivé ingredience. Kde jsou ingredience označeny jako chráněné, musí to být uvedeno a poskytnut přiměřený popis. Ingredience získané ze zvířat musí být specifikovány co se týče zdrojového živočišného druhu a země původu a musí být v souladu s kritérii popsanými v části 1.1. Musí být popsány postupy přípravy pro použitá média, včetně sterilizačních postupů.

1.6 Antibiotika

Přidání antibiotik v postupu výroby přípravku musí být normálně omezeno na tekutiny pro buněčnou kultivaci a ostatní média, inokula pro vejce a materiál z kůže a dalších tkání.

Pro tyto účely nesmí být povoleno pro současné použití více než tři antibiotika. Penicilin a streptomycin se nepovolují pro vakcíny k parenterální nebo aerosolové aplikaci. Jestliže použitá antibiotika nejsou doporučena pro použití u cílového druhu zvířat, musí být u nich prokázáno, že nemají škodlivý účinek na vakcinovaná zvířata.

Antibiotika nesmí být přidána k finálnímu přípravku.

1.7 Ostatní látky

Všechny ostatní látky použité v produkci vakcíny musí být připraveny takovým způsobem, aby se předešlo kontaminaci vakcíny jakýmkoli živým mikroorganismem nebo toxinem.

1.8 Vzorky

Vzorky všech výchozích surovin, reagensů, materiálů při zpracování a finálního přípravku musí být poskytnuty příslušným úřadům na požádání.

2. **FINÁLNÍ PRODUKT – VÝSLEDKY ZKOUŠEK VYŽADOVANÉ V ŽÁDOSTI O REGISTRACI**

Pro každou žádost musí být předloženy výsledky následujících testů.

2.1 Bezpečnost

Vakcíny musí být připraveny pouze z kmenů mikroorganismů, u kterých je prokázáno, že jsou bezpečné.

Testování bezpečnosti musí být provedeno tak, jak je specifikováno ve vyhlášce 473/2000Sb., v pokynu vydaném ve Věstníku ÚSKVBL 3/01 v článku „Požadavky na hodnocení veterinárních léčivých přípravků v rámci přípravy a předkládání registrační dokumentace“, a podle údajů uvedených dále.

Dávka, která má být použita, musí být takové množství přípravku, které bude doporučeno pro použití a obsahující maximální titr nebo sílu (potenci), pro které je žádost podána.

Vzorky pro testování bezpečnosti musí být odebrány ze šarže nebo šarží připravených podle výrobního postupu popsaného v žádosti o registraci.

Musí být použita vakcína připravená z nejméně atenuované pasáže, která má být použita pro přípravu.

2.1.1 Bezpečnost aplikace jedné dávky

V testu musí být u dostatečného počtu zvířat zaznamenány rektální teploty nejméně v den před vakcinací a následující čtyři dny.

2.1.2 Bezpečnost aplikace nadměrné dávky

V testu by mělo být normálně aplikováno desetinásobné maximální množství.

2.1.3 Šíření vakcinačního kmene

V testu musí být poskytnuta informace, ke kolika pasážím ze zvířete na zvíře patrně dojde za normálních okolností.

2.1.4 Návrat k virulenci

Jestliže jsou v testu zjištěny potíže v pasážování mikroorganismů přes zvířata, potom mohou být povoleny mezikroky in vitro. Pro každou pasáž musí být použita nejméně 2 zcela vnímavá zvířata. V každé pasáži musí být prokázána přítomnost živých z vakcíny získaných mikroorganismů v materiálu použitém pro pasážování. Pro vybrané mikroorganismy může příslušný úřad požadovat více pasáží na více zvířatech. Nejméně konečná pasáž musí být aplikována zvířatům, která jsou nejprůměrnější pro stanovení možného rizika.

2.1.5 Terénní ověřování

V průběhu každého terénního ověření, provedeného podle vyhlášky 473/2000Sb. a podle pokynu vydaného ve Věstníku ÚSKVBL 3/01 v článku „Požadavky na hodnocení veterinárních léčivých přípravků v rámci přípravy a předkládání registrační dokumentace“, musí studie zahrnovat měření rektálních teplot dostatečného počtu zvířat, a to před vakcinací i po vakcinaci. Musí se zaznamenat velikost a přetrvávání každé lokální reakce a podíl zvířat majících místní nebo celkové reakce. Měření výkonu se musí provádět tam, kde je to vhodné.

2.2 Účinnost

Testování účinnosti musí být provedeno podle specifikace ve vyhlášce 473/2000Sb., v pokynu vydaném ve Věstníku ÚSKVBL 3/01 v článku

“Požadavky na hodnocení veterinárních léčivých přípravků v rámci přípravy a předkládání registrační dokumentace“, a podle údajů uvedených dále.

Dávka, která má být použita, musí být takové množství přípravku, které bude doporučeno pro použití a obsahující minimální titer nebo sílu, pro které je žádost podána.

Vzorky pro testování účinnosti musí být odebrány ze šarže nebo šarží připravených podle výrobního postupu popsání v žádosti o registraci.

V těchto studiích musí být použita vakcína připravená z nejvíce atenuované pasáže, která má být použita pro přípravu.

Důkaz účinnosti musí doprovázet všechny požadované indikace. Tak například požadavek indikace na ochranu proti respiračnímu onemocnění musí osvětlit nejméně skutečnost o ochraně před klinickými příznaky respiračního onemocnění. Kde je požadavek na ochranu před infekcí, musí to být prokázáno pomocí metod reizolace. Kde se předpokládá více než jedna požadovaná indikace, bude požadováno doložení pro každou z nich.

Bude se požadovat skutečná doba pro nevakcinované kontroly.

Musí být provedeny studie imunologické kompatibility, když se doporučuje současná aplikace buď žadatelem nebo v obvyklém vakcinačním programu.

2.3 Stabilita

Důkaz o stabilitě musí být předložen pro potvrzení doby expirace. Důkaz bude mít formu výsledků:

a) titrací provedených v intervalech až do doby 3 měsíců za požadovanou dobu expirace u nejméně 3 šarží vakcíny připravené ze tří po sobě jdoucích výrobních cyklů, udržovaných za doporučených podmínek skladování. Tyto tři výrobní cykly mohou být provedeny ve vzorovém měřítku s podmínkou, že to napodobuje produkci v plném rozsahu popsanou v žádosti;

a

b) testů popsaných v bodech 3.8, 3.10, 3.11 a 3.12.

Do doby získání důkazu bude podle potřeby zaručena krátká doba expirace.

Kde konečný produkt vyžaduje před aplikací rozpuštění, bude vakcína rozpuštěna zředovačem podle návodu a výsledná směs bude titrována nebo testována na sílu (potenci) bezprostředně po rozpuštění a znovu po skladování.

2.4 Výsledky kontroly kvality šarže

V dokladu musí být uvedeny tři soubory výsledků testu kontroly kvality, uvedeného dále. Výsledky musí být získány z testování tří šarží ze tří po sobě následujících produkčních cyklů, realizovaných podle výrobního postupu pro produkt, popsání v žádosti o registraci.

3. KONEČNÝ PRODUKT – TESTOVÁNÍ ŠARŽE

Testy v této části budou normálně provedeny u každé šarže nebo podšarže vyrobené vakcíny. V případě podšarží, které se liší pouze v důsledku jejich zpracování po hromadném smíchání, např. obdobím plnění nebo velikostí

lékovek, některé testy mohou být provedeny s konečným hromadným objemem nebo s jednou podšarží.

Žadatel musí prokázat, že časově následující postup se neliší výsledky testování a že výsledky získané z testů u hromadného objemu mohou být reprodukovány na podšarži (podšaržích) finálního přípravku. Například, může se očekávat, že testy síly (potence) tekutých inaktivovaných vakcín mohou být provedeny u hromadného objemu. Naproti tomu, testy na sterilitu musí být provedeny u každé podšarže.

3.1 Totožnost

Testy na totožnost se musí provést tam, kde tato informace nemůže být získána z jiných testů, např. séroneutralizace.

3.2 Bezpečnost

Nejméně pomocí doporučeného způsobu aplikace představujícího největší riziko musí být prokázáno u každé šarže vakcíny, že je bezpečná nejméně pro dvě vnímavá zvířata z nejcitlivějšího cílového druhu zvířat, pro který je vakcína doporučena. Musí být aplikována desetinásobná dávka vakcíny. Pro přípravky v tekuté formě může být přijatelná dvojnásobná dávka. Zvířata musí být pozorována po nejméně 14 dnů na nepříznivé vedlejší účinky, které mohou být přičteny na vrub vakcíny.

3.3 Sterilita nebo čistota

Virová vakcína a každý zředovač nebo ředící tekutina musí projít testem na sterilitu a nepřítomost mykoplazem.

Zředovače sterilizované v konečných nádobách nemusí být vyšetřeny na nepřítomnost mykoplazem.

Bakteriální vakcína musí být vyšetřena na čistotu.

Přípravky neaplikované parenterálně mohou obsahovat jeden nepatogenní mikroorganismus na dávku.

3.4 Cizí agens

Každá šarže virových vakcín musí být vyšetřena na nepřítomnost cizích agens. Pomocí minimálního množství séra připraveného v 1.3.5 musí být vzorek ošetřen tak, aby veškerý virus uvedeného druhu a kmene byl neutralizován nebo odstraněn. Konečná směs vakcíny/séra by měla obsahovat nejméně virus v množství 10 dávek vakcíny v mililitru. Tato směs musí být testována na nepřítomnost cizích agens přiměřenými a vhodně citlivými metodami.

Jestliže je nalezeno nějaké cizí agens, které je možné přičíst na vrub finálnímu produktu, potom je taková šarže nevyhovující a musí být vyřazena.

3.5 Titr viru

Testy na obsah viru musí být provedeny s každou z nejméně tří nádob. Pro testy ID₅₀ se použítá zředění musí pohybovat v rozmezí 0–100 % infekce, použijí se vhodná zředění a nejméně šest vyšetření na ředění. Testy musí být provedeny souběžně se standardní vakcínou, kde je to vhodné kalibrovanou na mezinárodní

nebo národní standardní přípravek s výjimkou, že u testu bylo prokázáno, že je přiměřeně kalibrovaný. Musí být stanoven titer vakcíny a nesmí být normálně vyšší než 1/10 dávky, při které se vakcína ukázala být bezpečnou (viz část 2.1) a nesmí být nižší než minimum uvolňovaného titru.

3.6 Bakteriální titer

Životaschopná množství musí být stanovena použitím každé z nejméně tří nádobek. Musí být stanoveno životaschopné množství vakcíny a musí být v rozmezích stanovených pro přípravek a ne méně, než minimum uvolňovaného titru.

3.7 Síla (potence)

Jestliže nejsou k dispozici žádné údaje o vztahu titru vakcíny k účinnosti, prokáže se síla (potence) vakcíny pomocí vhodné metody.

3.8 Obsah vlhkosti

Musí být stanoven obsah vlhkosti lyofilizovaných přípravků a musí být prokázáno, že je v rozmezích stanovených pro přípravek.

3.9 Zředovač

Titrace v přítomnosti zředovače může sloužit k průkazu nepřítomnosti virucidních nebo baktericidních účinků zředovače. V ostatních případech se musí použít jiné metody.

3.10 Fyzikální testy

Vakcína s olejovým adjuvans musí být testována na viskozitu vhodnou metodou. Musí být prokázána stabilita emulze.

3.11 Chemické testy

Musí být provedeny testy na koncentrace vhodných látek, jako je hliník a konzervační prostředky, aby se prokázalo, že tyto jsou v souladu s limity stanovenými pro přípravek.

3.12 pH

Musí být změřeno pH tekutých přípravků a zředovačů a musí být prokázáno, že je v rozmezích stanovených pro přípravek.