ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 52616— 2006

ВАКЦИНА ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЖИВОТНЫХ ИЗ ШТАММА 55-ВНИИВВиМ ЖИВАЯ

Технические условия

Издание официальное

БЗ 9—2006/223

Москва
Стандартинформ
2007

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни, здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25 декабря 2006 г. № 329-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2007

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Технические требования 3
5 Требования безопасности 5
6 Правила приемки 6
7 Методы испытания 7
8 Транспортирование и хранение 16
9 Указания по применению 16
Библиография 17

Введение

Настоящий стандарт разработан в соответствии с Федеральным законом «О техническом регулировании» в целях формирования нормативной базы для соблюдения требований законопроекта — специального технического регламента «О требованиях безопасности лекарственных средств для животных, процессов их разработки, испытания, производства, изготовления, хранения, перевозки, реализации, применения и утилизации», установления правил и характеристик в сферах производства и обращения продукции, обеспечения научно-технического прогресса и конкурентоспособности продукции. Разработка стандарта позволит унифицировать требования к качеству вакцины, методам контроля, безопасности, упаковке, маркировке, транспортированию, хранению, утилизации.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВАКЦИНА ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЖИВОТНЫХ ИЗ ШТАММА 55-ВНИИВВиМ ЖИВАЯ

Технические условия

Live vaccine against anthrax of animals from strain 55-VNIIVV & M. Specifications

Дата введения — 2008—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на вакцину против сибирской язвы животных из штамма 55-ВНИИВВиМ живую (сухую и жидкую), предназначенную для профилактической иммунизации восприимчивых животных (далее — вакцина).

Вакцина представляет собой взвесь живых спор бескапсульной слабовирулентной культуры сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ в 30 %-ном нейтральном растворе глицерина или массу спор, лиофилизированную под вакуумом с защитной средой.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 50460—92 Знак соответствия при обязательной сертификации. Форма, размеры и технические требования

ГОСТ Р 51232—98 Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества

ГОСТ Р 51314—99 Колпачки алюминиевые и комбинированные к флаконам и бутылкам для лекарственных средств, крови и кровезаменителей

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 8.579—2002 Государственная система обеспечения единства измерений. Требования к количеству фасованных товаров в упаковках любого вида при их производстве, расфасовке, продаже и импорте

ГОСТ 12.0.004—90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12.1.008—76 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.2.003—91 Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.3.002—75 Система стандартов безопасности труда. Процессы производственные. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.011—89 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация

ГОСТ 17.0.0.01—76 Система стандартов в области охраны природы и улучшения использования природных ресурсов. Основные положения

ГОСТ 342—77 Натрий дифосфат 10-водный. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 5959—80 Ящики из листовых древесных материалов неразборные для грузов массой до 200 кг. Общие технические условия

ГОСТ 6672—75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 8074—82 Микроскопы инструментальные. Типы, основные параметры и размеры. Технические требования

ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 11285—93 Железы поджелудочные крупного рогатого скота и свиней замороженные. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 12301—81 Коробки из картона, бумаги и комбинированных материалов. Общие технические условия

ГОСТ 12923—82 Алигнин медицинский. Технические условия

ГОСТ 13646—68 Термометры стеклянные ртутные для точных измерений. Технические условия

ГОСТ 14192—96 Маркировка грузов

ГОСТ 16280—2002 Агар пищевой. Технические условия

ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 17768—90 Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

ГОСТ 18481—81 Ареометры и цилиндры стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 20015—88 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 20729—75 Питательные среды. Вода мясная (для ветеринарных целей). Технические условия

ГОСТ 20730—75 Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных целей). Технические условия

ГОСТ 22967—90 Шприцы медицинские инъекционные многократного применения. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 24061—89 Препараты биологические сухие. Метод определения влажности

ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25377—82 Иглы инъекционные многократного применения. Технические условия

ГОСТ 27785—88 Препараты биологические сухие. Метод определения кислорода во флаконах с препаратом

ГОСТ 27840—93 Тара для посылок и бандеролей. Общие технические условия

ГОСТ 28083—89 Препараты биологические. Метод контроля вакуума в ампулах и флаконах

ГОСТ 28085—89 Препараты биологические. Метод бактериологического контроля стерильности

ГОСТ 29112—91 Среды питательные плотные (для ветеринарных целей). Общие технические условия

ГОСТ 29230—91 (ИСО 835-4—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежегодно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **живая вакцина:** Иммунобиологический препарат, получаемый из живых аттенуированных штаммов микроорганизмов, возбудителей болезней животных и человека.

3.2 **вакцинация:** Применение вакцины для предупреждения инфекционной болезни.

3.3 **спора:** Форма существования некоторых видов микроорганизмов в неблагоприятных условиях внешней среды неопределенно длительное время.

3.4 **капсула:** Слизистый слой вокруг бактериальных клеток капсулообразующих микроорганизмов.

3.5 **лиофилизация:** Высушивание из замороженного состояния под вакуумом.

3.6 **вирулентность:** Степень патогенности (болезнетворности) микроорганизмов.

3.7 **штамм вакцинный:** Генетически однородная популяция микроорганизмов с постоянными, наследственно закрепленными свойствами.

3.8 **микробиологическая чистота:** Отсутствие в популяции штамма микроорганизмов других видов (типов, сероваров).

3.9 **диссоциация:** Появление в популяции штамма микроорганизмов измененных клеточных форм.

3.10 **безвредность вакцины:** Отсутствие вредных для организма последствий местного и общего характера после введения вакцины.

3.11 **реактогенность:** Способность живых вакцин вызывать при введении незначительную реакцию местного или общего характера (отечность, болезненность, кратковременное повышение температуры и др.).

3.12 **иммуногенность:** Способность вакцины вызывать у вакцинированных особей формирование состояния невосприимчивости против инфекционной болезни.

3.13 **концентрация водородных ионов (pH):** Реакция среды (кислая, щелочная, нейтральная) pH — отрицательный логарифм концентрации водородных ионов при основании 10.

3.14 **колония микроорганизмов:** Потомство одной микробной клетки на твердой питательной среде.

4 Технические требования

4.1 Вакцина должна соответствовать требованиям настоящего стандарта и изготавливаться в соответствии с технологическим регламентом (инструкцией) по изготовлению, утвержденным в установленном порядке.

4.2 Сухая вакцина представляет собой лиофилизированную с защитной средой под вакуумом массу живых спор бескапсульной слабовирулентной культуры сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ, с содержанием жизнеспособных спор в пределах 0,2—1,2 млрд в одной ампуле (флаконе) и защитной среды.

4.3 Жидкая вакцина представляет собой взвесь живых спор бескапсульной слабовирулентной культуры сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ в 30 %-ном нейтральном растворе глицерина с содержанием спор в пределах 0,02—1,20 млрд в одной ампуле (флаконе).

4.4 Вакцина по физико-химическим, морфологическим, культуральным, биологическим свойствам должна соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Характеристика и норма	
	сухой вакцины	жидкой вакцины
Внешний вид и цвет	Однородная пористая масса беловато-серого цвета	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с незначительным беловатым осадком, образующимся при хранении, легко разбивающимся в гомогенную взвесь
Наличие посторонней примеси, плесени, неразбивающихся хлопьев, трещин флаконов (ампул)	Не допускается в ресуспензированном виде	Не допускается
Концентрация водородных ионов (pH)	—	7,0 ± 0,2
Наличие вакуума в ампулах Наличие кислорода и азота во флаконах	Должен быть вакуум Должен быть азот во флаконах при отсутствии кислорода	—

Окончание таблицы 1

Наименование показателя	Характеристика и норма	
	сухой вакцины	жидкой вакцины
Массовая доля влаги, %, не более	3,0	—
Время ресуспензирования, мин, не более	3,0	—
Массовая доля глицерина, %	—	30,0 ± 3,0
Количество живых спор, млн/см^3, для применения подкожно	22,0 ± 2,0	22,0 ± 2,0
Внутрикожно	110,0 ± 10,0	110,0 ± 10,0
Массовая доля спор, %	95,0 ± 5,0	95,0 ± 5,0
Микробиологическая чистота	В посевах вакцины на питательных средах не должно быть роста посторонней бактериальной и грибной микрофлоры	
Типичность роста культуры штамма 55-ВНИИВВиМ	В посевах на питательные среды должен быть типичный рост культуры штамма 55-ВНИИВВиМ. На кровяном агаре через 24 ч инкубирования признаки гемолиза должны отсутствовать	
Морфологические свойства	В мазках из бульонных и агаровых культур, окрашенных по Граму, должны быть крупные (3—10) мкм грамположительные палочки, расположенные поодиночке или соединенные в цепочки, а также свободно лежащие споры, представляющие собой блестящие овальные, иногда круглые, образования размером (1,2—1,5) × (0,8—1,0) мкм, в отдельных случаях споры, находящиеся в центре вегетативной клетки или вне ее. Инволюционные формы бактерий должны отсутствовать	
Диссоциация, %, не более	5,0	
Подвижность	Должны быть только неподвижные палочки и цепочки	
Капсулообразование	Должны быть только бескапсульные бациллы	
Безвредность	Вакцина должна быть безвредной	
Остаточная вирулентность	Вакцина должна быть слабовирулентной	
Иммуногенность	Вакцина должна быть иммуногенной	

4.5 Упаковка и маркировка

4.5.1 Вакцину расфасовывают в стерильные ампулы или стерильные флаконы. Вакцину, предназначенную для лиофилизации, расфасовывают в ампулы по 1,0—2,0 см^3 (10—50 доз), жидкую в ампулы по 1,0—5,0 см^3 (10—50 доз) и во флаконы по 10—50 см^3 (10—50 доз). Погрешность расфасовки согласно ГОСТ Р 8.579.

4.5.2 Флаконы с вакциной закрывают стерильными резиновыми пробками и обкатывают алюминиевыми колпачками по ГОСТ Р 51314.

4.5.3 На ампулы с вакциной наклеивают этикетку или несмываемой краской (травлением) по стеклу указывают:

наименование организации-производителя;
сокращенное наименование препарата;
объем препарата, см^3;
номер серии;
дату изготовления (месяц, год).

4.5.4 На флаконы с вакциной наклеивают этикетку, на которой указывают:

наименование организации-производителя;
логотип организации-производителя (при наличии);
название вакцины;
номер серии и номер контроля;
объем вакцины, см^3;
дату изготовления (месяц, год);
срок годности (месяц, год);

дозы и способ введения;
условия хранения;
обозначение стандарта;
штрих-код (при наличии);
количество разбавителя для подкожного введения;
надпись: «Для животных».

4.5.5 Ампулы (флаконы) с вакциной в расфасовке до 50 $см^3$ по 10—20 шт. упаковывают в картонные коробки по ГОСТ 12301 с наличием гнезд или перегородок, обеспечивающих их неподвижность. В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению.

4.5.6 На коробку наклеивают этикетку, которая должна содержать:
наименование организации-производителя;
адрес, телефон и логотип (при наличии);
наименование биопрепарата;
количество ампул (флаконов) в коробке;
количество доз в ампуле (флаконе);
количество разбавителя на одну ампулу (флакон) для внутрикожного и подкожного применения;
номер серии;
номер контроля;
дату изготовления (месяц, год);
срок годности (месяц, год);
условия хранения;
дозы для разных видов и возрастов животных;
обозначение настоящего стандарта;
штрих-код (при его наличии);
информацию о подтверждении соответствия по ГОСТ Р 50460;
надпись: «Для животных».

4.5.7 Коробки с вакциной, а также флаконы в расфасовке по 50 $см^3$ с жидкой вакциной упаковывают в ящики из листовых древесных материалов по ГОСТ 5959 или ящики для посылок по ГОСТ 27840 или другие ящики массой брутто не более 15 кг. Для упаковки флаконов в ящики используют алигнин по ГОСТ 12923 или другие теплоизоляционные материалы. Допускается упаковка вакцины в расфасовке по 10 $см^3$ непосредственно в ящики, при этом каждый ряд вакцины перекладывают алигнином.

Внутрь каждого ящика вкладывают не менее пяти экземпляров инструкции по применению вакцины и контрольный лист с указанием: наименования организации-производителя; наименования биопрепарата, его количества в ящике, даты упаковки, номера (фамилии) упаковщика.

4.5.8 На каждое грузовое место (ящик) наносят транспортную маркировку по ГОСТ 14192 с указанием манипуляционных знаков: «Хрупкое. Осторожно», «Ограничение температуры», и предупредительной надписи: «Биопрепараты».

4.5.9 Маркировка, характеризующая упакованную продукцию, должна содержать:
наименование организации-производителя;
адрес организации-производителя;
товарный знак (при его наличии);
наименование вакцины;
количество вакцины в ящике;
дату изготовления (месяц, год);
номер серии;
срок годности (месяц, год);
условия хранения;
обозначение настоящего стандарта.

4.5.10 Совмещение транспортной маркировки и маркировки, характеризующей упакованную продукцию, на одной стороне транспортной тары не допускается.

5 Требования безопасности

5.1 По биологической безопасности вакцина должна соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.008.

5.2 Производственное оборудование, используемое при изготовлении вакцины, должно отвечать требованиям ГОСТ 12.2.003, а производственные процессы — ГОСТ 12.3.002.

5.3 Воздух рабочей зоны должен соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.005.

5.4 Персонал, занятый в производстве вакцины, должен быть обеспечен средствами защиты в соответствии с ГОСТ 12.4.011 и пройти обучение безопасным условиям труда в соответствии с ГОСТ 12.0.004.

5.5 Утилизацию вакцины, не прошедшей контроль, оставшейся после использования, а также с истекшим сроком годности проводят путем автоклавирования в течение 2 ч при температуре 134 °С и давлением 2 атм. с соблюдением требований ГОСТ 17.0.0.01.

6 Правила приемки

6.1 Каждая серия вакцины должна быть принята (проверена) в Отделе биологического технического контроля (ОБТК) организации-производителя.

6.2 Серией следует считать определенное количество вакцины, изготовленной в одних производственных условиях за один технологический цикл из одной расплодки штамма, смешанной с защитной средой в одной емкости, расфасованной в ампулы (флаконы) одинаковой вместимости и лиофильно высушенной в одном сублимационном аппарате (для сухой вакцины), или объединенной в одной емкости с 30 %-ным нейтральным раствором глицерина и расфасованной в один вид флаконов или ампул (для жидкой вакцины), получившей свой номер, номер контроля и оформленной одним документом о качестве (паспортом).

6.3 В документе о качестве (паспорте) указывают:

наименование организации-производителя;

наименование вакцины;

номер серии;

номер контроля;

дату изготовления (месяц, год);

объем серии;

результаты испытания по показателям качества;

срок годности (месяц, год);

условия хранения;

номер и дату выдачи документа о качестве;

обозначение стандарта;

заключение и подпись лица, выдавшего документ о качестве.

6.4 Для контроля качества вакцины от каждой серии отбирают выборку. Из выборки выделяют среднюю пробу в количестве 20 ампул (флаконов) с вакциной, 10 из которых используют для испытания по показателям качества, а 10 хранят в архиве в течение срока годности. Количество отобранных проб должно обеспечить проведение анализов в четырех повторностях.

6.5 Архивные образцы маркируют надписью «Архив», опечатывают и снабжают документом установленной формы с указанием:

наименования вакцины;

номера серии;

даты изготовления (месяц, год);

даты отбора проб;

объема серии;

количества отобранных образцов;

должности и подписи лица, отобравшего пробы;

срока годности (месяц, год);

обозначения настоящего стандарта;

срока хранения проб.

6.6 При получении неудовлетворительных результатов испытаний хотя бы по одному из показателей по нему проводят повторные испытания на удвоенном количестве ампул или флаконов, отобранных от той же серии вакцины. Результаты повторного испытания распространяют на всю серию и считают окончательными.

В случае неудовлетворительных результатов повторной проверки серию вакцины считают не соответствующей требованию настоящего стандарта, ее выбраковывают и уничтожают путем автоклавирования в течение 2 ч при температуре 134 °С.

6.7 Контроль вакцины, поступающей с рекламацией, проводит организация-производитель в присутствии представителя ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

7 Методы испытания

7.1 Определение внешнего вида, цвета, наличия посторонней примеси, плесени, неразбивающихся хлопьев, трещин ампул (флаконов)

7.1.1 Для определения внешнего вида, цвета, наличия посторонней примеси, плесени, неразбивающихся хлопьев, трещин каждый флакон (ампулу) с жидкой вакциной встряхивают и просматривают в проходящем свете, переворачивая вниз пробкой. Одновременно проверяют прочность укупорки и правильность этикетирования.

7.1.2 Во флаконах и ампулах не должно быть посторонней примеси, плесени, неразбивающихся хлопьев и трещин.

7.2 Определение концентрации водородных ионов (pH)

7.2.1 pH в вакцине определяют согласно [1]. pH должно составлять 7,0 ± 0,2.

7.3 Определение наличия вакуума в ампулах с сухой вакциной; кислорода и азота во флаконах

7.3.1 Наличие вакуума в ампулах с сухой вакциной определяют согласно ГОСТ 28083 с помощью аппарата типа «д'Арсонваль» или «Тесла». В ампулах с сухой вакциной должен быть вакуум.

7.3.2 Наличие кислорода и азота во флаконах с сухой вакциной определяют по ГОСТ 27785. Во флаконах при отсутствии кислорода должен быть азот.

7.4 Определение массовой доли влаги в сухой вакцине

7.4.1 Массовую долю влаги в сухой вакцине определяют по ГОСТ 24061. Массовая доля влаги должна быть не более 3 %.

7.5 Определение времени ресуспензирования сухой вакцины

7.5.1 Для проведения испытаний сухой вакцины используют три ампулы с сухой вакциной, в которые после их вскрытия вносят по 1—2 $см^3$ физиологического раствора. Содержимое ампул после встряхивания должно полностью ресуспензироваться в течение 3 мин.

7.6 Определение массовой доли глицерина в жидкой вакцине

Массовую долю глицерина определяют в жидкой вакцине с концентрацией спор 22—24 млн/$см^3$.

7.6.1 Аппаратура, материалы, реактивы

Термостат с температурой нагрева (22 ± 2) °С.

Набор денсиметров по ГОСТ 18481.

Цилиндры стеклянные мерные вместимостью 100 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Термометры стеклянные по ГОСТ 13646.

7.6.2 Проведение испытания

Для проведения испытания используют три флакона с вакциной, которые предварительно выдерживают в термостате при температуре (22 ± 2) °С в течение 30 мин. Один флакон с вакциной извлекают из термостата, вскрывают и его содержимое переливают в стеклянный цилиндр, затем погружают в него денсиметр, рассчитанный на измерение плотности жидкости от 1,0597 до 1,0860 г/$см^3$.

Цилиндр с вакциной и денсиметром помещают в термостат, где выдерживают при температуре (22 ± 2) °С в течение 15—20 мин. Аналогичным образом поступают со вторым и третьим флаконами с вакциной.

7.6.3 Обработка результатов

Массовую долю глицерина в вакцине в процентах определяют по показанию денсиметра в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Плотность раствора глицерина, г/см^3	Массовая доля глицерина, %	Плотность раствора глицерина, г/см^3	Массовая доля глицерина, %
1,0597	25	1,0753	31
1,0622	26	1,0780	32
1,0648	27	1,0806	33
1,0674	28	1,0833	34
1,0700	29	1,0860	35
1,0727	30		

За окончательный результат принимают среднеарифметическое результатов трех параллельных определений. Допустимая массовая доля глицерина в жидкой вакцине (30,0 ± 3,0) % соответствует плотности 1,0648—1,0806 г/см^3.

7.7 Определение количества живых спор

7.7.1 Определение количества живых спор путем посева вакцины на плотные питательные среды

7.7.1.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Автоклав вертикальный или другой марки.

Термостат с температурой нагрева (37 ± 1) °С.

Флаконы стеклянные вместимостью 20 см^3.

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6 вместимостью 0,1; 1,0; 5,0; 10,0 см^3 по ГОСТ 29230.

Весы лабораторные среднего класса точности по ГОСТ 24104.

Стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284.

Микроскоп биологический марки МБИ по ГОСТ 8074.

Стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672.

Чашки Петри по ГОСТ 25336.

Камера Горяева.

Пробки резиновые.

Шпатели стерильные.

Вода дистиллированная для инъекций по [2].

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Раствор физиологический с pH (7,0 ± 0,2) по [3].

Натрий фосфорнокислый пиро по ГОСТ 342.

Агар мясо-пептонный (МПА) по ГОСТ 29112.

Питательный агар сухой «КД».

Среда для культивирования сибиреязвенного микроба — агар СВК.

Твин-80*.

7.7.1.2 Проведение испытания

Для испытания используют следующие агаровые среды; мясо-пептонный агар (МПА), агар СВК, питательный агар КД, которые готовят в соответствии с действующей рецептурой.

Расплавленный и охлажденный до температуры 45 °С—50 °С агар разливают по 15—20 см^3 в стерильные чашки Петри. Для работы используют питательную среду без конденсата, для чего после розлива агара чашки Петри оставляют до момента застывания агара и затем осторожно над пламенем стерильными тампонами удаляют образовавшийся конденсат с крышки чашки. Для проведения испытания берут по три ампулы или по три флакона с сухой вакциной. Содержимое каждой ампулы (флакона) разводят разбавителем — 0,01%-ным водным раствором твина-80 или физиологическим раствором, дистиллированной водой с pH (7,0 ± 0,2) до рабочего разведения в количестве, обозначенном на этикетке коробки с вакциной. Разведенные препараты, а также неразведенные вакцины встряхивают и из каждой ампулы (флакона) готовят по шесть последовательных десятикратных разведений от 10^{-1} до 10^{-6}. Для каждого разведения используют отдельную пипетку. Разведения вакцины выдерживают при комнатной температуре в течение 15—20 мин и после тщательного перемешивания из двух последних раз-

* Фирма «Флюка».

ведений вакцины (10^{-5}, 10^{-6}), начиная с последнего, стерильной микропипеткой делают высевы в чашки Петри с агаром. Каждым разведением вакцины засевают три чашки Петри с агаром, внося в каждую по 0,1 см^3 взвеси спор.

После равномерного распределения стерильным шпателем посевного материала по поверхности агара чашки Петри переносят в термостат, ставят вверх дном и выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч. При распределении посевного материала каждого разведения вакцины пользуются отдельным стерильным шпателем.

7.7.1.3 Обработка результатов

По истечении указанного времени подсчитывают количество выросших колоний в каждом разведении вакцины и находят среднеарифметическое число колоний. Количество живых спор в 1 см^3 вакцины K, млн, вычисляют по формуле

$$K = \frac{K_5 + K_6}{1,1}, \quad (1)$$

где K_5 — среднеарифметическое количество колоний, выросших в чашках из разведения 10^{-5};

K_6 — среднеарифметическое количество колоний, выросших в чашках из разведения 10^{-6};

1,1 — постоянный коэффициент.

Результаты определения концентрации спор в 1, 2, 3-м флаконах или ампулах суммируют, делят на 3 и получают среднеарифметическое значение, которое принимают за окончательный результат количества жизнеспособных спор в 1 см^3 разведенной или неразведенной вакцины.

7.7.2 Определение количества живых спор ускоренным методом

Определение количества живых спор в 1 см^3 вакцины проводят в два этапа: сначала определяют общее количество спор в 1 см^3 вакцины, затем — массовую долю в ней живых спор в процентах. После этого путем расчета определяют действительное число живых спор в 1 см^3 вакцины.

7.7.2.1 Аппаратура, материалы и реактивы по 7.7.1.1.

7.7.2.2 Для подсчета общего количества спор в 1 см^3 вакцину, подготовленную по 7.7.1.2, разводят в соотношении 1:5 физиологическим раствором. Полученной взвесью спор заполняют обычным способом камеру Горяева. Через 10 мин под микроскопом (объектив 40, окуляр 7 или 10) проводят подсчет спор в пяти больших квадратах, расположенных по диагонали, и находят среднеарифметическое количество спор в одном большом квадрате. Общее количество спор в 1 см^3 вакцины N_0, млн, вычисляют по формуле

$$N_0 = N_1 \cdot 1,25, \quad (2)$$

где N_1 — среднеарифметическое количество спор в большом квадрате;

1,25 — постоянный коэффициент.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое результатов трех определений.

7.7.2.3 Определение массовой доли живых спор

Для этого на предметное стекло стерильной пастеровской пипеткой наливают тонкий равномерный слой расплавленного агара (МПА, СВК, КД). После его застывания стерильной пипеткой наносят каплю вакцины, подготовленной по 7.7.1.2, и, наклоняя стекло в разные стороны, равномерно распределяют каплю по поверхности агара. Предметное стекло с высеянной вакциной помещают в чашку Петри, в которую для создания влажности кладут кусочек ваты, смоченной водой, и чашку Петри ставят в термостат с температурой (37 ± 1) °С.

По истечении 2 ч участок засеянной поверхности агара (МПА, СВК, КД) просматривают под иммерсионной системой микроскопа с фазовоконтрастным устройством (объектив 90, окуляр 7 или 10), для чего на него предварительно помещают покровное стекло. В каждом поле зрения отдельно подсчитывают сибиреязвенные палочки и не проросшие сибиреязвенные споры. Общее число подсчитанных клеток (сибиреязвенных палочек и спор) должно быть не менее 500.

Массовую долю живых спор в вакцине C, %, вычисляют по формуле

$$C = \frac{N_2 \cdot 100}{N_3}, \quad (3)$$

где N_2 — число подсчитанных сибиреязвенных палочек;

N_3 — общее число подсчитанных клеток (палочек и спор);

100 — постоянный коэффициент.

7.7.2.4 После определения общего числа спор N_0 в 1 см^3 вакцины и доли в ней живых спор N, %, проводят вычисление числа живых спор N в 1 см^3 вакцины, млн, по формуле

$$N = \frac{N_0 \cdot C}{100}. \quad (4)$$

7.8 Определение массовой доли спор

7.8.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Микроскоп биологический марки МБИ по ГОСТ 8074 или любой марки с увеличением 400× — 900×.

Устройство для наблюдения методом фазового контраста КФ4.

Стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284.

Стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672.

Раствор физиологический с pH (7,0 ± 0,2) [1].

7.8.2 Проведение испытания

Для испытания используют сухую или жидкую вакцину, подготовленную по 7.7.1.2. Из приготовленных вакцин делают разведение 10^{-1} на физиологическом растворе. Из разведения вакцины 10^{-1} на предметных стеклах готовят раздавленную или висячую каплю и просматривают ее под микроскопом при кратности увеличения 400^{x} — 900^{x} в фазовом контрасте. В каждом поле зрения отдельно подсчитывают сибиреязвенные споры и палочки. Общее число подсчитанных клеток (спор и палочек) должно быть не менее 200.

7.8.3 Обработка результатов

Массовую долю спор C_1 в вакцине, %, вычисляют по формуле

$$C_1 = \frac{N_4 \cdot 100}{N_3}, \quad (5)$$

где N_4 — число подсчитанных сибиреязвенных спор;

100 — постоянный коэффициент;

N_3 — общее число подсчитанных клеток (спор и палочек).

Массовая доля спор должна составлять (95,0 ± 5,0) %.

7.9 Определение микробиологической чистоты

7.9.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Микроскоп биологический марки МБИ по ГОСТ 8074.

Флаконы стеклянные вместимостью 100 $см^3$.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336.

Пробки ватно-марлевые.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.

Мясо-пептонный бульон по ГОСТ 20730.

Мясо-пептонный агар по ГОСТ 29112.

Среда Сабуро по ГОСТ 28085.

Среда Китт-Тароцци (МППБ) по ГОСТ 28085.

7.9.2 Проведение испытания

7.9.2.1 Подготовка сред — по ГОСТ 28085.

7.9.2.2 Для испытания используют пять ампул или пять флаконов с вакциной. Содержимое каждой ампулы с сухой вакциной разводят в стерильном физиологическом растворе в объеме, указанном на этикетке коробки с вакциной, используя для каждой ампулы отдельный флакон. Из каждой пробы сухой или жидкой вакцины делают посевы по 0,2—0,3 $см^3$ в МПБ, МППБ под вазелиновым маслом, на МПА, агар Сабуро в две пробирки с каждой средой и по 0,5—1,0 $см^3$ в два флакона с МПБ и МППБ под вазелиновым маслом. Через трое суток инкубирования посевов из флаконов с МППБ под вазелиновым маслом проводят пересев на аналогичную питательную среду во флаконах. Посевы инкубируют в течение 10 сут, а пересевы 7 сут при температуре (37 ± 1) °С, для агара Сабуро — при температуре (22 ± 2) °С.

В течение указанного времени посевы ежедневно просматривают на чистоту роста сибиреязвенной культуры. При затруднении дифференциации сибиреязвенной культуры от посторонней бактериальной и грибной микрофлоры из микробных культур готовят мазки на обезжиренных предметных стеклах. Мазки подсушивают на воздухе до полного высыхания, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают по Граму. Краску смывают дистиллированной водой, предметные стекла с мазками высушивают фильтровальной бумагой и просматривают под иммерсионной системой микроскопа.

7.9.3 Обработка результатов

Во всех питательных средах не должно быть роста посторонней бактериальной и грибной микрофлоры. В МПБ и на МПА должен быть типичный рост культуры штамма 55-ВНИИВВиМ. В мазках, приго-

товленных из микробных культур и окрашенных по Граму, должна быть сибиреязвенная культура штамма 55-ВНИИВВиМ.

7.10 Определение типичности роста культуры штамма 55-ВНИИВВиМ

7.10.1 Аппаратура, материалы, реактивы по 7.7.1.1. и 7.9.1 и агар кровяной по нормативному документу.

7.10.2 Проведение испытания

Питательные среды (МПБ и МПА) и испытуемую вакцину готовят по 7.9.2. Определение типичности роста проводят путем посева исследуемой серии вакцины по 0,2—0,3 $см^3$ в две пробирки с МПБ, две пробирки с МПА и по 0,3—1,0 $см^3$ в два флакона вместимостью 50,0 $см^3$ или 100,0 $см^3$ с МПБ, а также бактериологической петлей штрихами (для получения отдельных колоний) на три чашки Петри с МПА и три чашки с кровяным агаром. Через 5 сут инкубирования посевов из флаконов с МПБ проводят пересев на аналогичную среду во флаконах. Посевы выдерживают в течение 10 сут и ежедневно просматривают визуально на типичность роста сибиреязвенной культуры штамма 55-ВНИИВВиМ, пересевы — 5 сут, а посевы на кровяной агар и МПА на чашках Петри — 1 сут при температуре (37 ± 1) °С.

7.10.3 Обработка результатов

В посевах вакцины в МПБ должен быть характерный рост сибиреязвенной культуры штамма 55-ВНИИВВиМ с образованием на дне пробирки или флакона рыхлого осадка, а на поверхности среды — пристеночного кольца. Бульон должен быть прозрачным или с небольшой опалесценцией. При встряхивании пробирки или флакона с посевами осадок разбивается в гомогенную взвесь. Недопустим рост с образованием пленки, помутнением среды. На поверхности МПА должен быть рост культуры штамма 55-ВНИИВВиМ в виде серовато-беловатых, круглых, шероховатых, с серебристым оттенком колоний R-формы, диаметром 3—4 мм.

На кровяном агаре через 24 ч инкубирования должны формироваться серовато-беловатые, круглые и шероховатые колонии диаметром 2—4 мм без признаков гемолиза. В последующие дни гемолиз возможен.

7.11 Определение морфологических свойств штамма 55-ВНИИВВиМ

7.11.1 Аппаратура, материалы и реактивы по 7.7.1.1.

7.11.2 Проведение испытания

Из 24—46 ч микробных культур, выращенных в МПБ и на МПА по 7.10.2, готовят мазки и окрашивают их по Граму, которые просматривают под иммерсионной системой микроскопа.

7.11.3 Обработка результатов

В мазках, окрашенных по Граму, должна быть типичная и чистая культура штамма 55-ВНИИВВиМ в виде однородных стройных палочек и коротких цепочек темно-синего (фиолетового) цвета, а споры должны быть овальной формы, блестящие (неокрашенные), находящиеся в центре вегетативной клетки или вне ее. Инволюционные формы (извитые, округлые и т.д.) должны отсутствовать.

7.12 Определение однородности культуры штамма 55-ВНИИВВиМ

7.12.1 Аппаратура, материалы и реактивы по 7.7.1.1. и 7.9.1 со следующим дополнением:

Сердце крупного рогатого скота [3].

Поджелудочная железа крупного рогатого скота по ГОСТ 11285.

Хлороформ по ГОСТ 20015.

Вода мясная по ГОСТ 20729.

Агар пищевой по ГОСТ 16280 или агар микробиологический по ГОСТ 17206.

Вода водопроводная по ГОСТ Р 51232.

7.12.2 Проведение испытания

При испытании используют 1,3 % агара на триптическом переваре сердца, для приготовления которого берут 6,6 кг свежих бычьих сердец, очищенных от жира, режут на кусочки и варят 10—15 мин в 10 $дм^3$ водопроводной воды при постоянном перемешивании. Мясо пропускают через мясорубку. Отвар охлаждают до температуры (50 ± 5) °С, добавляя холодную воду до первоначального объема. Отвар подщелачивают 20 %-ным раствором NaOH до pH 7,8—8,0. Отвар и мясной фарш помещают в бутыль, куда добавляют 1,32 кг поджелудочной железы, 100 $см^3$ хлороформа и выдерживают в термостате при температуре (48 ± 1) °С в течение 7 сут. Первые трое суток перемешивают через каждые 30 мин, периодически проверяя, чтобы pH составлял 7,8—8,0. Затем перемешивают один раз в сутки и за двое суток до окончания гидролиза перемешивание прекращают. Фильтруют через полотняный фильтр, стерилизуют при температуре (110 ± 5) °С в течение 30 мин.

Для приготовления 1,3 %-ного агара берут триптического перевара сердца — 2,4 $дм^3$, мясной воды — 2,4 $дм^3$, водопроводной воды — 7,2 $дм^3$, 0,5 %-ного раствора NaCl — 60 $см^3$, 20 %-ного раствора NaOH — 7,0 $см^3$ и агара (в % к общему объему) — 1,3 %.

Среду стерилизуют в автоклаве 30 мин при температуре (110 ± 5) °С. Содержание аминного азота в среде должно составлять от 160 до180 мг/%, pH среды до стерилизации 7,7—7,8, после стерилизации 7,4—7,6.

Для проведения испытания используют вакцину из штамма 55-ВНИИВВиМ в разведении (10^{-5}) по 7.7.1.2. Из полученного разведения вакцины делают посевы по (0,10 ± 0,01) $см^3$ на три чашки Петри с 1,3 %-ным агаром, приготовленным на триптическом переваре сердца. Посевы инкубируют в течение 20—24 ч при температуре (37 ± 1) °С.

7.12.3 Обработка результатов

Колонии, выросшие на поверхности 1,3 %-ного агара, приготовленного на триптическом переваре сердца в чашках Петри, должны быть однородными (круглые, приподнятые над поверхностью агара, выпуклые, шероховатые, желтовато-белого цвета, диаметром 3—4 мм). Наличие диссоциативных форм колоний, отличающихся по форме, цвету, консистенции и размеру, не должно превышать 5 %.

7.13 Определение подвижности культуры штамма 55-ВНИИВВиМ

7.13.1 Аппаратура, материалы и реактивы по 7.7.1.1.

7.13.2 Проведение испытания

МПБ и испытуемую вакцину из штамма 55-ВНИИВВиМ готовят по 7.9.2. Из 18—24 ч микробной культуры, выращенной в МПБ, как указано в 7.10.2, на предметных стеклах готовят по общепринятым методикам «раздавленную или висячую капли» и просматривают с помощью микроскопа с фазоконтрастным устройством при увеличении $400^{\times}$ — $600^{\times}$.

7.13.3 Обработка результатов

В «раздавленной или висячей каплях» под микроскопом должны быть только неподвижные палочки и цепочки, состоящие из палочек.

7.14 Определение капсулообразования

7.14.1 Аппаратура, материалы и животные

Холодильник любой марки температурой (4 ± 2) °С.

Термостат температурой (37 ± 1) °С.

Центрифуга с ускорением (5—10) × 10^3 об/мин (q = 9,8 $м/с^2$).

Флаконы стеклянные вместимостью от 20 до 100 $см^3$.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336.

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6 вместимостью 1,0, 5,0 и 10,0 $см^3$ по ГОСТ 29230.

Стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284.

Пробки резиновые.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Шприц вместимостью 5 $см^3$ по ГОСТ 22967.

Иглы инъекционные № 0625 по ГОСТ 25377.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Вода водопроводная по ГОСТ Р 51232.

Раствор физиологический с pH (7,0 ± 0,2) [1].

Сыворотка крови крупного рогатого скота по нормативному документу.

Водяная баня.

Гидрокарбонатная магниево-кальциево-натриевая природная минеральная вода по нормативному документу.

Эфир для наркоза по нормативному документу.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.

Мыши белые массой 18—20 г.

Синька Леффлера или краска Романовского-Гимза.

7.14.2 Проведение испытания

Для проведения испытаний на капсулообразование используют среду «Казань», состоящую из 60 %-ной природной минеральной (гидрокарбонатной магниево-кальциево-натриевой) стерильной воды и 40 %-ной стерильной неконсервированной сыворотки крови крупного рогатого скота, инактивированной при температуре 56 °С. Приготовленную среду разливают в стерильные пробирки, которые закрывают стерильными резиновыми пробками. При этом следует обратить внимание на то, чтобы уро-

вень среды был ниже на 1 см нижнего кольца резиновых пробок. В таком виде среда может храниться при температуре (4 ± 2) °С длительное время, не утрачивая своих свойств.

Для испытания используют четыре ампулы с сухой или четыре флакона или ампулы с жидкой вакциной. Содержимое каждой ампулы с сухой вакциной разводят стерильным физиологическим раствором в половине объема, указанного на этикетке коробки с ампулами, используя для каждой ампулы отдельный флакон. С целью повышения концентрации жидкой вакцины и уменьшения содержания в ней глицерина флаконы с вакциной отстаивают при температуре (4 ± 2) °С в течение 5—7 сут. После отстоя из каждого флакона удаляют три четверти надосадочной жидкости, а осадок разводят в соотношении 1:2 стерильным физиологическим раствором. Вместо отстаивания можно использовать центрифугирование при (5—10) · 10^3 об/мин в течение 20—30 мин, надосадочную жидкость удаляют, а осадок разводят стерильным физиологическим раствором до половины первоначального объема.

После разведения сухой или концентрированной жидкой вакцины готовят две средние пробы. Для этого по 5,0 $см^3$ содержимого каждого из двух флаконов переносят в стерильный флакон, тщательно перемешивают и закрывают флакон резиновой или ватно-марлевой пробкой.

Шприцы и инъекционные иглы стерилизуют путем кипячения в дистиллированной воде в течение 50—60 мин. Ватные тампоны заворачивают в пергаментную бумагу, помещают в бикс и стерилизуют в автоклаве при температуре (120 ± 1) °С в течение 1 ч.

Из каждой приготовленной пробы делают посевы по 1,0 $см^3$ в две пробирки со средой «Казань» или заражают пять белых мышей, взятых из группы заведомо здоровых животных, внутрибрюшинно в дозе 1 $см^3$ (40—48 млн живых спор).

По истечении 10—18 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С из микробных культур, выросших в среде «Казань», готовят мазки на обезжиренных предметных стеклах. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют в смеси Никифорова (одна часть этанола и одна часть эфира) в течение 15 мин, после чего высушивают на воздухе и окрашивают синькой Леффлера в течение 15—20 мин. Краску смывают водопроводной водой, предметные стекла с мазками высушивают и просматривают под иммерсионной системой микроскопа.

Все или большинство зараженных белых мышей должны погибнуть в течение пяти суток. Выживших мышей по истечении указанного срока подвергают эвтаназии. Из брюшного экссудата, сердца, печени и селезенки павших белых мышей делают мазки-отпечатки на обезжиренных предметных стеклах, фиксируют, окрашивают, как мазки со средой «Казань», и просматривают под иммерсионной системой микроскопа. В качестве контроля используют 2-ю вакцину Ценковского.

7.14.3 Обработка результатов

В мазках микробной культуры штамма 55-ВНИИВВиМ, выросшей в среде «Казань», или в мазках-отпечатках из брюшного экссудата и органов павших мышей должны быть только бескапсульные сибиреязвенные микробы. В контрольных пробах — капсульные формы микроба.

7.15 Определение безвредности

7.15.1 Материалы, реактивы и животные

Флаконы стеклянные вместимостью 50 $см^3$.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336.

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6 вместимостью от 1,0 до 10,0 $см^3$ по ГОСТ 29230.

Пробки резиновые или ватно-марлевые.

Тампоны ватные.

Шприцы вместимостью 5 $см^3$ по ГОСТ 22967.

Иглы инъекционные № 0416—0426 по ГОСТ 25377.

Вода дистиллированная по ГОСТ Р 51232.

Раствор физиологический с pH (7,0 ± 0,2) [1].

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.

Кролики массой 2,5—3,0 кг.

7.15.2 Подготовка к испытанию

Для проведения испытания используют смесь равных объемов вакцины из трех ампул или трех флаконов, которую готовят по 7.7.1.2.

7.15.3 Проведение испытания

Трем клинически здоровым кроликам массой 2,5—3,0 кг вакцину вводят подкожно из расчета 200 млн спор в область наружной поверхности бедра в равных объемах в обе конечности.

7.15.4 Обработка результатов

Вакцину считают безвредной, если все кролики в течение 10 сут после ее введения остаются живыми. Допускается образование отеков на месте введения вакцины, повышение температуры тела у отдельных животных.

7.16 Определение иммуногенной активности

7.16.1 Материалы, реактивы, животные

Флаконы стеклянные вместимостью 50 $см^3$.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336.

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6 вместимостью 1,0, 5,0, 10,0 $см^3$ по ГОСТ 29230.

Пробки резиновые или ватно-марлевые.

Тампоны ватные.

Иглы инъекционные № 0416—0426 по ГОСТ 25377.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Раствор физиологический с pH (7,0 ± 0,2) [1].

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.

Культура сибиреязвенная вирулентная для морских свинок — штамм 2-й вакцины Ценковского (М-71 — стандартная заражающая сибиреязвенная культура или 71/12).

Морские свинки массой 350—400 г.

7.16.2 Подготовка к испытанию

Для испытания используют смесь равных объемов вакцины из трех ампул или трех флаконов, приготовленную по 7.7.1.2. Для этого 12 клинически здоровых морских свинок массой 350—400 г иммунизируют вакциной подкожно в область живота в дозе по 10,0—12,0 млн спор в объеме 0,5 $см^3$ и 10 свинок той же массы оставляют для контроля.

7.16.3 Проведение испытания

Через 12—14 сут после вакцинации 10 животных из числа вакцинированных и 10 контрольных (невакцинированных) морских свинок подвергают заражению сибиреязвенной стандартной культурой (штамм 2-й вакцины Ценковского М-71 или 71/12) в дозе по (1,0 ± 0,1) млн жизнеспособных спор. Культуру вводят подкожно в области живота в объеме по (0,50 ± 0,05) $см^3$ каждому животному.

Срок наблюдения за животными — 10 сут после заражения.

7.16.4 Обработка результатов

Не менее восьми из десяти неиммунизированных морских свинок должны погибнуть, а вакцинированные — не менее восьми из десяти должны остаться живыми в течение 10 сут после заражения.

В случае падежа большого числа вакцинированных морских свинок иммуногенные свойства вакцины проверяют, как указано в 7.16, на удвоенном количестве животных.

В случае получения неудовлетворительных результатов в повторной проверке иммуногенные свойства вакцины проверяют количественным методом в сравнении с референс-препаратом вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ, как указано в 7.16.5.

7.16.5 Определение иммуногенной активности вакцины количественным методом

Метод основан на определении 50 %-ной иммунизирующей дозы ($ИмД_{50}$) вакцины в сравнении с $ИмД_{50}$ референс-препарата вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ.

7.16.5.1 Подготовка к испытанию

Из сухой или жидкой вакцины, подготовленной по 7.7.1.1 и референс-препарата вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ, делают разведения на стерильном физиологическом растворе с содержанием 10 млн, 2 млн, 400 тыс. и 80 тыс. живых спор в 1 $см^3$. Приготовленными суспензиями спор каждого из двух указанных препаратов иммунизируют 30 клинически здоровых морских свинок массой 350—400 г подкожно в область живота в объеме по 0,5 $см^3$. Споровую культуру каждого разведения вводят семи или восьми животным — на две первые дозы берут по восемь, на две последние меньшие дозы — по семь животных, с тем, чтобы ко времени заражения в живых осталось не менее шести морских свинок.

7.16.5.2 Проведение испытания

Через 12—14 сут по шесть морских свинок, иммунизированных вакциной из штамма 55-ВНИИВВиМ и референс-препаратом вакцины из штамма 55 ВНИИВВиМ, вакцинированных каждой дозой споровых культур и шесть невакцинированных клинически здоровых морских свинок, заражают вирулентной сибиреязвенной культурой, как указано в 7.16.3.

7.16.5.3 Обработка результатов

Все неиммунизированные морские свинки должны погибнуть в течение 10 сут. Допускается выживание одной невакцинированной морской свинки.

Из иммунизированных животных в указанный срок, в зависимости от введения доз испытуемой вакцины и референс-препарата вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ, некоторое количество остается живыми.

$ИмД_{50}$ вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ и референс-препарата этой же вакцины вычисляют по формуле

$$Lg\ ИмД_{50} = 6{,}699 — 0{,}699(\Sigma Li — 0{,}5), \quad (6)$$

где 6,699 — логарифм максимальной иммунизирующей дозы (5 млн спор);

0,699 — логарифм шага разведения препарата, равного 5;

Li — отношение числа выживших животных, после заражения, к общему числу морских свинок, которым были введены дозы испытуемого препарата;

i — индекс, соответствующий номеру дозы;

ΣLi — сумма значений Li, найденных для всех испытанных доз;

0,5 — постоянный коэффициент.

В зависимости от числа выживших морских свинок могут быть получены следующие значения ΣLi и соответствующие им значения $ИмД_{50}$, указанные в таблице 3. Значение $ИмД_{50}$ вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ не должно превышать значение $ИмД_{50}$ референс-препарата вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ.

Таблица 3

$N\Sigma Li$ при $i = I$	$Lg\ ИмД_{50}$	$ИмД_{50}$ в млн спор	$N\Sigma Li$ при $i = I$	$LgИмД_{50}$	$ИмД_{50}$ в млн спор
1,0	6,3495	2,24	2,23	5,4175	0,26
1,16	6,2330	1,71	2,50	5,3010	0,20
1,33	6,1164	1,31	2,66	5,1845	0,15
1,50	6,0000	1,0	2,83	5,0680	0,12
1,66	5,8835	0,76	3,00	4,9515	0,09
1,83	5,7670	0,58	3,16	4,8350	0,07
2,0	5,6504	0,45	3,33	4,7185	0,05
2,16	5,5340	0,34	3,50	4,6020	0,04

7.17 Определение остаточной вирулентности

7.17.1 Материалы, реактивы, животные

Шприц вместимостью 5 $см^3$ по ГОСТ 22967.

Пипетки мерные по ГОСТ 29230.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336.

Раствор физиологический стерильный pH (7,0 ± 0,2) по [1].

Морские свинки массой 350—400 г.

Белые мыши массой 18—20 г.

7.17.2 Подготовка к испытанию

Для испытания используют смесь вакцины из трех ампул или трех флаконов, приготовленную по 7.7.1.2.

7.17.3 Проведение испытания

Двенадцать клинически здоровых морских свинок массой 350—400 г, иммунизируют вакциной подкожно в область мышц живота в дозе 10,0—12,0 спор в объеме 0,5 $см^3$, одновременно десяти белым мышам массой 18—20 г внутрибрюшинно вводят по 10,0—12,0 млн спор в объеме 0,5 $см^3$.

Вакцина из штамма 55-ВНИИВВиМ у морских свинок вызывает в месте инъекции образование отека и возможна гибель одного-двух животных в течение 10 сут. У белых мышей вакцина вызывает гибель одного—пяти животных в течение 1—5 сут.

8 Транспортирование и хранение

8.1 Вакцину транспортируют в соответствии с ГОСТ 17768.

Транспортирование вакцины при температуре свыше 20 °С более пяти суток не допускается.

8.2 Вакцину хранят в сухом темном помещении при температуре от 2° С до 15 °С в течение срока годности.

8.3 Срок годности вакцины — два года с даты изготовления. Датой изготовления сухой вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ считают дату окончания ее лиофилизации, а жидкой вакцины — дату соединения споровой культуры штамма 55-ВНИИВВиМ с 30 %-ным нейтральным раствором глицерина.

9 Указания по применению

9.1 Вакцину применяют в ветеринарной практике для профилактической иммунизации восприимчивых животных против сибирской язвы в соответствии с инструкцией по ее применению, утвержденной в установленном порядке.

9.2 Количество живых спор в вакцине для подкожного применения должно быть (22 ± 2) млн/см^3, для внутрикожного применения — (110 ± 10) млн/см^3.

9.3 Вакцина, подвергшаяся замораживанию, для применения не пригодна.

Библиография

[1] Государственная фармакопея X. Определение pH. Раствор натрия хлорида 0,9 %-ный изотонический. Эфир для наркоза

[2] Фармакологическая статья 42-26-20—89 Вода дистиллированная для инъекций

[3] СанПиН 2.3.2.1078—2001 (приложение 1, 1.1.2 и 1.1.2.1) Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов

УДК 619:616.98:006.354 ОКС 11.220 Р31 ОКП 93 8470

Ключевые слова: вакцина, сибирская язва, живая спора, микробиологическая чистота, типичность роста, морфологические свойства, диссоциация, подвижность, капсулообразование, безвредность, остаточная вирулентность, иммуногенность

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 17.01.2007. Подписано в печать 15.02.2007. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,00. Тираж 134 экз. Зак. 125. С 3695.

ФГУП «Стандартинформ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «Стандартинформ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «Стандартинформ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

Изменение № 1 ГОСТ Р 52616—2006 Вакцина против сибирской язвы животных из штамма 55-ВНИИВВиМ живая. Технические условия

Утверждено и введено в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27.06.2013 № 208-ст

Дата введения — 2014—01—01

Раздел 2. Для ГОСТ Р 51314—99 наименование изложить в новой редакции:

«Колпачки алюминиевые и комбинированные для укупорки лекарственных средств. Общие технические условия»;

заменить ссылку: ГОСТ 12301—81 на ГОСТ 12301—2006;

ссылки на ГОСТ 24104—2001 и ГОСТ 5959—80 и наименования исключить;

дополнить ссылками:

«ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания» и ГОСТ 9142—90 «Ящики из гофрированного картона. Общие технические условия»;

ссылки на ГОСТ 24061—89, ГОСТ 27785—88, ГОСТ 28083—89, ГОСТ 28085—89 и их наименования заменить новыми:

«ГОСТ 24061—2012 Средства лекарственные биологические лиофилизированные для ветеринарного применения. Метод определения массовой доли влаги

ГОСТ 27785—2012 Средства лекарственные биологические лиофилизированные для ветеринарного применения. Метод определения кислорода во флаконах

ГОСТ 28083—2012 Средства лекарственные биологические лиофилизированные для ветеринарного применения. Метод контроля вакуума в ампулах и флаконах

ГОСТ 28085—2013 Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности».

Пункт 4.5.1. Заменить ссылку: ГОСТ Р 8.579 на ГОСТ 8.579.

Пункты 4.5.3, 4.5.4, 4.5.6 изложить в новой редакции:

«4.5.3 На ампулы (флаконы) с вакциной в расфасовке до 20 $см^3$ наклеивают этикетку или несмываемой краской по стеклу указывают:

- сокращенное наименование вакцины;
- номер серии и дату выпуска (месяц, год)*;
- срок годности (месяц, год);
- объем вакцины ($см^3$);
- надпись: «Для ветеринарного применения».

4.5.4 На флаконы с вакциной в расфасовке по 50 $см^3$ наклеивают этикетку, на которой указывают:

- наименование вакцины;
- наименование и адрес организации-производителя;
- номер регистрационного удостоверения;
- дату выпуска (месяц, год);
- срок годности;
- дозы и способ введения вакцины;
- объем вакцины во флаконе ($см^3$);
- количество доз во флаконе;
- лекарственную форму вакцины;
- номер серии;
- условия хранения;
- условия отпуска;
- информацию о подтверждении соответствия;
- надпись: «Для ветеринарного применения»;
- обозначение настоящего стандарта;
- штриховой код.

---

* Номер серии и дату выпуска (месяц, год) обозначают слитно. При этом последние четыре цифры в номере обозначают месяц и год выпуска вакцины. Цифры, предшествующие последним четырем, являются производственным номером серии.

4.5.6 На коробку наклеивают этикетку, которая должна содержать:

- наименование вакцины;
- наименование и адрес организации-производителя;
- номер серии;
- дату выпуска (месяц, год);
- номер регистрационного удостоверения;
- срок годности;
- способ применения;
- объем вакцины в ампуле (флаконе), $см^3$;
- количество разбавителя на одну ампулу (флакон) для внутрикожного и подкожного введения;
- дозы для разных видов животных;
- количество доз в коробке;
- лекарственную форму вакцины;
- информацию о подтверждении соответствия;
- условия отпуска;
- условия хранения;
- надпись: «Для ветеринарного применения»;
- обозначение настоящего стандарта;
- штриховой код».

Пункт 4.5.7. Заменить ссылку: ГОСТ 5959 на ГОСТ 9142.

Пункт 4.5.8. Манипуляционный знак «Ограничение температуры» заменить на «Пределы температуры».

Пункт 4.5.9 изложить в новой редакции:

«4.5.9. На этикетке транспортной тары или непосредственно на поверхности транспортной тары указывают:

- наименование вакцины;
- наименование и адрес организации-производителя;
- номер серии;
- дату выпуска (месяц, год);
- количество коробок с вакциной (флаконов) в ящике;
- срок годности;
- условия хранения и транспортирования».

Подпункт 7.7.1.1. Заменить ссылку: ГОСТ 24104 на ГОСТ Р 53228.

Подпункт 7.7.2.4. Заменить слова: «доли в ней живых спор *N*» на «доли в ней живых спор *C*».

Пункт 7.15.1. Заменить ссылку: ГОСТ Р 51232 на ГОСТ 6709.

Подпункт 7.16.5.3. Таблица 3. Графа «$N \Sigma Li$ при i = /». Заменить значение: 2,23 на 2,33.

Раздел 8 изложить в новой редакции:

«8 Транспортирование и хранение

8.1 Вакцину транспортируют всеми видами транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта, при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается транспортирование вакцины при температуре не выше 20 °С в течение 14 сут.

8.2 Вакцину хранят в сухом темном месте при температуре от 2 °С до 8 °С.

8.3 Срок годности вакцины — два года с даты выпуска. Датой выпуска считают дату подписания документа о качестве, на основании которого серия вакцины разрешается к реализации».

Пункт 9.1 изложить в новой редакции:

«9.1 Вакцину применяют для профилактики сибирской язвы у сельскохозяйственных животных (крупный и мелкий рогатый скот, лошади, ослы, верблюды, олени, свиньи, пушные звери) во всех категориях хозяйств в соответствии с инструкцией по применению».

(ИУС № 3 2015 г.)

gost.e-ecolog.ru