**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**Вакцина Ку-лихорадки М-44 живая ФС**

**(Вакцина Ку-лихорадки М-44) Вводится впервые \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину Ку-лихорадки М-44 живую (лиофилизат для приготовления суспензии для накожного скарификационного нанесения), которая представляет собой взвесь живой культуры аттенуированного вакцинного штамма М-44 коксиелл Бернета (*Coxiella burnetii)*, выращенную в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов, лиофилизированную в стерильной сахарозо-молочной смеси (среда высушивания для коксиелл Бернета).

Вакцина предназначена для специфической профилактики Ку-лихорадки.

**ПРОИЗВОДСТВО**

Технологический процесс производства должен обеспечивать стабильное получение серий вакцины, соответствующих требованиям по иммуногенности, безопасности и стабильности.

Производство вакцины Ку-лихорадки М-44 должно осуществляться с соблюдением надлежащих требований к организации производства и контролю качества лекарственных препаратов, гарантирующих качество и безопасность для человека,

Производство вакцины Ку-лихорадки М-44 живой должно быть основано на использовании системы посевного материала (системы посевных серий), предусматривающей соблюдение условий пассирования культуры коксиелл вакцинного штамма М-44 в развивающихся куриных эмбрионах и регламентирующей ограничение количества пассажей в процессе приготовления вакцины и получения вакцинной биомассы.

Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами.

Производство вакцины должно обеспечивать стабильность показателей качества готового продукта до конца установленного срока годности, указанного в нормативной документации.

Куриные эмбрионы должны поступать из племенных птицеводческих хозяйств, благополучных по особо опасным и карантинным заболеваниям птиц, не должны содержать антитела к вирусным инфекциям и антибиотики. Качество куриных эмбрионов должно быть документально подтверждено государственной ветеринарной службой.

Для подтверждения отсутствия реверсии патогенности аттенуированного вакцинного штамма М-44 коксиелл Бернета в процессе производства на стадии нефасованного препарата должен проводиться внутрипроизводственный контроль антигенной активности вакцины.

В состав одной прививочной дозы вакцины (0,05 мл) входит**:**

-действующие вещества: лиофилизированная взвесь живой культуры вакцинного штамма М-44 коксиелл Бернета от 5 ∙10 7 до 5 ∙109 минимальных инфицирующих доз для куриных эмбрионов (МИДэ);

-вспомогательные вещества: сахароза 1 %, молоко питьевое пастеризованное 49 %.

**Производственный вакцинный штамм М-44 и тест-штамм для контроля**

В качестве производственного штамма для изготовления вакцины используется аттенуированный вакцинный штамм М-44 коксиелл Бернета, культивируемый пассажами в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов.

В качестве тест-штамма для контроля иммуногенности используется вирулентный штамм Грита коксиелл Бернета в фазе II высоко адаптированный к условиям пассирования в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов.

Штаммы депонированы и хранятся в музее Центра Минздрава России по риккетсиозам.

Производственный штамм должен иметь сертификат качества. В материалах на вновь подготовленную серию лиофилизированной главной посевной культуры вакцинного штамма должны быть представлены данные по истории выделения штамма, методу аттенуации, по основным показателям биологических свойств (морфологические и тинкториальные свойства, культуральные свойства, вирулентность, токсигенность, антигенная активность), условиям хранения*.*

Лиофилизированную «главную посевную культуру» вакцинного штамма Coxiella burnetii «М-44» по мере использования, но не реже 1 раза в 5 лет, получают сублимацией с последующей запайкой ампул в вакууме и хранят в ампулах при температуре не выше минус 40-500С в соответствии с установленными правилами порядка учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмом I-IV групп патогенности.

**Требования к производственному вакцинному штамму М-44**

Каждую новую серию «главной посевной культуры» вакцинного штамма М-44 испытывают на соответствие общих требований к риккетсиозным штаммам, предназначенным для производства диагностических и профилактических препаратов и методов их контроля. В процессе производственного цикла главную посевную культуру используют для получения пассажной (рабочей посевной культуры) с целью накопления вакцинной биомассы коксиелл.

Для вакцинного штамма М-44 допустимо проведение культуры не более 5 пассажей в желточных мешках куриных эмбрионов.

Работы с культурой коксиелл Бернета вакцинного штамма М-44 проводят неукоснительно соблюдая требования по безопасности работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней.

Производственный вакцинный штамм М-44 коксиелл Бернета должен отвечать следующим требованиям:

* не должен быть контаминированы посторонней микрофлорой;
* обладать морфологическими и тинкториальными свойствами: морфологическая форма - коксиеллы должны быть представлены преимущественно мелкими кокковидными формами «a» при наличии незначительного количества палочковидных форм «b» и нитевидных форм «d», окрашивающихся по Романовскому-Гимза в фиолетовый цвет;
* вирулентным свойствам: основным показателем аттенуации вакцинного штамма М-44 коксиелл Бернета является, в отличие от вирулентного штамма Грита, резко сниженная патогенность для морских свинок, отсутствие способности штамма М-44 вызывать развитие лихорадки у морских свинок. При подкожном заражении морских свинок культурой штамма М-44 в разведениях от 10-6 до 10-9 должны отсутствовать лихорадочная (повышение ректальной температуры выше 39,5оС) и местная реакции (воспаление подкожной клетчатки и прилегающих мышц); у свинок, зараженных культурой штамма М-44 в разведениях 10-4 и 10-5 ,начиная с 7 сут после заражения, допускается повышение температуры (не более 2 сут) и наличие инфильтрата на месте введения не более 10 мм у 1-2 животных в каждой группе;
* культуральным свойствам: вакцинный штамм М-44 культивируют в развивающихся куриных эмбрионах. Наибольшее накопление возбудителя в оболочке желточного мешка при заражении 6-7-дневного куриного эмбриона получают при инфицировании их материалом, содержащим риккетсии в больших концентрациях (+++), в разведении 10-4 - 10-5 в объеме 0,4 мл. В желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов культура штамма М-44 в разведении 10-3 на 7-10 сут после заражения должна вызывать массовое накопление коксиелл, которое приводит к гибели не менее 50 % эмбрионов. Минимальная инфицирующая доза для куриных эмбрионов (МИДэ) должна соответствовать разведению вакцинного штамма не менее 10-9.\*

*\*МИДэ (инфекционный титр культуры) - наибольшее разведение 1г* *культуры штамма, которое вызывает микроскопически подтверждаемое накопление коксиелл на + хотя бы у одного из зараженных куриных эмбрионов (КЭ).*

*Оценку количества коксиелл проводят по условной 3-х крестной системе (микроскопирование мазков из желточных мешков КЭ, окрашенных по методу Романовскому–Гимзы; иммерсионные объективы 90х(1,25),100х(1,3)и окуляры 7х и 10х).*

*+ - единичные коксиеллы хотя бы в одном поле зрения микроскопа или в препарате;*

*++ - 20-50 коксиелл в поле зрения микроскопа;*

*+++ - неподсчитываемое количество коксиелл в поле зрения.*

* антигенным свойствам : в сыворотке крови морских свинок массой 350-400 г., зараженных подкожно лиофилизированной культурой штамма М-44 в разведениях от 10-4 до 10-9 , на 29-31 сутки после заражения должны выявляться специфические комплементсвязывающие антитела (КС-антитела). Титры КС-антител, определяемые в реакции связывания комплемента (РСК) в присутствии 4 АЕ (антигенные еденицы) специфического антигена, не должны превышать 1:160 в сыворотках крови морских свинок, зараженных культурой в разведении 10-4 - 10-5;
* титры не должны превышать показатель 1:40 в сыворотках крови морских свинок, зараженных культурой в разведении 10-6 - 10-7;
* специфические КС-антитела могут отсутствовать в сыворотках крови морских свинок, зараженных культурой в разведении 10-8 - 10-9

В сыворотках иммунизированных животных не должны определятся КС-антитела к риккетсиям Провачека, Тифи.

**Требования к тест-штамму для контроля иммуногенности вакцины –(культура коксиелл Бернета вирулентного штамма Грита)**

Лиофилизированную культуру вирулентного штамма *Coxiella burnetii* «Грита» по мере использования, но не реже 1 раза в 5 лет, получают сублимацией с последующей запайкой ампул в вакууме и хранят в в ампулах при температуре не выше минус 40-50 о С в соответствии с установленными правилами порядка учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Культура *Coxiella burnetii* вирулентного штамма Грита используется непосредственно из лиофилизированного состояния для испытания вакцины по показателю: «Специфическая активность. Иммуногенность».

Работы с культурой коксиелл Бернета вирулентного штамма Грита проводят в соответствии с требованиями по безопасности работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности).

Тест- штамм для контроля должен соответствовать следующим требованиям:

* не должен быть контаминирован посторонней микрофлорой;
* морфологическим и тинкториальным свойствам: морфологическая форма - коксиеллы должны быть представлены преимущественно мелкими кокковидными формами «а» при наличии незначительного количества палочковидных форм «b» и нитевидных форм «d», окрашивающихся по Романовскому-Гимза в фиолетовый цвет;
* вирулентным и токсигенным свойствам: патогенность культуры вирулентного штамма коксиелл Бернета характеризуется развитием у морских свинок при подкожном заражении лихорадочной реакции (повышение ректальной температуры выше 39,5оС) и воспаления подкожной клетчатки и прилегающих мышц на месте введения.При заражении морских свинок культурой штамма Грита в разведениях 10-5 - 10-6 у всех животных должна развиться лихорадочная реакция, (повышение ректальной температуры выше 39,5о С продолжительностью не менее 4 сут) и обширная местная реакция. При заражении культурой - в разведениях 10-7-10-8 у всех животных должна развиться лихорадочная реакция, продолжительностью не менее 3 сут и ограниченное геморрагическое воспаление подкожной клетчатки размером не более 20 мм; у животных, зараженных культурой в разведениях 10-10-10-11, инфекция может протекать бессимптомно (определяется серологическим методом). Инфицирующая доза для морских свинок (ИД) не должна быть менее разведения 10-9.\*

*\* Инфицирующая доза (ИД) - наибольшее разведение 1г культуры, вызывающее при подкожном заражении морских свинок лихорадочную реакцию не менее 3 сут и ограниченное местное воспаление (+/++) хотя бы у одного животного. (Для приготовления лиофилизированных культур риккетсий отбирают желточные мешки с наличием большого количества риккетсий и проводят расчет взвеси для лиофилизации с учетом массы желточного мешка в г)*

* культуральным свойствам: в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов культура штамма Грита в разведении 10-3 на 7-10 сут после заражения должна вызывать массовое накопление коксиелл, которое приводит к гибели не менее 50 % эмбрионов. Минимальная инфицирующая доза для куриных эмбрионов (МИДэ) должна составлять не менее 10-9\*.

*\*МИДэ(инфекционный титр культуры) –наибольшее разведение 1г культуры штамма ,которое вызывает микроскопически подтверждаемое накопление коксиелл на + хотя бы у одного из зараженных куриных эмбрионов.*

* антигенным свойствам: подкожное заражение морских свинок культурой штамма Грита в разведении от 10-6 до 10-11 должно сопровождаться образованием в крови специфических комплементсвязывающих антител в титрах 1:160 – 1:1280 в зависимости от заражающей дозы.

**Основные этапы производства**

1. Культивирование коксиелл Бернета вакцинного штамма М-44 (получение рабочей посевной культуры)

1.1 Восстановление коксиелл Бернета вакцинного штамма М-44 из лиофилизированной главной посевной культуры *Coxiella burnetii* штамма М-44 в развивающихся куриных эмбрионах (КЭ). Пассирование коксиелл Бернета до 5 пассажа проводят под контролем накопления возбудителя в желточных оболочках КЭ (рабочая посевная культура).

2. Получение биомассы

2.1 Массовое заражение шести - семисуточных куриных эмбрионов суспензией коксиелл рабочей посевной культурой.

2.2. Гомогенизация материала биомассы (каждой ёмкости) в шуттель-аппарате и определение её кондиционности. Проведение контроля гомогената (в каждой ёмкости) микроскопическим методом на степень накопления коксиелл и отсутствие посторонней микрофлоры, бактериологическим методом на стерильность по ОФС «Стерильность». Хранение биомассы до окончания контроля – при температуре минус 40оС в течение 7 сут.

2.3.Отбор кондиционного материала (стерильный гомогенат, содержащий значительное количество коксиелл с оценкой на ++\+++ по результатам микроскопического анализа мазков, окрашенных по методу Романовского-Гимза). Кондиционную биомассу штамма коксиелл Бернета ~~вакцинного~~ М-44 до сведения в вакцину хранят при температуре не выше минус 40ОС не более 14 сут.

3. Приготовление среды высушивания (обезжиренное стерильное коровье молоко и сахароза).

4.Приготовление и розлив полуфабриката вакцины.

4.1Сведение исходных компонентов.

Подсчет компонентов вакцины с учетом веса биомассы коксиелл и количества обезжиренного молока (в объеме равном весу биомассы, соотношение 1:1), объединение компонентов и центрифугирование молочно-коксиеллезной взвеси для осаждения грубых тканевых частиц и жировой плёнки.

4.2 Розлив вакцины: Доза – 0,5 мл, ампулы

Готовый полуфабрикат разливают в первичную упаковку (ампулы) и лиофилизируют при соответствующих условиях. Первичную упаковку (ампулы) герметизируют путем запайки под вакуумом и проверяют на герметичность и потерю в массе при высушивании в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

5. Производственный контроль сухой вакцины.

6. Оформление готового препарата. Маркировка ампул, фасовка и упаковка вакцины.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Аморфная масса в виде таблетки розового цвета с сероватым, желтоватым или коричневатым оттенком. Определение проводят визуально.

**Подлинность.** Вакцина должна вызывать специфический иммунитет к коксиеллам Бернета при иммунизации морских свинок, обладать инфекционностью и характерными морфологическими свойствами при культивировании коксиелл в развивающихся куриных эмбрионах. Определение проводят в соответствии с разделом «Специфическая активность».

**Время восстановления препарата**. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Вакцина должна восстанавливаться в течение 2 мин при добавлении в ампулу 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, используемого в качестве растворителя для приготовления лекарственных форм для инъекций. Восстановленная вакцина представляет собой густую гомогенную суспензию розового цвета с сероватым, желтоватым или коричневатым оттенком. Определение проводят визуально.

**Время седиментационной устойчивости.** Суспензия вакцины после встряхивания не должна расслаиваться в течение не менее 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

**Размер частиц**. Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 3 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение потери в массе при высушивании».

**Стерильность.** Вакцина не должна быть контаминирована посторонней микрофлорой. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Аномальная токсичность**. Вакцина должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Вводят одну прививочную дозу для человека. Содержимое 1 ампулы растворяют в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций, тест доза 0,5 мл каждому животному: 5 мышам массой 17-20 г. внутрибрюшинно и 2 морским свинкам 250-300 г. подкожно. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

**Специфическая безопасность**. Вакцина должна быть безопасной. Определяют биологическим методом на 18 морских свинках массой 350-400г без учета пола, которым подкожно в объеме 1 мл вводят образцы препарата в дозах ,содержащихся в разведениях 10-5 10-6 10-7. Одновременно должна быть сформированная контрольная группа из 18 интактных морских свинок той же весовой категории без учета пола, - для последующего их использования в качестве контрольной группы при испытании вакцины по показателю «Специфическая активность. Иммуногенность». Предварительно, до иммунизации, проводят термометрию животных. В опыте используются морские свинки, температура которых в течение предшествующих 3 сут не превышала 39,5 о С.

Для иммунизации животных используют две ампулы вакцины. Содержимое каждой ампулы восстанавливают в 2,5 мл стерильного фосфатного забуференного физиологического раствора рН (6,8 - 7,2), после чего содержимое ампул объединяют, получая при этом разведение -10-1 (учитывается доза розлива вакцины 0,5мл и её исходное разведение по возбудителю в среде высушивания 1:2). Далее методом последовательных десятикратных разведений с 10-2 до 10 -7 проводят разведение вакцины, соблюдая правила асептики. Каждой дозой вакцины в рабочих разведениях от 10-5 до 10-7 вакцинируют по 6 морских свинок подкожно в левую паховую область в объёме 1,0 мл. Наблюдение за иммунизированными животными (температурная и местная реакция) проводят в течение 15 сут после вакцинации. У животных, вакцинированных вакциной в разведениях 10-6 и 10-7, не должно быть циклически протекающей лихорадки (повышение ректальной температуры выше 39,5 о С) и местной реакции в виде геморрагического воспаления. Допускается одно-двухдневный подъём температуры выше 39,5 о С и инфильтрат в месте введения не более 10 мм в диаметре не более чем у 2 свинок, вакцинированных вакциной в разведении 10-5.

Примечание.

Приготовление фосфатного забуференного физиологического раствора рН(6.8-7.2): 0,56г динатрия гидрофосфата (предварительно высушенного), 0,08г калия дегидрофосфата и 8,3г натрия хлорида растворяют в воде, доводят объем раствора водой до 1000 мл, перемешивают и проводят измерение рН потенциометрически. При необходимости, проводят корректировку рН до 6,8-7,2 насыщенными растворами солей динатрия гидрофосфата или калия дигидрофосфата. Полученный раствор стерилизуют при избыточном давлении пара 0,1 МПА, температуре 120-122 0С с выдержкой 15 мин однократно. Приготовленный раствор хранят при температуре 2-8 0С не более 1 мес.

После завершения испытания на специфическую безопасность иммунизированных морских свинок и контрольную группу животных Виспользуют для испытания вакцины по показателю «Специфическая активность 1.Иммуногенность».

**Специфическая активность**

**1.Иммуногенность**

Вакцина должна быть иммуногенной. Определение проводят на группах морских свинок, ранее иммунизированных вакциной в разведениях 10-5, 10-6, 10-7, после завершения испытаний специфической безопасности. Напряженность иммунитета у животных проверяют через 45-55 сут после иммунизации путем введения вирулентной культуры коксиелл Бернета штамма Грита, содержащей не менее 10000 инфицирующих доз возбудителя, что соответствует разведению 10-5 вирулентной культуры, используемой непосредственно из лиофилизированного состояния (при ИД равной разведению 10-9). Такой же дозой вирулентной культуры одновременно заражают 6 морских свинок из контрольной группы. Для подтверждения правильности использования величины заражающей дозы другой группе контрольных животных вводят культуру коксиелл штамма Грита в разведениях 10-8,10-9,10-10 (по 4 морских свинки на каждое разведение)

Оценку иммунитета у иммунизированных вакциной животных проводят на основании наблюдения за температурной реакцией в течение 19 сут после заражения и результатов вскрытия, проводимого по истечении этого срока, для определения характера и выраженности местной реакции. У иммунизированных морских свинок введение вирулентной культуры не должно вызвать развитие заболевания в связи с приобретением специфического иммунитета.

У всех контрольных животных, зараженных вирулентной культурой в разведении 10-5, должно развиться заболевание, характеризующееся лихорадочной реакцией продолжительностью не менее 4 суток и резко выраженной местной реакцией.

При ИД равной разведению 10-9 хотя бы у одного контрольного животного, зараженного вирулентной культурой в этом разведении, должна развиться укороченная лихорадка до 3 сут и местная реакция в виде точечных кровоизлияний в мышцы.

**2. Минимальная инфицирующая доза для куриных эмбрионов (МИДэ)**

МИДэ (минимальная инфицирующая доза для куриных эмбрионов) должна соответствовать разведению вакцины 10-9 – 10-11 (от 5∙107 до 5∙109 МИДэ в 1 прививочной дозе (0,05 мл)). Определяют биологическим и бактериоскопическим методом.

Определение МИДэ проводят на 6-7 суточных оплодотворенных куриных яйцах со скорлупой белого цвета. Для испытания используют 2 ампулы с вакциной, восстанавливают их содержимое в 5 мл фосфатного забуференного физиологического раствора Рн (6,8 -7,2 ) Полученная суспензия содержит живой компонент вакцины в разведении 10-1 (учитывается доза розлива вакцины 0,5 мл и её исходное разведение по возбудителю в среде высушивания 1:2). Далее готовят ряд последовательных десятикратных разведений вакцины от 10-2 до 10-11. Разведения вакцины 10-7-10-11, являющиеся рабочими для данного испытания, вводят куриным эмбрионам в полость желточного мешка в объеме 0,5 мл. На каждое разведение вакцины используют по 10 куриных эмбрионов, которые после введения вакцины инкубируют при температуре 35-37 о С и относительной влажности воздуха 40-60 % в течение 13 сут. Эмбрионы, павшие с 5 по 13 сут, вскрывают в день гибели, оставшиеся живыми – на 13 сут. С помощью анатомических пинцетов из каждого эмбриона извлекают кусочек оболочки желточного мешка, который после промывания в фосфатном забуференном физиологическом растворе pН 6,8-7,2 тщательно растирают на хорошо обезжиренном предметном стекле. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют смесью Никифорова, состоящей из равных объемов спирта этилового и эфира диэтилового и окрашивают по методу Романовского-Гимзы.

**Примечание**

Окраска по методу Романовского-Гимзы.

Приготовление буферного раствора

 Приготовление фосфатного буферного раствора (ФБС) осуществляют в соответствии с инструкцией по применению красителя Азур – Эозин по Романовскому (в растворе). Для приготовления ФБС допускается использование готовых наборов «Фосфатный буфер» с рН 6,8 – 7,2.

Полученный раствор используют для разведения красителя и промывки стекол.

Приготовление рабочего раствора красителя

Непосредственно перед окраской мазков готовят рабочий раствор красителя: смешивают краситель с буферным раствором в соотношении 1:5- 1:10 и фильтруют. Степень разбавления красителя устанавливают опытным путем. Полученный рабочий раствор красителя хранят при комнатной температуре в течение 6 - 8 часов.

Примечание. При отсутствии готового красителя Азур – Эозин по Романовскому ( в растворе) допускается приготовление раствора красителя из Азур-эозин по Романовскому сухого (далее красящая смесь) :

 Раствор красителя готовят из расчета 800 мг на 100 мл растворителя. Берут навески красящей смеси массой 300 мг и 500 мг. Навеску массой 300 мг помещают в фарфоровую ступку и добавляют 100 мл растворителя (смесь равных объемов спирта этилового 100 % и глицерина). Растирают навеску с растворителем, помешивая, добавляют навеску красящей смеси массой 500 мг до получения нужной концентрации.

Приготовленный раствор красителя хранят в сухом прохладном месте в плотно закрытом сосуде в течение месяца.

Приготовление рабочего раствора красителя: к 1 мл раствора красителя добавляют 2 мл основного буферного раствора и 47 мл воды дистиллированной.

Проведение анализа

Фиксированные мазки окрашивают согласно инструкции по применению красителя Азур – Эозин по Романовскому (в растворе). Время окраски составляет 20-40 минут (устанавливается опытным путем). По окончании окрашивания мазки промываются фосфатным буферным раствором с рН 6,8 – 7,2. Допускается использование для промывки препаратов водопроводной воды, воды очищенной с рН 6,8 ±0,3 (при этом необходимо избегать длительного контакта препарата с водой).

В мазках из оболочек желточных мешков куриных эмбрионов ,зараженных разведениями вакцины 10-7-10-8, коксиеллы должны обнаруживаться микроскопически. В мазках из оболочек желточных мешков куриных эмбрионов,зараженных разведениями вакцины 10-9-10-11, можно не получить микроскопически подтверждаемого накопления коксиелл.В этом случае необходимо проведение субпассажа.

Приготовленные мазки просматривают в световом биологическом микроскопе (иммерсионные объективы 90 х (1,25),100 х (1,3) и окуляры 7 х и 10 х). Коксиеллы должны иметь фиолетовую окраску и быть представлены преимущественно мелкими кокковидными формами «а», допускается наличие палочковидных форм « b» и нитевидных форм «d». Учет проводят на основании оценки накопления коксиелл по 3-х крестной системе.\*

*\*За МИДэ принимают наибольшее разведение вакцины, которое в пассаже (или субпассаже ) вызывает микроскопически подтверждаемое накопление коксиелл на + хотя бы у одного из зараженных эмбрионов (КЭ)\*.*

*Оценку количества коксиелл проводят по условной 3-х крестной системе (микроскопирование мазков из желточных мешков КЭ, окрашенных по Романовскому –Гимза ):*

*+ - единичные коксиеллы хотя бы в одном поле зрения;*

*++ - 20-50 коксиелл в поле зрения;*

*+++ - неподсчитываемое количество коксиелл в поле зрения.*

Расчет в 1 прививочной дозе: 1,0 мл вакцины должен содержать 10 9 - 10 11 МИДэ; 0,05 мл вакцины 1прививочной дозы - соответственно 5∙10 7 – 5∙10 9 МИДэ.

**Растворители, выпускаемые в комплекте с препаратом.**  0,9 % раствор натрия хлорида - растворительиспользуемый для приготовления лекарственных форм для инъекций. Требования к качеству растворителя должно быть определено в фармакопейной статье, в которую должны быть включены все показатели качества для контроля растворителя.

**Упаковка и маркировка** В соответствии с ОФС «Иммунологические лекарственные препараты».

**Транспортирование и хранение.** При температуре от 2 до 8о С в соответствии с ОФС «Иммунологические лекарственные препараты».