**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

 **ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**Вакцина Е сыпнотифозная ФС**

**комбинированная живая**  **Вводится впервые**

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

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину Е сыпнотифозную комбинированную живую (ЖКСВ-Е), лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения , которая представляет собой взвесь живых риккетсий Провачека (*Rickettsia prowazekii*) аттенуированного вакцинного штамма Е (Мадрид-Е), выращенных в ткани желточных мешков развивающихся куриных эмбрионов, в комбинации с растворимым антигеном из риккетсий Провачека (*Rickettsia prowazekii*) вирулентного штамма Брейнль, лиофилизированную в стерильном обезжиренном коровьем молоке.

 Вакцина предназначена для специфической профилактики сыпного тифа.

ПРОИЗВОДСТВО

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

 Производство вакцины Е сыпнотифозной комбинированной живой (ЖКСВ-Е) должно осуществляться с соблюдением надлежащих требований к организации производства и контролю качества лекарственных препаратов, гарантирующих качество и безопасность для человека.

. Производство вакцины ЖКСВ-Е должно быть основано на использовании системы посевного материала (системы посевных серий), предусматривающей соблюдение условий пассирования культуры риккетсий вакцинного штамма Е (Мадрид-Е) 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 (от породы кур, несущих яйцо белого цвета ) 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 подтверждено документально государственной ветеринарной службой.

 Одна прививочная доза вакцины ( 0,25 мл ) содержит:

-действующие вещества: лиофилизированная взвесь живых риккетсий Провачека вакцинного штамма Е (Мадрид-Е), содержащая от 1000 -100000 минимальных инфицирующих доз для куриных эмбрионов (МИДэ) и не менее 16 антигенных единиц растворимого антигена из риккетсий Провачека вирулентного штамма Брейнль.

-вспомогательные вещества: молоко коровье обезжиренное стерильное.

**Производственные штаммы риккетсий Провачека.**

 В качестве производственных штаммов для изготовления вакцины Е сыпнотифозной комбинированной живой (ЖКСВ-Е) используются два штамма риккетсий Провачека:

- аттенуированный вакцинный штамм Е (Мадрид-Е), культивируемый пассажами в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов ;

- вирулентный штамм Брейнль, используемый в качестве производственного штамма для изготовления растворимого антигена, входящего в состав ЖКСВ-Е, а также в качестве тест - штамма для контроля иммуногенности вакцины; культивируется пассажами в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов.

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

 Производственные штаммы должны иметь сертификаты качества.

 В материалах на вновь подготовленную серию лиофилизированной культуры («главной посевной культуры») вакцинного штамма Е (Мадрид-Е) *R. Prowazekii* должны быть представлены данные по истории выделения штамма, методу аттенуации, по основным показателям биологических свойств (морфологические и тинкториальные свойства, культуральные свойства, вирулентные, антигенные и иммуногенные свойства), условия хранения.

Лиофилизированную «главную посевную культуру» вакцинного штамма Е (Мадрид-Е) по мере использования, но не реже 1 раза в 5 лет, получают сублимацией с последующей запайкой ампул в вакууме. Штамм хранят в лиофилизированном виде - в ампулах при температуре не выше минус 40 – 50 °С в специальном или (специализированном) производственном подразделении в соответствии с установленными правилами порядка учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I- IV групп патогенности.

  **Требования к производственному вакцинному штамму Е (Мадрид-Е)**

Каждую серию «главной посевной культуры» вакцинного штамма Е (Мадрид-Е) 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 риккетсий. Для вакцинного штамма Е (Мадрид-Е) допустимо проведение культуры риккетсий не более 9 пассажей в желточных мешках куриных эмбрионов.

Работы с культурой риккетсий Провачека вакцинного штамма Е (Мадрид-Е) должны проводиться в соответствии с установленными требованиями по безопасности работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней.

Производственный вакцинный штамм Е (Мадрид-Е ) риккетсий Провачека должен соответствовать следующим требованиям:

- не должен быть контаминирован посторонней микрофлорой;

- обладать типичными для риккетсий морфологическими и тинкториальными свойствами: морфологическая форма - риккетсии должны быть представлены преимущественно мелкими палочковидными формами «b»; тинкториальные свойства – риккетсии должны окрашиваться по методу Романовского-Гимзы в фиолетовый цвет.

- вирулентным свойствам: основным показателем аттенуации вакцинного штамма Е (Мадрид-Е) риккетсий Провачека является, в отличие от вирулентного штамма Брейнль, резкое снижение патогенности для морских свинок. Культура риккетсий вакцинного штамма Е(Мадрид-Е) не должна вызывать у морских свинок выраженной клинической картины экспериментального сыпного тифа с характерной лихорадочной реакцией. Испытание проводят на морских свинках – самцах массой 300-350 г., которых заражают внутрибрюшинно лиофилизированной культурой штамма Е (Мадрид-Е) в разведениях 10-2 и 10-6 (в объеме 1 мл). Разведения лиофилизата и последующие разведения культуры готовят на стерильной 20% молочно-буферной смеси (МБС). Каждым разведением заражают не менее 6 свинок, температура которых в течение предшествующих 3--х сут не превышала 39,5 0С. Зараженных животных термометрируют на протяжении (15±1) сут. У морских свинок, зараженных культурой штамма в разведениях 10-2 и 10-3 допускается повышение температуры от 39,6 0С до 39,9 0С продолжительностью не более 2 сут у 1-2 животных каждой группы. У животных, зараженных культурой штамма в разведении 10-5-10-6, лихорадочная реакция должна отсутствовать. Инфицирующая доза для морских свинок (ИД) должна быть не более разведения 10-4.\*

Примечание.

Приготовление стерильной 20 % молочно-буферной изотонической смеси (МБС). 80 мл натрия хлорида раствора 0,9 % (рН 6,8-7,2) смешивают с 20 мл молока коровьего обезжиренного стерильного соответствующего качества.

\**Инфицирующая доза (ИД) – наибольшее разведение* *культуры штамма, вызывающее при заражении морских свинок лихорадочную реакцию повышение температура от 39,6 0С до 39,9 0С, продолжительностью не менее 4 сут хотя бы у одного животного.*

- культуральным свойствам: вакцинный штамм Е (Мадрид-Е) культивируют в развивающихся куриных эмбрионах. Культура риккетсий в разведении

10-3, введенная в полость желточного мешка 6-7 сут куриным эмбрионам должна вызывать специфическую гибель не менее 50 % эмбрионов на 6-8 сут после заражения. Минимальная инфицирующая доза для куриных эмбрионов (МИДэ) должна быть не менее 10-6.\*

\*/ *МИДэ- наибольшее разведение культуры штамма, которое вызывает* *микроскопически подтверждаемое наличие единичных риккетсий в поле зрения (+)хотя бы у одного* *из зараженных эмбрионов* (КЭ).

*Оценку количества риккетсий проводят по условной трех - крестной*  *системе* (*микрокопирование мазков из желточных мешков КЭ, окрашенных по* методу *Романовского – Гимзы; иммерсионные объективы 90Х (1,25), 100 Х (1,3) и окуляры 7Х и 10 Х):*

*+ - единичные риккетсии в поле зрения микроскопа или препарате*

*++ - 20-50 риккетсий поле зрения микроскопа*

*+++ - неподсчитываемое количество риккетсий в поле зрения микроскопа*

Примечание.

Описание приготовления мазков и окраски по методу Романовского-Гимзы изложено по тексту проекта ФС в разделе «Испытания (Специфическая активность. МИДэ)».

*.*

- антигенным свойствам: в сыворотках крови морских свинок-самцов массой 300-350 г, зараженных внутрибрюшинно лиофилизированной культурой штамма Е (Мадрид-Е ) в разведениях10-2 и 10-3 на 21 сут после заражения должны выявляться специфические комплементсвязывающие антитела (КС – антитела). Титры КС-антител, определяемые в реакции связывания комплемента (РСК) в присутствии 4 АЕ (антигенные единицы) специфического антигена должны быть не более 1:80, при этом у большинства животных этих групп титр антител должен быть 1:10 – 1:20.

 Титр КС-антител в сыворотках крови с антигенами гомологичной группы риккетсий Тифи должен быть ниже не менее, чем в 2 раза; КС - антитела к гетерологичным видам риккетсий - коксиеллам Бернета и риккетсиям Сибирика не должны определяться.

- иммуногенным свойствам: при внутрибрюшинном введении морским свинкам-самцам лиофилизированной культуры штамма Е (Мадрид-Е) в дозах, соответствующих разведениям 10-2 и 10-3 (в объеме 1 мл), у всех вакцинированных животных через 30 сут после иммунизации должен развиться полный или частичный (в зависимости от иммунизирующей дозы) иммунитет к заражению не менее 10 000 ИД вирулентной культуры риккетсий Провачека штамма Брейль. (описание методики вакцинации морских свинок при внутрибрюшинном введение изложен в п/разделе «вирулентные свойства»)

**Требования к производственному вирулентному штамму Брейнль**

 Лиофилизированную культуру R.Prowazekii вирулентного штамма «Брейнль» («главную посевную культуру») по мере использования, но не реже 1 раз в 5 лет, получают сублимацией с последующей запайкой ампул в вакууме и хранят в ампулах при температуре не выше минус 40-50 ºС в соответствии с установленными правилами порядка учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов 1-1У групп патогенности.

 Культура вирулентного штамма Брейнль используется для изготовления комплектующего компонента ЖКСВ-Е – растворимого антигена из риккетсий Провачека (количество пассажей в развивающихся куриных эмбрионах не регламентируется).

 Культура вирулентного штамма Брейнль непосредственно из лиофилизированного состояния используется в качестве тест-штамма для испытания вакцины по показателю «Специфическая активность. Иммуногенность».

 Каждую серию лиофилизированной культуры вирулентного штамма Брейнль(«главную посевную культуру») испытывают на соответствие общим требованиям к риккетсиозным штаммам, предназначенным для производства диагностических и профилактических препаратов и методам их контроля.

Работы с культурой риккетсий Провачека вирулентного штамма Брейнль проводят в соответствии с установленными требованиями по безопасности работы с микроорганизмами 1-11 групп патогенности (опасности).

Производственный вирулентный штамм Брейнль риккетсий Провачека должен соответствовать следующим требованиям:

- не должен быть контаминирован посторонней микрофлорой;

- обладать типичными для риккетсий морфологическими и тинкториальными свойствами: морфологическая форма - риккетсии представлены в виде палочковидных форм «b» при наличии небольшого количества форм «d» (нитевидные) и «a» (кокковидные); тинкториальные свойства – риккетсии должны окрашиваться по методу Романовского-Гимзы в фиолетовый цвет.

- вирулентным и токсигенным свойствам: патогенность культуры штамма Брейнль характеризуется развитием лихорадочной реакции( повышение температуры от 39,6 о С до 40,1 о С) и скротального феномена у морских свинок-самцов при внутрибрюшинном заражении. Скротальный феномен является проявлением орхита и считается специфическим признаком сыпного тифа у мелких лабораторных животных. При внутрибрюшинном заражении морских свинок - самцов лиофилизированной культурой штамма «Брейнль», разведенной от 10-3 до 10-6 в объёме 1 мл (разведения лиофилизата в объеме высушенного материала и последующие разведения культуры готовят на стерильной 20 % МБС, у всех животных должна возникать лихорадочная реакция продолжительностью не менее 5 сут, протекающая со скротальным феноменом у части морских свинок; при разведении культуры 10-7 должна возникать укороченная лихорадочая реакция до 4 сут без скротального феномена хотя бы у одной свинки; при разведении культуры 10-8-10-9 инфекция может протекать бессимптомно и определяться серологически Зараженных животных термометрирую тежедневно в течение 21 сут. Инфицирующая доза для морских свинок (ИД) должна составлять не менее 10-7.\*

\**Инфицирующая доза (ИД) – наибольшее разведение* *культуры штамма, вызывающее лихорадочную реакцию продолжительностью до 4* *сут хотя бы у одного животного, скротальный феномен может* *отсутствовать.*

- культуральным свойствам: в желточных мешках куриных эмбрионов после заражения культурой штамма Брейнль происходит значительное накопление риккетсий, которое приводит к гибели эмбрионов. Культура риккетсий в разведении 10-3 должна вызывать специфическую гибель не менее, чем 50 % эмбрионов на 6-8 сут после заражения. Минимальная инфицирующая доза для куриных эмбрионов (МИДэ) должна составлять не менее 10-8.\*

*\*/ МИДэ - наибольшее разведение культуры штамма, которое вызывает микроскопически подтверждаемое наличие единичных риккетсий (+ ), хотя бы у одного из зараженных эмбрионов (КЭ).*

*Оценка содержания риккетсий по условной 3-х крестной системе (микроскопирование мазков из желточных мешков КЭ, окрашенных по методу Романовского –Гимзы;* *иммерсионные объективы 90Х (1,25), 100 Х (1,3) и окуляры 7Х и 10 Х):*

*+ - единичные риккетсии в поле зрения микроскопа или препарате*

*++ - 10-50 риккетсий поле зрения микроскопа*

*+++ - неподсчитываемое количество риккетсий в поле зрения микроскопа*

- антигенным свойствам: внутрибрюшинное заражение морских свинок культурой риккетсий штамма Брейнль в разведении от 10-3 до 10-9 должно сопровождаться образованием в крови сывороток специфических комплементсвязывающих антител в титре 1:160-1:1280 в зависимости от заражающей дозы.

**Основные этапы производства**

1. Получение растворимого антигена из риккетсий Провачека вирулентного штамма Брейнль.

 1.1. Восстановление лиофилизированной культуры *R.Prowazekii* штамма Брейнль («главная посевная культура»). Восстановление лиофилизата в объеме высушенного материала проводят на стерильной 20 % МБС,далее культуру штамма культивируют в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов (КЭ) с целью получения «рабочей посевной культуры» (количество пассажей не регламентируется).

 1.2. Получение биомассы риккетсий штамма Брейнль:

* массовое заражение КЭ суспензией риккетсий «рабочей посевной культуры»;
* вскрытие зараженных КЭ, контроль желточных оболочек на стерильность (по результатам микроскопического анализа мазков желточных оболочек на отсутствие посторонней микрофлоры) и регламентируемое накопление возбудителя по условной 3-х крестной системе с оценкой на ++/+++, отбор и гомогенизация кондиционных желточных оболочек для получения биомассы риккетсий.

 1.3. Получение антигена из биомассы риккетсий штамма Брейнль:

* приготовление нативного антигена в виде взвеси биомассы желточных оболочек в фосфатном забуференном физиологическом растворе рН 6.8-7,2; двукратная обработка нативного антигена эфиром диэтиловым (отделение тканевых примесей от водной антигенсодержащей фазы);
* сбор и вымораживание водной антигенсодержащей фазы при температуре минус 40 - 50 о С в течение 40 ч.;
* центрифугирование нативного антигена для удаления балластных белков и жирового компонента.

После отгонки под вакуумом эфира диэтилового водная фаза представляет собой растворимый антиген риккетсий Провачека.

На стадии приготовления растворимого антигена должно быть проведено тестирование материала по показателям специфической активности, стерильности и специфической безопасности материала.

 1.4. Тестирование жидкого очищенного антигена Провачека для сведения с маточной взвесью вакцинного штамма Е (Мадрид-Е) по показателям:

* стерильности;
* специфической активности в РСК с соответствующим стандартным образцом (СО) (специфической сыворотки к риккетсиям Провачека, с СО гомологичной сыворотки к риккетсиям Тифи и с СО гетерологичной сыворотки к коксиеллам Бернета;
* специфической безопасности на отсутствие риккетсий в мазках желточных оболочек КЭ, инокулированных пробами растворимого антигена Провачека.

Антиген из риккетсий Провачека штамма Брейнль очищенный и протестированный до сведения с маточной взвесью вакцинного штамма Е (Мадрид- Е) хранят при температуре 2 – 8 о С.

2. Культивирование риккетсий Провачека вакцинного штамма Е (Мадрид-Е)

 2.1. Восстановление лиофилизированной культуры R.Prowazekii штамма Е (Мадрид-Е) («главная посевная культура») в развивающихся куриных эмбрионах (КЭ) с целью получения «рабочей посевной культуры.» Допускается пассирование культуры штамма Е (Мадрид-Е ) до 9 пассажа (пассажи проводят под контролем накопления возбудителя в желточных оболочках КЭ). Восстановление лиофилизата в объеме высушенного материала, а так же материала для пассирования готовят на стерильной 20% молочно-буферной смеси (МБС).

 2.2. Получение вакцинной биомассы риккетсий Провачека штамма Е (Мадрид-Е):

* массовое заражение КЭ суспензией риккетсий

«рабочей посевной культурой»;

* вскрытие зараженных КЭ, отбор кондиционных желточных оболочек после контролей на стерильность (по результатам микроскопического анализа мазков желточных оболочек на отсутствие посторонней микрофлоры) и регламентируемое накопление возбудителя (наличие значительного количества риккетсий по условной 3-х крестной системе с оценкой на ++\+++);
* приготовление материала маточной культуры риккетсий для последующего сведения в полуфабрикат вакцины

Длительность промежуточного хранения кондиционного материала до сведения в полуфабрикат не более 45 сут при температуре минус 40 оС.

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

4. Приготовление и розлив полуфабриката вакцины ЖКСВ-Е

 4.1.Количественный расчет и сведение компонентов вакцины:

- маточной культуры риккетсий Провачека вакцинного штамма Е (Мадрид Е)

- антигена из риккетсий Провачека вирулентного штамма Брейнль,

- молока коровьего стерильного обезжиренного.

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

Готовый полуфабрикат разливают в первичную упаковку (ампулы) и лиофилизируют при соответствующих условиях. Первичную упаковку (ампулу) герметизируют путем запайки под вакуумом и проверяют на герметичность, потерю массы 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**  Пористая масса в виде таблетки от светло-желтого до темно-коричневого цвета. Определение проводят визуально.

Восстановленная вакцина. Гомогенная суспензия светло-желтого цвета. Определение проводят визуально.

 **Подлинность.** Подтверждается специфической активностью: антигенной активностью, исследуемой с применением антигенов специфичной, гомологичной и гетерологичной групп риккетсий, определением минимальной инфицирующей дозы для куриных эмбрионов (МИДэ). Определение проводят по разделу «Специфическая активность».

 **Время восстановления препарата.** Испытания проводятсоответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Вакцина должна востанавливаться в течение 2 мин при добавлении в ампулу 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, используемого в качестве растворителя для приготовления лекарственных форм для инъекций. Восстановленная вакцина представляет собой гомогенную суспензию светло-желтого цвета. Определение проводят визуально.

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

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

 **рН.** От 5,0 до 7,0. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

 **Потеря в массе при высушивании.** Не более 3,0 %. 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 -0,25 мл каждому животному: мышам массой 17-20 г внутрибрюшинно и 2 морским свинкам массой 250-350 г подкожно. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

 **Специфическая безопасность.** Вакцина должна быть безопасной. Определяют биологическим методом на 20 морских свинках – самцах массой 300 – 350 г. Одновременно должна быть сформирована контрольная группа из 15 интактных морских свинок - самцов той же весовой категории, - для последующего их использования в качестве контрольной группы при испытании вакцины по показателю «Специфическая активность. Иммуногенность». Предварительно, перед иммунизацией, проводят термометрию животных. В опыте используются морские свинки, температура которых в течение предшествующих 3 сут не превышала 39,5 ºС.

 Для иммунизации используют 24 - 26 испытуемых образцов. Содержимое каждого образца восстанавливают в первоначальном объеме (0,5 мл) стерильной 20 % молочно-буферной изотонической смесью (МБС). Восстановленная вакцина содержит живой компонент в разведении 10-2. Далее готовят десятикратное разведение вакцины 10-3, для этого 1 мл вакцины в разведении 10-2 вносят в 9 мл стерильной 20 % МБС. Каждую дозу вакцины (в разведении 10-2 и 10-3) вводят внутрибрюшинно 10 морским свинкам в объеме 1 мл. Наблюдение за вакцинированными животными (температурная реакция, скротальный феномен) проводят в течение 15 сут после вакцинации. Вакцина не должна вызывать циклически протекающую лихорадочную реакцию (повышение ректальной температуры выше 39,5 о С) и орхит (опухание, напряженность и болезненность тестикул) или гибель животных. Допускается одно-двухдневный нерегулярный подъем температуры выше 39,5 о С без развития орхита у 1-2 животных из каждой группы.

 После завершения испытания вакцины по специфической безопасности проводят забор крови у морских свинок для испытания вакцины по показателю «Специфическая активность 1. Антигенная активность» .

Далее, группу иммунизированных и контрольных животных используют для испытания вакцины по показателю «Специфическая активность.2. «Иммуногенность».

**Специфическая активность:**

**1. Антигенная активность.** Вакцина должна обладать антигенной активностью. Антигенную активность определяют серологическим методом в реакции связывания комплемента (РСК) по уровню специфических КС- антител в сыворотках крови, взятой на 19-20 сут после вакцинации морских свинок, после завершения испытания по специфической безопасности. Титр КС-антител с соответствующим стандартным образцом (СО) специфического диагностикума риккетсиозного Провачека сухого для РСК в сыворотках крови морских свинок, иммунизированных вакциной в разведении 10-2, должен быть 1:20-1:160, в разведении 10-3 – 1:10- 1:80. Титр КС-антител с СО гомологичного диагностикума риккетсиозного Тифи сухого для РСК должен быть на 1-2 разведения ниже, чем с СО диагностикума риккетсиозного Провачека сухого для РСК. Не должно быть задержки гемолиза с СО гетерологичного диагностикума риккетсиозного Сибирика сухого для РСК (или СО диагностикума коксиеллезного Бернета сухого для РСК).

**2. Иммуногенность.** Вакцина должна обладать иммуногенностью Определение проводят на группе морских свинок, ранее иммунизированных вакциной в разведении 10-2 и 10-3, после завершения испытаний специфической безопасности вакцины и последующего взятия крови на определение специфических антител. Через 29- 31 сут после вакцинации всем иммунизированным свинкам вводят внутрибрюшинно по 1 мл вирулентной культуры риккетсий штамма «Брейнль», содержащей не менее 10000 доз возбудителя, что соответствует разведению 10-3 вирулентной культуры (при ИД равной разведению10-7), используемой непосредственно из лиофилизированного состояния ,при разведении лиофилизата стерильной 20 % МБС. Такой же дозой вирулентной культуры одновременно заражают 5 интактных (контрольных) морских свинок – самцов. Для подтверждения правильности использования величины заражающей дозы другой группе контрольных животных вводят культуру риккетсий штамма «Брейнль» в разведениях 10-6 и 10-7. Оценка иммунитета иммунизированных вакциной животных проводят на основании ежедневных наблюдений за температурной реакцией и развитием скротального феномена в течение 21 сут у вакцинированных и контрольных животных.

 У морских свинок, иммунизированных вакциной в разведении 10-2 не менее чем у 80 % животных, должен развиться полный иммунитет (отсутствие лихорадочной реакции и скротального эффекта), у остальных животных – частичный иммунитет (укороченный лихорадочный период - не более 3 сут, и быстро проходящий (за 1-2 сут) скротальный феномен).

 У морских свинок, иммунизированных вакциной в разведении 10-3 не менее чем у 50 % животных, должен развиться полный иммунитет, не более чем у 20 % - его отсутствие (лихорадка в течение не менее 5 сут и скротальный феномен разной степени выраженности), у остальных – частичный иммунитет.

 У контрольных морских свинок, зараженных вирулентной культурой в разведении 10-3 и 10-6, должна быть выражена лихорадочная реакция продолжительностью не менее 5 сут и развитие орхита у части животных.

 У контрольных морских свинок, зараженных культурой в разведении 10-7 хотя бы у одного животного должна быть укороченная до 4 сут лихорадочная реакция без скротального феномена (ИД равная разведению 10-7).

**3.** **Минимальная инфицирующая доза риккетсий для куриных эмбрионов) МИДэ.**

МИДэ (минимальная инфицирующая доза риккетсий для куриных эмбрионов) должна соответствовать разведению вакцины 10-6 **-** 10-8 , что определяет содержание в одной прививочной дозе вакцины от 1000 до 100000 МИДэ. Определяют биологическим и бактериоскопическим методом.

Определение МИДэ проводят на 6 - 7 суточных куриных эмбрионах,которым вводят в полость желточного мешка вакцину в разведениях от 10-3 до 10-8 в объеме 0,5 мл. Для испытания используют 2 образца вакцины, содержимое каждой ампулы растворяют в 5 мл стерильной молочно-буферной изотонической смеси. Полученная суспензия содержит живой компонент вакцины в разведении 10-3, далее готовят ряд последовательных десятикратных разведений от 10-4 до 10-8. На каждое разведение вакцины используют по 10 куриных эмбрионов, которые после введения вакцины инкубируют при температуре 34 - 36 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 желточного мешка, который после промывания в 0,9 % растворе натрия хлорида (рН от 6,8-7,2) тщательно растирают на обезжиренном предметном стекле. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют смесью Никифорова, состоящей из равных объемов спирта этилового и эфира диэтилового, затем окрашивают по методу Романовского – Гимза.

Примечания.

Окраска по методу Романовского – Гимзы.

1.Краситель Азур-Эозин по Романовскому (в растворе)

Приготовление фосфатно-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. Раствор используют для разведения красителя и промывки стекол. Фосфатный буферный раствор хранят в плотно закрытом флаконе при температуре 2 – 8 0С в течение 3-х мес при комнатной температуре не более одного мес.

Приготовление раствора красителя.

Непосредственно перед окраской мазков готовят раствор красителя: смешивают краситель Азур - Эозин с фосфатно-буферным раствором в соотношении 1:5 – 1:20 и фильтруют через двойной бумажный фильтр. Степень разбавления красителя устанавливают опытным путем. Раствор красителя хранят при комнатной температуре в течение 6 - 8 ч.

 Краситель Азур-Эозин по Романовскому (сухой). При отсутствии готового красителя Азур – Эозин по Романовскому (в растворе) допускается приготовление раствора из красителя Азур-Эозин по Романовскому сухого (далее красящая смесь). Раствор красителя готовят из расчета 800 мг красящей смеси на 100 мл растворителя (смесь равных объемов спирта этилового и глицерина). 300 мг красящей смеси, растирают со 100 мл растворителя и далее, помешивая, добавляют оставшиеся 500 мг красящей смеси до получения однородной смеси. Раствор красителя хранят в течение мес в плотно закрытой темной бутыле отдельно от кислот и щелочей, в защищенном от света месте. Если при хранении раствора красителя образуется осадок, то рекомендуется его профильтровать.

Приготовление рабочего раствора красителя: к 1 мл раствора красителя добавляют 2 мл фосфатно - буферного раствора и 47 мл воды очищенной. Рабочий раствор красителя хранят при комнатной температуре в течение 6 - 8 ч.

Приготовленные мазки просматривают в световом биологическом микроскопе. Риккетсии должны иметь фиолетовую окраску и быть представленными преимущественно мелкими палочковидными формами «b» при наличии незначительного количества нитевидных форм «d» и кокковидных «а». Учёт результатов анализа проводят на основании оценки накопления риккетсий по 3-х крестной системе.\*

*\* За МИДэ принимают наибольшее разведение вакцины, которое вызывает микроскопически подтверждаемое наличие единичных риккетсий (+) хотя бы у одного из 10 зараженных эмбрионов.*

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

*+ - единичные риккетсии хотя бы в одном поле зрения,*

*++ - 10-50 риккетсий в поле зрения,*

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

 **Растворители, выпускаемые в комплекте с препаратом**. 0,9 % раствор натрия хлорид - растворитель для приготовления лекарственных форм для инъекций. Требование к качеству растворителя должно быть определено в нормативной документации, в которую должны быть включены все показатели качества растворителя.

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

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