ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ВАКЦИНА СТИ ЖИВАЯ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЖИВОТНЫХ

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

ГОСТ 15991—86

Издание официальное

Цена 5 коп.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

РАЗРАБОТАН Госагропромом СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

Г. И. Романов, А. А. Маничев, А. В. Лукьянченко

ВНЕСЕН Госагропромом СССР

Начальник Главного управления ветеринарии **А. Д. Третьяков**

УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 7 августа 1986 г. № 2362

УДК 616.981.51—085.371:619:006.354 Группа Р31

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ВАКЦИНА СТИ ЖИВАЯ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЖИВОТНЫХ

Технические условия

Live anthrax vaccine СТИ for animals.
Specifications

ГОСТ 15991—86

Взамен ГОСТ 15991—77

ОКП 93 8312

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам 7 августа 1986 г. № 2362 срок действия установлен

с 01.07.87
до 01.07.92

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на живую вакцину СТИ против сибирской язвы животных (сухую и жидкую), предназначенную для профилактической иммунизации животных, восприимчивых к данной инфекции.

Сухая вакцина СТИ представляет собой высушенную под вакуумом однородную пористую таблетку, состоящую из живых спор бескапсульной слабовирулентной культуры сибиреязвенного штамма СТИ-1 и наполнителя.

Жидкая вакцина СТИ представляет собой взвесь живых спор бескапсульной слабовирулентной культуры сибиреязвенного штамма СТИ-1 в 30%-ном нейтральном растворе глицерина.

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

★

© Издательство стандартов, 1986

1. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

1.1. Сухую и жидкую вакцину СТИ изготовляют в соответствии с требованиями настоящего стандарта по технологическим регламентам, утвержденным в установленном порядке.

1.2. Вакцина СТИ по физико-химическим, морфологическим, культуральным и биологическим свойствам должна соответствовать требованиям и нормам, указанным в табл. 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Характеристика и норма для вакцины	
	сухой	жидкой
Внешний вид	Однородная пористая таблетка беловато-серого цвета	Прозрачная слегка опалесцирующая жидкость с незначительным беловатым осадком, образующимся при хранении, легко разбивающимся в гомогенную взвесь
Наличие посторонней примеси	Вакцина не должна содержать постороннюю примесь	
Наличие вакуума	Голубое или розово-голубое свечение, сопровождающееся потрескиванием при проверке аппаратом типа д Арсонваль	—
Массовая доля влаги, %, не более	3	—
Растворимость	При добавлении физиологического раствора в объеме 2 см³ содержимое ампулы должно раствориться в течение не более 3 мин	—
Массовая доля глицерина, %	—	30±3
Концентрация водородных ионов (pH)	—	7,0±0,2
Число живых спор в 1 см³, млн.	20±5	
Массовая доля спор, %	95±5	
Контаминация бактериальной и грибковой микрофлорой	В посевах вакцины на питательных средах не должно быть роста посторонней бактериальной и грибковой микрофлоры в течение 10-суточного инкубирования при температуре (22±2) °С и (37±1) °С	
Типичность роста культуры штамма СТИ-1	В посевах вакцины в МПБ должен быть рост культуры штамма СТИ-1 с образованием на дне пробирки или флакона рыхлого белого осадка. В толще бульона могут быть взвешены хлопья растущей культуры или нити, опускающиеся ко дну, а на поверхности среды — пристеночное	

Продолжение табл 1

Наименование показателя	Характеристика и норма для вакцины	
	сухой	жидкой
	кольцо Бульон должен быть прозрачным или с небольшой опалесценцией На поверхности МПА должен быть рост культуры в виде серовато беловатых мелкозернистых колоний с серебристым оттенком *R* - и *RO*-форм	
Морфология культуры штамма СТИ-1	В мазках из бульонных и агаровых культур, окрашенных по Граму, должны быть довольно крупные (3—10 мкм) грамположительные палочки, которые располагаются поодиночке или соединены в цепочки, а также споры, представляющие собой овальные, иногда округлые образования размером 1,2 –1,5×0,8—1,0 мкм	
Подвижность	В раздавленной или висячей каплях, приготовленных из 18—24 ч бульонной культуры штамма СТИ 1, под микроскопом должны быть только неподвижные палочки и цепочки, состоящие из палочек	
Капсулообразование	В мазках, приготовленных из суточной культуры штамма СТИ-1 на среде ГКИ, а также в мазках-отпечатках из органов белых мышей, павших после введения вакцины, окрашенных по Михину или Романовскому-Гимза, должны быть только бескапсульные бациллы	
Безвредность	Вакцина, введенная трем кроликам массой 2—2,5 кг в дозе по 160 млн спор, не должна вызывать их гибели в течение 10 сут Допускается наличие отека на месте введения вакцины	
Иммуногенная активность	Вакцина, введенная подкожно десяти морским свинкам массой 350—400 г в дозе по 10 млн спор, должна предохранять от гибели не менее восьми животных из десяти при введении вирулентной для морских свинок сибиреязвенной культуры в дозе по 1 млн спор через 10—12 сут после вакцинации Из десяти одновременно зараженных невакцинированных морских свинок допускается выживание не более двух животных Величина $ИмД_{50}$ вакцины СТИ не должна превышать величину $ИмД_{50}$ референс-препарата вакцины СТИ	

Примечания

1 Среда ГКИ — среда Государственного контрольного института им Тарасевича, состоящая из 60% стерильного раствора Хенкса без антибиотиков и 40% стерильной неконсервированной сыворотки крупного рогатого скота, инактивированной при 56—58 °С в течение 30 мин, pH 7,2—7,3

2 Под вирулентной для морских свинок сибиреязвенной культурой понимают сухую культуру матрикса № 71 второй вакцины Ценковского с известной вирулентностью для морских свинок стандартизованную по количеству заражающих доз в ампулах Культуру готовит и высылает Всесоюзный государственный научно контрольный институт ветеринарных препаратов Госагропрома СССР Срок годности вирулентной для морских свинок сибиреязвенной

культуры 4 года. При сохранении величины $ЛД_{50}$ для морских свинок срок ее годности может быть продлен.

3. Под референс-препаратом вакцины СТИ понимают препарат с известной биологической активностью, изготовленный Всесоюзным государственным научно-контрольным институтом ветеринарных препаратов Государственного агропромышленного комитета СССР. Срок годности референс-препарата вакцины СТИ 3 года. При сохранении биологической активности срок годности его может быть продлен.

1.3. Требования безопасности

Требования безопасности, производственной санитарии, санитарно-противоэпидемического режима выполняют в соответствии с правилами техники безопасности, производственной санитарии и санитарно-противоэпидемического режима для предприятий по производству бактерийных и вирусных препаратов, утвержденными Министерством здравоохранения СССР.

2. ПРАВИЛА ПРИЕМКИ

2.1. Вакцину СТИ живую против сибирской язвы животных принимают сериями.

Под серией следует считать определенное количество препарата, изготовленное в одних производственных условиях, фасованное в ампулы одинаковой вместимости и лиофильно высушенное в одном сублимационном аппарате (для сухой вакцины), или помещенное в 30%-ный нейтральный раствор глицерина и фасованное в один вид флаконов (для жидкой вакцины), получившее свой номер, номер государственного контроля и оформленное одним документом о качестве.

2.2. Каждая серия вакцины СТИ должна быть принята на биопредприятии-изготовителе государственным контролером Всесоюзного государственного научно-контрольного института ветеринарных препаратов Государственного агропромышленного комитета СССР.

2.3. Для контроля качества живой вакцины СТИ против сибирской язвы животных от каждой серии отбирают сухой вакцины 30 ампул, жидкой вакцины — 20 флаконов.

2.4. При получении неудовлетворительных результатов хотя бы по одному из показателей по нему проводят повторные испытания на удвоенном количестве ампул и флаконов, отобранных от той же серии вакцины. Повторное испытание на иммуногенную активность проводят количественным методом в сравнении с референс-препаратом вакцины СТИ.

Результаты повторного испытания распространяют на всю серию.

2.5. При разногласиях в оценке качества контроль вакцины проводит Всесоюзный государственный научно-контрольный инсти-

тут ветеринарных препаратов или по его указанию государственный контролер на биопредприятии-изготовителе.

3. МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ

3.1. Метод отбора проб

3.1.1. Ампулы и флаконы отбирают из разных мест упаковки. 10 ампул или 10 флаконов используют для контроля, а 20 ампул и 10 флаконов хранят в архиве государственного контролера.

3.1.2. Ампулы и флаконы, отобранные для архива, опечатывают и составляют документ с указанием:

наименования препарата;

даты изготовления;

номера серии и госконтроля;

даты отбора;

объема серии;

должности и подписи лица, отобравшего ампулы и флаконы;

обозначения настоящего стандарта.

3.2. Для определения внешнего вида 10 ампул с сухой вакциной просматривают визуально, а 10 флаконов с жидкой вакциной встряхивают и просматривают в проходящем свете.

3.3. Для определения наличия посторонней примеси ампулы с сухой и флаконы с жидкой вакциной, предназначенные для контроля просматривают, как указано в п. 3.2.

3.4. Наличие вакуума в ампулах с сухой вакциной определяют при помощи аппарата типа д' Арсонваль.

3.5. Определение массовой доли влаги в сухой вакцине проводят по ГОСТ 24061—80.

3.6. Для определения растворимости сухой вакцины в три ампулы после их вскрытия вносят по 2 см^3 физиологического раствора.

Содержимое ампул после встряхивания должно полностью растворяться в течение не более 3 мин.

3.7. Определение массовой доли глицерина

Метод определения массовой доли глицерина в жидкой вакцине основан на установлении плотности раствора глицерина в вакцине.

3.7.1. Аппаратура и материалы

Баня водяная или термостат с температурой (22±2) °С;

Набор денсиметров по ГОСТ 18481—81;

Термометры стеклянные по ГОСТ 2823—73;

Цилиндры стеклянные мерные 1, 2, 3, 4 вместимостью по 100 см^3 по ГОСТ 1770—74.

3.7.2. Подготовка к испытанию

Два флакона с вакциной предварительно выдерживают в водяной бане или термостате при температуре (22±2) °С в течение 30 мин.

3.7.3. Проведение испытания

Флакон с вакциной извлекают из водяной бани или термостата, вскрывают, вакцину из флакона быстро переливают в стеклянный цилиндр и погружают в него денсиметр, рассчитанный на измерение плотности жидкости от 1,0597 до 1,0860 г/см³. Затем цилиндр с вакциной и денсиметром помещают в водяную баню или термостат, где выдерживают при температуре (22±2) °С в течение 15—20 мин. Аналогичным образом поступают со вторым флаконом с вакциной.

3.7.4. Обработка результатов

Массовую долю глицерина в вакцине в процентах определяют по показателю денсиметра в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Плотность раствора глицерина, г/см³	Массовая доля глицерина, %
1,0597	25
1,0622	26
1,0648	27
1,0674	28
1,0700	29
1,0727	30
1,0753	31
1,0780	32
1,0806	33
1,0833	34
1,0860	35

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Допустимая массовая доля глицерина в жидкой вакцине в пределах (30±3) % соответствует плотности 1,0648—1,0806 г/см³.

3.8. Концентрацию водородных ионов (pH) в жидкой вакцине определяют электрометрическим методом, используя потенциометр ЛПУ-01 или другие приборы того же класса точности, в соответствии с правилами, приложенными к прибору.

Для испытания используют два флакона с вакциной.

3.9. Определение числа живых спор

3.9.1 Определение числа живых спор путем посева вакцины на плотные питательные среды

3.9.1.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Автоклав вертикальный по ГОСТ 9586—75 или другой марки того же класса точности.

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

Микроскоп биологический марки МБИ по ГОСТ 8284—78.

Флаконы стеклянные вместимостью 20, 200 см³.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82.

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6 вместимостью 0,1; 1; 5; 10 см³, 2-го класса точности по ГОСТ 20292—74.

Чашки Петри по ГОСТ 25336—82.

Стекла предметные.

Стекла покровные.

Камера Горяева.

Пробки ватно-марлевые.

Шпатели.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

Вода водопроводная.

Раствор физиологический с pH 7,0±0,2.

Натрий фосфорнокислый пиро по ГОСТ 342—77.

Кислота соляная по ГОСТ 3118—77.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233—77.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77.

Агар пищевой по ГОСТ 16280—70.

Пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805—76.

Поджелудочная железа крупного рогатого скота с ферментативной активностью не менее 45 ед. действия.

Мясо крупного рогатого скота высшей категории.

3 9 1.2. *Подготовка к испытанию*

В соответствии с действующей рецептурой готовят мясопептонный агар (МПА), который стерилизуют в автоклаве при температуре (115±1) °С в течение 30 мин. Расплавленный и охлажденный до температуры (45—50) °С МПА разливают по 15—20 см³ в стерильные чашки Петри. Для работы используют питательную среду без конденсата, для этого после разлива МПА чашки Петри ставят вверх дном в термостат с температурой (37±1) °С на 18—24 ч.

Для испытания используют смесь вакцины из трех ампул или трех флаконов.

Содержимое каждой ампулы с сухой вакциной растворяют 2 см³ физиологического раствора, переносят в одну стерильную пробирку и тщательно перемешивают. Из пробирки 2 см³ приготовленной смеси переносят в стерильный флакон вместимостью 200 см³ и добавляют стерильный физиологический раствор до объема, указанного на этикетке коробки с вакциной.

Для приготовления смеси жидкой вакцины из каждого флакона после тщательного встряхивания берут по 2 см³ содержимого, переносят в один стерильный флакон вместимостью 20 см³ и тщательно перемешивают.

Из приготовленных смесей сухой или жидкой вакцины делают шесть последовательных десятикратных разведений от 10^{-1} до 10^{-6} на стерильном растворе с массовой долей фосфорнокислого

натрия пиро — 0,5% Для приготовления каждого разведения вакцины пользуются отдельной пипеткой

3 9 1 3 *Проведение испытания*

После тщательного перемешивания из двух последних разведений вакцины (10^{-5} и 10^{-6}), начиная с последнего, стерильной микропипеткой делают высевы в чашки Петри с МПА Каждым разведением вакцины засевают три чашки Петри с МПА, внося в каждую по 0,1 см³ взвеси спор

После равномерного распределения стерильным шпателем посевного материала по поверхности МПА, 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 отдельными шпателями

3 9 1 4 *Обработка результатов*

По истечении указанного времени подсчитывают количество выросших колоний каждого разведения вакцины и находят среднее арифметическое число колоний Число живых спор в 1 см³ вакцины СТИ (N), выраженное в млн, вычисляют по формуле

$$N=\frac{\overline{N}_5+\overline{N}_6}{1,1},$$

где

$\overline{N}_5$ — среднее арифметическое число колоний, выросших в чашках при посеве из разведения 10^{-5},

$\overline{N}_6$ — среднее арифметическое число колоний, выросших в чашках при посеве из разведения 10^{-6},

1,1 — постоянный коэффициент

3 9 2 Определение числа живых спор ускоренным методом

Определение числа живых спор в 1 см³ вакцины с помощью этого метода проводят в два этапа сначала определяют общее число спор в 1 см³ вакцины, а затем — массовую долю в ней живых спор в процентах После этого путем расчета определяют действительное число живых спор в 1 см³ вакцины

3 9 2 1 Аппаратура, материалы и реактивы по п 3 9 1 1

3 9 2 2 Для подсчета общего числа спор в 1 см³ вакцину СТИ сухую или жидкую, подготовленную по п 3 9 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) производят подсчет спор в пяти больших квадратах, расположенных по диагонали, и находят среднее арифметическое число спор в одном

большом квадрате. Общее число спор в 1 см³ вакцины (N_0), выраженное в млн, вычисляют по формуле

$$N_0 = \overline{N}_1 \times 1{,}25,$$

где

$\overline{N}_1$ — среднее арифметическое число спор в одном большом квадрате;

1,25 — постоянный коэффициент

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов трех определений

3 9 2 3 *Определение массовой доли живых спор в вакцине*

На предметное стекло стерильной пастеровской пипеткой наливают тонкий равномерный слой расплавленного МПА После его застывания стерильной пипеткой наносят каплю вакцины, подготовленной по п 3 9 2 2, и, наклоняя стекло в разные стороны, равномерно распределяют каплю по поверхности МПА 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 двух часов участок засеянной поверхности МПА просматривают под иммерсионной системой микроскопа с фазоконтрастным устройством (объектив 90, окуляр 7 или 10), для чего на нее предварительно помещают покровное стекло. В каждом поле зрения отдельно подсчитывают сибиреязвенные палочки и непроросшие сибиреязвенные споры Общее число подсчитанных клеток (сибиреязвенных палочек и спор) должно быть не менее 500 Для удобства рекомендуется пользоваться счетчиком для подсчета форменных элементов крови

Массовую долю живых спор в вакцине (C) в процентах вычисляют по формуле

$$C = \frac{N_2 \times 100}{N_3},$$

где

N_2 — число подсчитанных сибиреязвенных палочек,

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

100 — постоянный коэффициент

3 9 2 4 После определения общего числа спор N_0 в 1 см³ вакцины и массовой доли в ней живых спор (C) в процентах производят вычисление числа живых спор (N) в 1 см³ вакцины в млн по формуле

$$N = \frac{N \times C}{100}.$$

3.10. Определение массовой доли спор

3 10 1 Аппаратура, материалы и реактивы

Микроскоп биологический марки МБИ по ГОСТ 8284—78

Стекла предметные

Стекла покровные

Пипетки пастеровские

Раствор физиологический с pH 7,0±0,2

3 10 2 Подготовка к испытанию

Для испытания используют сухую или жидкую вакцину, подготовленную по п 3 9 1 2 Из приготовленных смесей сухой или жидкой вакцины делают разведение 10^{-1} на физиологическом растворе

3 10 3 Проведение испытания

Из разведения вакцины 10^{-1} на предметных стеклах готовят раздавленную или висячую каплю и просматривают ее под микроскопом (объектив 40, окуляр 7 или 10) В каждом поле зрения отдельно подсчитывают сибиреязвенные споры и палочки Общее число подсчитанных клеток (сибиреязвенных спор и палочек) должно быть не менее 200 Для удобства рекомендуется пользоваться счетчиком для подсчета форменных элементов крови

3 10 4 Обработка результатов

Массовую долю спор C_1 в вакцине в процентах вычисляют по формуле

$$C_1 = \frac{N_4 \times 100}{N_3},$$

где

N_4 — число подсчитанных сибиреязвенных спор,

N_3 — общее число подсчитанных клеток (сибиреязвенных спор и палочек),

100 — постоянный коэффициент

3.11. Определение контаминации бактериальной и грибковой микрофлорой

3 11 1 Аппаратура, материалы и реактивы

Автоклав вертикальный по ГОСТ 9586—75 или другой марки того же класса точности

Термостат с температурой (37±1) °С

Микроскоп биологический марки МБИ по ГОСТ 8284—78

Флаконы стеклянные вместимостью 100 см³

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6, вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ по ГОСТ 20292—74

Чашки Петри по ГОСТ 25336—82

Стекла предметные

Стекла покровные.

Пробки ватно-марлевые

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72
Вода водопроводная.
Раствор физиологический с pH 7,0±0,2
Кислота соляная по ГОСТ 3118—77.
Натрий хлористый по ГОСТ 4233—77
Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77.
Агар пищевой по ГОСТ 16280—70.
Пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805—76.
Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67
Поджелудочная железа крупного рогатого скота с ферментативной активностью не менее 45 ед действия
Мясо крупного рогатого скота высшей категории
Печень крупного рогатого скота высшей категории

3 1 1 2. Подготовка к испытанию

В соответствии с действующей рецептурой готовят мясо пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ) под вазелиновым маслом и среду Сабуро. МПА разливают в пробирки по 5—6 см³, МППБ под вазелиновым маслом по 8—10 см³ и по 50—60 см³ во флаконы, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве при температуре (115±1) С в течение 30 мин После стерилизации МПА «скашивают» и для работы используют только подсохшую питательную среду Пробирки и флаконы с МППБ под вазелиновым маслом перед использованием помещают в водяную баню, воду в которой доводят до кипения и выдерживают в ней в течение 20 мин с целью удаления растворенного в среде воздуха

Для испытания используют пять ампул с сухой или пять флаконов с жидкой вакциной

Содержимое каждой ампулы с сухой вакциной растворяют в стерильном физиологическом растворе в объеме, указанном на этикетке коробки с вакциной, используя для каждой ампулы отдельный флакон

3 1 1 3 Проведение испытания

Из каждой пробы сухой или жидкой вакцины делают посевы по 0,2—0,3 см³ в МПБ, МППБ под вазелиновым маслом, на МПА, агар Сабуро в две пробирки с каждой средой и по 0,5—1 см³ в два флакона с 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 затрудне-

нии дифференциации сибиреязвенной культуры от посторонней бактериальной и грибковой микрофлоры из микробных культур готовят мазки на обезжиренных предметных стеклах. Стекла подсушивают на воздухе до полного высыхания мазков и фиксируют над пламенем. После фиксации мазки высушивают на воздухе и окрашивают по Граму. Краску смывают дистиллированной водой, предметные стекла с мазками высушивают фильтровальной бумагой и просматривают под иммерсионной системой микроскопа.

3.11.4. Обработка результатов

Во всех питательных средах не должно быть роста посторонней бактериальной и грибковой микрофлоры. В МПБ и на МПА должен быть типичный рост культуры штамма СТИ-1.

В мазках, приготовленных из микробных культур и окрашенных по Граму, должна быть типичная сибиреязвенная культура.

3.12. Определение типичности роста культуры штамма СТИ-1

3.12.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Автоклав вертикальный по ГОСТ 9586—75 или другой марки того же класса точности.

Термостат с температурой (37±1) °С.

Микроскоп биологический марки МБИ по ГОСТ 8284—78.

Флаконы стеклянные вместимостью 100 см^3.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82.

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6, вместимостью 1, 2, 5 и 10 см^3 по ГОСТ 20292—74.

Чашки Петри по ГОСТ 25336—82.

Пробки ватно-марлевые.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

Вода водопроводная.

Раствор физиологический *с* pH 7,0±0,2.

Кислота соляная по ГОСТ 3118—77.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233—77.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77.

Агар пищевой по ГОСТ 16280—70.

Пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805—76.

Поджелудочная железа крупного рогатого скота с ферментативной активностью не менее 45 ед. действия.

Мясо крупного рогатого скота высшей категории.

3.12.2. Подготовка к испытанию

Питательные среды (МПБ, МПА) и испытуемую вакцину готовят по п. 3.11.2.

3.12.3. Проведение испытания

Микробные культуры выращивают в МПБ и на МПА, как указано в п. 3.11.3. В течение 10 сут посевы ежедневно просматри-

вают визуально на типичность роста сибиреязвенной культуры штамма СТИ-1.

3.12.4. Обработка результатов

В посевах вакцины в МПБ должен быть характерный рост сибиреязвенной культуры штамма СТИ-1 с образованием на дне пробирки или флакона рыхлого белого осадка. В толще бульона могут быть взвешены в незначительном количестве хлопья растущей культуры или нити, опускающиеся ко дну, а на поверхности среды может образовываться пристеночное кольцо. Бульон должен быть прозрачным или с небольшой опалесценцией. При встряхивании пробирки или флакона с посевами осадок разбивается на мелкие хлопья. Недопустим рост с образованием пленки, помутнением среды. На поверхности МПА должен быть рост культуры штамма СТИ-1 в виде серовато-беловатых мелкозернистых колоний с серебристым оттенком *R*-, в отдельных случаях *RO*-формы.

3.13. Определение морфологии культуры штамма СТИ-1

3.13.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Автоклав вертикальный по ГОСТ 9586—75 или другой марки того же класса точности.

Термостат с температурой (37±1) °С.

Микроскоп биологический марки МБИ по ГОСТ 8284—78.

Флаконы стеклянные вместимостью 100 см³.

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6, вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ по ГОСТ 20292—74.

Чашки Петри по ГОСТ 25336—82.

Стекла предметные.

Стекла покровные.

Пробки ватно-марлевые.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

Вода водопроводная.

Раствор физиологический *с* pH 7,0±0,2.

Кислота соляная по ГОСТ 3118—77.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233—77.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77.

Агар пищевой по ГОСТ 16280—70.

Пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805—76.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67.

Эфир для наркоза.

Поджелудочная железа крупного рогатого скота с ферментативной активностью не менее 45 ед. действия.

Мясо крупного рогатого скота высшей категории.

3.13.2. Подготовка к испытанию по п. 3.12.2.

3.13.3. Проведение испытания

Из 24—48-часовых микробных культур, выращенных в МПБ и на МПА по п. 3.11.3, готовят мазки и окрашивают их по Граму. Мазки просматривают под иммерсионной системой.

3 13 4 Обработка результатов

В мазках, окрашенных по Граму, должны быть крупные (3—10 мкм) грамположительные палочки, которые располагаются по одиночке или соединены в цепочки В небольшом количестве могут наблюдаться споры, представляющие собой овальные, иногда округлые образования размером 1,2—1,5×0,8—1,0 мкм

3.14. Определение подвижности культуры штамма СТИ-1

3 14 1 Аппаратура, материалы и реактивы

Автоклав вертикальный по ГОСТ 9586—75 или другой марки того же класса точности

Термостат с температурой (37±1) °С

Микроскоп биологический марки МБИ по ГОСТ 8284—78

Флаконы стеклянные вместимостью 100 см³

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6, вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ по ГОСТ 20292—74

Стекла предметные

Стекла покровные

Пробки ватно-марлевые

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72

Вода водопроводная

Раствор физиологический с pH 7,0±0,2

Кислота соляная по ГОСТ 3118—77

Натрий хлористый по ГОСТ 4233—77

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77

Пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805—76

Поджелудочная железа крупного рогатого скота с ферментативной активностью не менее 45 ед действия

Мясо крупного рогатого скота высшей категории

3 14 2 Подготовка к испытанию

МПБ и испытуемую вакцину готовят по п 3 11 2

3 14 3 Проведение испытания

Из 18—24-часовой микробной культуры, выращенной в МПБ, как указано в п 3 11 3, на предметных стеклах готовят по общепринятым методикам раздавленную или висячую каплю и просматривают под микроскопом (объектив 40, окуляр 8 или 10)

3 14 4 Обработка результатов

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

3.15. Определение капсулообразования

3 15 1 Аппаратура, материалы, животные

Холодильник с температурой (4±2) °С

Термостат с температурой (37±1) °С

Центрифуга с ускорением $(5—10)\times10^3$ g (g=9,8 м/с²)

Флаконы стеклянные вместимостью 20, 100 см³

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6, вместимостью 1, 5 и 10 см³ по ГОСТ 20292—74.

Стекла предметные.

Пробки резиновые.

Пробки ватно-марлевые.

Бумага фильтровальная.

Шприцы вместимостью 5 см³.

Иглы инъекционные № 0625.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

Вода водопроводная.

Раствор физиологический *с* pH 7,0±0,2.

Раствор Хенкса.

Эфир для наркоза.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67.

Мыши белые массой 18—20 г.

3.15.2. Подготовка к испытанию

В соответствии с действующей рецептурой готовят среду ГКИ и разливают ее в стерильные пробирки по 15 см³ и закрывают стерильными резиновыми пробками.

Для испытания используют 4 ампулы с сухой или 4 флакона с жидкой вакциной.

Содержимое каждой ампулы с сухой вакциной растворяют 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 $(5—10)\times10^3$ *g* м/с² в течение 20—30 мин, надосадочную жидкость удаляют, а осадки разводят стерильным физиологическим раствором до половины первоначального объема.

После растворения сухой или концентрирования жидкой вакцины готовят две средние пробы. Для этого по 5 см³ содержимого каждого из двух флаконов переносят в стерильный флакон, тщательно смешивают и флакон закрывают 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.

3.15.3. Проведение испытания

Из каждой приготовленной пробы делают посевы по 0,5 см³ в две пробирки со средой ГКИ, а также заражают 5 белых мы-

шей, взятых из группы заведомо здоровых животных, внутрибрюшинно в дозе по 1 см³ (30—50 млн живых спор).

По истечении 18—24 ч инкубации при температуре (37±1) °С из выросших в среде ГКИ микробных культур готовят мазки на обезжиренных предметных стеклах. Стекла подсушивают на воздухе до полного высыхания мазков, фиксируют в смеси Никифорова (одна часть этанола и одна часть эфира) в течение 15 мин. После фиксации мазки высушивают на воздухе и окрашивают синькой Леффлера или по Романовскому-Гимза в течение 15—20 мин. Краску смывают водопроводной водой, предметные стекла с мазками высушивают фильтровальной бумагой и просматривают не менее 100 полей зрения каждого мазка под иммерсионной системой микроскопа.

Все или большинство зараженных белых мышей должны погибнуть в течение пяти суток. Выживших мышей по истечении указанного срока убивают. Из брюшного экссудата, сердца и селезенки павших мышей делают на обезжиренных предметных стеклах мазки-отпечатки, фиксируют, окрашивают и просматривают как мазки, приготовленные со среды ГКИ.

3.15.4. Обработка результатов

В мазках микробной культуры, приготовленных из среды ГКИ, а также в мазках-отпечатках из брюшного экссудата и органов павших мышей должны быть только бескапсульные сибиреязвенные микробы.

3.16. Определение безвредности

3.16.1. Материалы, реактивы и животные

Флаконы стеклянные вместимостью 200 см³.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82.

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6, вместимостью 10 см³ по ГОСТ 20292—74.

Пробки резиновые или ватно-марлевые.

Тампоны ватные.

Шприц вместимостью 5 см³.

Иглы инъекционные № 0416—0426.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

Раствор физиологический с pH 7,0±0,2.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67.

Кролики массой 2—2,5 кг.

3.16.2. Подготовка к испытанию

Для испытания используют смесь вакцины из трех ампул или трех флаконов, которую готовят по п. 3.9.1.2. Шприцы, инъекционные иглы и ватные тампоны готовят по п. 3.15.2.

3.16.3. Проведение испытания

Трем клинически здоровым кроликам массой 2—2,5 кг каждый вводят по 8 см³ вакцины (160 млн. спор). Вакцину вводят

в область наружной поверхности бедра по 4 см³ в обе конечности каждому кролику

3 16 4 Обработка результатов

Вакцину СТИ считают безвредной, если все кролики в течение десяти суток после ее введения останутся живыми Допускается образование у животных отеков на месте введения вакцины

3.17. Определение иммуногенной активности

3 17 1 Материалы, реактивы, животные

Флаконы стеклянные вместимостью 50, 200 см³

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82

Пипетки стеклянные мерные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6, вместимостью 1, 5, 10 см³ по ГОСТ 20292—74

Пробки резиновые или ватно марлевые

Тампоны ватные

Иглы инъекционные № 0416—0426

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72

Раствор физиологический *с* pH 7,0±0,2

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67

Референс препарат вакцины СТИ

Культура сибиреязвенная вирулентная для морских свинок

Свинки морские массой 350—400 г

3 17 2 Подготовка к испытанию

Для испытания используют смесь вакцины из трех ампул или трех флаконов, приготовленную по п 3 9 1 2 Шприцы, инъекционные иглы и ватные тампоны готовят по п 3 15 2

Двенадцать клинически здоровых морских свинок, массой 350—400 г каждая, иммунизируют вакциной подкожно в области живота дозой по 10 млн спор в объеме 0,5 см³

3 17 3 Проведение испытания

Через 10—12 сут после вакцинации 10 привитых и 10 непривитых морских свинок заражают вирулентной для них сибиреязвенной культурой, которую вводят подкожно в область живота в дозе по 1 млн живых спор в объеме 0,5 см³

3 17 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 большего количества привитых морских свинок иммуногенные свойства вакцины проверяют количественным методом в сравнении с референс-препаратом вакцины СТИ, как указано в п 3 17 5

3 17 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 СТИ

3 17 5 1 *Подготовка к испытанию*

Из сухой или жидкой вакцины, подготовленной по п 3 9 1 2, и референс-препарата вакцины СТИ 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 по 30 клинически здоровых морских свинок подкожно в области живота в объеме по 0,5 $см^3$ Споровую культуру каждого разведения вводят семи-восьми животным — на две первые дозы берут по восемь, а на две последние меньшие дозы по семь голов, с тем чтобы ко времени заражения в живых осталось не менее шести морских свинок

Шприцы, инъекционные иглы и ватные тампоны готовят, как указано в п 3 15 2

3 17 5 2 *Проведение испытания*

Через 10—12 сут морских свинок, иммунизированных вакциной СТИ и референс-препаратом вакцины СТИ по шесть животных, привитых каждой дозой споровых культур, и шесть непривитых клинически здоровых морских свинок заражают вирулентной для них сибиреязвенной культурой, как указано в п 3 17 3

3 17 5 3 *Обработка результатов*

Все неиммунизированные морские свинки должны погибнуть в течение десяти суток Допускается выживание одного непривитого животного Из иммунизированных животных в указанный срок в зависимости от введенных доз испытуемой вакцины и референспрепарата вакцины СТИ некоторое количество остается живыми

$ИмД_{50}$ вакцины СТИ и референс-препарата вакцины СТИ вычисляют по формуле

$$\lg ИмД_{50} = 6{,}699 - 0{,}699\left(\sum_{i=1}^{n} Li - 0{,}5\right),$$

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

0,699 — логарифм шага разведения препаратов, равного 5,

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

i — индекс, соответствующий номеру дозы,

0,5 — постоянный коэффициент

В зависимости от количества выживших морских свинок могут быть получены следующие значения $\sum_{i=1}^{n} Li$ и соответствующие им величины $ИмД_{50}$, указанные в табл 3

Величина ИмД$_{50}$ вакцины СТИ не должна превышать величину ИмД$_{50}$ референс-препарата вакцины СТИ.

Таблица 3

$\sum_{i=1}^{n} Li$	lgИмД$_{50}$	ИмД$_{50}$ в млн спор	$\sum_{i=1}^{n} Li$	lgИмД$_{50}$	ИмД$_{50}$ в млн спор
1,00	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	1,00	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
2,00	5,6504	0,45	3,33	4,7185	0,05
2,16	5,5340	0,34	3,50	4,6020	0,04

4. МАРКИРОВКА, УПАКОВКА, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

4 1 Ампулы с сухой вакциной этикетируют на полуавтоматах с помощью клише и краски. На каждую ампулу наносят следующие обозначения:

вакцина СТИ,
номер серии,
дату изготовления

Надписи должны быть нанесены несмываемой краской.

4 2. Ампулы с сухой вакциной по 10 шт. упаковывают в картонные коробки по ГОСТ 12301—81 с наличием гнезд или перегородок, обеспечивающих их неподвижность в коробке. В каждую коробку вкладывают наставление по применению вакцины СТИ живой против сибирской язвы животных и номер упаковщика.

На коробку наклеивают этикетку, на которой указывают:

наименование и товарный знак предприятия-изготовителя;
наименование препарата;
количество ампул в коробке;
количество овцедоз вакцины в одной ампуле;
количество растворителя на одну ампулу;
номер серии;
номер госконтроля;
дату изготовления;
срок годности;
условия хранения;
дозы для разных видов и возрастов животных;
обозначение настоящего стандарта.

4 3 Коробки с ампулами сухой вакцины упаковывают в ящики дощатые по ГОСТ 13357—81, фанерные по ГОСТ 5959—80 или полистироловые массой брутто не более 15 кг.

Внутрь каждого ящика вкладывают контрольный лист с указанием наименования препарата, его количества в ящике, даты упаковки, номера упаковщика.

4 4 Жидкую вакцину фасуют по (50,0±1,5) или (100±3) см³ в стерильные флаконы вместимостью 50 или 100 см³

4 5 Флаконы с жидкой вакциной закрывают стерильными резиновыми пробками, закатывают алюминиевыми колпачками

4 6 На флакон с жидкой вакциной наклеивают этикетку, на которой указывают.

наименование и товарный знак предприятия-изготовителя;
наименование препарата;
количество его во флаконе в см³,
номер серии,
номер госконтроля;
дату изготовления,
срок годности;
условия хранения,
дозы для разных видов и возрастов животных,
обозначение настоящего стандарта

4 7 Флаконы с жидкой вакциной упаковывают в ящики дощатые по ГОСТ 13357—81, фанерные по ГОСТ 5959—80 или полистироловые массой брутто не более 15 кг Для упаковки флаконов используют алигнин по ГОСТ 12923—82 или другие теплоизоляционные материалы

Внутрь каждого ящика вкладывают не менее пяти экземпляров наставления по применению вакцины СТИ живой против сибирской язвы животных и контрольный лист с указанием наименования биопрепарата, его количества в ящике, даты упаковки, номера упаковщика

4 8 На каждое грузовое место наносят транспортную маркировку по ГОСТ 14192—77 с указанием манипуляционных знаков №№ 1, 2, 5 и предупредительной надписи «Биопрепараты»

Маркировка, характеризующая данные об упакованной продукции, должна содержать следующие обозначения наименование биопрепарата, его количество в ящике, условия хранения, срок годности и обозначение настоящего стандарта

4 9 Вакцину СТИ транспортируют всеми видами транспорта в соответствии с правилами перевозки скоропортящихся грузов, действующих на данном виде транспорта при температуре 2—15 °С

Допускается транспортировать вакцину при более высокой температуре, но не выше 20 °С При этом срок транспортирования должен быть не более 10 сут

4 10 Вакцину СТИ живую против сибирской язвы животных хранят в сухом темном месте при температуре 2—15 °С

5. УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

5.1. Вакцину СТИ живую сухую и жидкую применяют в ветеринарной практике для профилактической иммунизации против сибирской язвы животных, восприимчивых к данной болезни, в соответствии с наставлением по ее применению, утвержденным в установленном порядке.

6. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

6.1. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие живой сухой и жидкой вакцины СТИ против сибирской язвы животных требованиям настоящего стандарта при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

6.2. Гарантийный срок хранения сухой вакцины СТИ — 3 года, жидкой — 2 года со дня изготовления.

Датой изготовления сухой вакцины СТИ следует считать день окончания ее лиофилизации, жидкой вакцины СТИ — день заключения споровой культуры штамма СТИ-1 в 30%-ный нейтральный раствор глицерина.

Редактор *А А Зимовнова*
Технический редактор *М И Максимова*
Корректор *В С Черная*

Сдано в наб 01 09 86 Подп в печ 30 09 86 1,5 усл п л 1,5 усл кр отт 1,42 уч изд л.
Тир 6000 Цена 5 коп.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов 123840 Москва ГСП Новопресненский пер , 3
Тип «Московский печатник» Москва Лялин пер 6 Зак 2515