



18589-73

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

**ВАКЦИНА ЖИВАЯ СУХАЯ
ПРОТИВ БРУЦЕЛЛЕЗА
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ ИЗ ШТАММА № 19**

ГОСТ 18589-73

Издание официальное

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СТАНДАРТОВ
СОВЕТА МИНИСТРОВ СССР
Москва

Цена 4 коп.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ВАКЦИНА ЖИВАЯ СУХАЯ
ПРОТИВ БРУЦЕЛЛЕЗА
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ ИЗ ШТАММА № 19

ГОСТ 18589—73

Издание официальное

РАЗРАБОТАН Государственным научно-контрольным институтом ветеринарных препаратов Министерства сельского хозяйства СССР

Директор д-р вет. наук Бойко А. А.

Руководитель темы зав. лабораторией по контролю диагностических препаратов д-р вет. наук проф. Иванов М. М.

Исполнители: ст. научные сотрудники канд. вет. наук Михайлов Н. А., Малахова Т. И., Складчиков Р. В., Шевченко М. К., Голикова Г. А., мл. научный сотрудник Климанов А. И.

ВНЕСЕН Министерством сельского хозяйства СССР

Зам. министра Морозов П. И.

ПОДГОТОВЛЕН К УТВЕРЖДЕНИЮ

Отделом сельскохозяйственной продукции Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР

Начальник отдела канд. с.-х. наук Машкович И. К.

Отделом стандартизации продукции сельского хозяйства Всесоюзного научно-исследовательского института стандартизации (ВНИИС)

Зав. отделом канд. с.-х. наук Рыбаков М. Н.

Инженер Гусева А. Г.

УТВЕРЖДЕН Государственным комитетом стандартов Совета Министров СССР 27 февраля 1973 г. (протокол № 24)

Председатель отраслевой научно-технической комиссии зам. председателя Госстандарта СССР Малышков П. С.

Члены комиссии: Коваленко Ф. Ф., Абрамов М. Н., Белова Е. М., Грейни-ман С. Б., Милованов А. П., Степанов А. В., Ушаков В. П.

ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 4 апреля 1973 г. № 814

**ВАКЦИНА ЖИВАЯ СУХАЯ ПРОТИВ БРУЦЕЛЛЕЗА
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ
ИЗ ШТАММА № 19**

Dry Living Antibrucellosis Vaccine
for Domestic Animals from Stamm No. 19

**ГОСТ
18589—73**

Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 4 апреля 1973 г. № 814 срок действия установлен

с 01.01.1974 г.

до 01.01.1979 г.

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на живую сухую вакцину против бруцеллеза, изготовленную из слабовирулентного штамма бруцеллы абортус (*Brucella abortus*) № 19, предназначенную для профилактической иммунизации сельскохозяйственных животных.

1. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

1.1. Штамм бруцеллы абортус № 19, из которого изготавливается вакцина, должен соответствовать требованиям, указанным в табл. 1.

Таблица 1

Наименование показателей	Характеристика
Морфология	Культура должна состоять из грамтрицательных бактерий, окрашивающихся в красный цвет по методу Козловского, шаровидной, овоидной формы или в виде короткой палочки размером от 0,3—0,5 до 0,6—1,5 мкм
Рост на питательных средах	Должен давать типичный рост на элективных питательных средах: печеночном, мартеновском и картофельном агаре при pH 6,8—7,2



Наименования показателей	Характеристика
Рост на дифференциальных питательных средах	Должен давать рост на средах с фуксин-ом, сафранином и пенициллином и не должен давать роста на среде с тионин-ом
Газообразование	Должен выделять сероводород
Агглютинабельность	Должен агглютинироваться специфической сывороткой до ее предельного титра
Агглютинагенность	Должен вызывать образование агглютининов в организме животных
Диссоциация	Термопреципитация и проба с триафлавином должны быть отрицательны. Допускается наличие калоний R-форм в количестве не более 5%
Остаточная вирулентность	Должен хорошо приживаться при введении под кожу морским свинкам в дозе от 500 до 10000 микробных клеток
Патогенность	Не должен вызывать необратимых изменений в органах животных
Иммуногенность	Должен создавать иммунитет не менее чем у 70% вакцинированных морских свинок при заражении их 5—10 инфицирующими дозами бруцелл вида абортус

1.2. Живая сухая бруцеллезная вакцина из штамма бруцелла абортус № 19 по своим физико-химическим и биологическим свойствам должна соответствовать требованиям и нормам, указанным в табл. 2.

Таблица 2

Наименования показателей	Характеристика и нормы
Внешний вид	Сухая аморфная или мелкозернистая масса
Цвет	Светло-желтый или светло-коричневый
Растворимость	Должна растворяться в течение 1—2 мин в дистиллированной воде или в физиологическом растворе
Наличие механической примеси, плесени, неразбивающихся хлопьев, комочков или осадка после растворения	Не допускается
Вакуум ампул (флаконов)	При проверке аппаратом типа Д'Арсен-валя ампулы (флаконы) должны иметь фиолетово-синее свечение, сопровождающееся потрескиванием
Влажность, %, не более	3,0

Продолжение

Наименования показателей	Характеристика и нормы
Бактериальная чистота	Должна иметь чистый характерный рост бруцелл при посевах на питательные среды и не должна иметь посторонней микрофлоры
Концентрация живых бруцелл в дозе млрд, не менее: для крупного рогатого скота для мелкого рогатого скота Агглютиногенность	80 40 При введении под кожу морским свинкам должна вызывать образование агглютининов
Реактогенность	При введении под кожу телятам должна вызывать реакцию, характеризующуюся временным повышением температуры тела и местным воспалением тканей без появления абсцессов и образования агглютининов в титре 1:100 и выше
Безвредность	В концентрации 1 млрд. живых бруцелл в 1 мл не должна вызывать гибели белых мышей при подкожном введении им 0,25 мл и морских свинок при введении 1,0 мл. Не должна вызывать необратимых изменений в органах животных
Иммуногенность	Должна создавать иммунитет не менее чем у 70% вакцинированных морских свинок при заражении их 5—10 инфицирующими дозами бруцелл вида абортус

2. ПРАВИЛА ПРИЕМКИ

2.1. Каждая серия вакцины должна быть принята на предприятии-изготовителе контролером Государственного научно-контрольного института ветеринарных препаратов Министерства сельского хозяйства СССР.

2.2. Под серией следует понимать количество препарата, полученное в результате одноразового смешивания в одной емкости чистой культуры бруцелл, имеющее одинаковую концентрацию живых микробных тел, одновременно расфасованное, высушенное при одинаковом режиме, получившее номер госконтроля и оформленное одним документом о качестве.

2.3. Для проверки качества вакцины от каждой серии отбирают не менее 20 ампул (флаконов): 10 ампул (флаконов) используют для испытаний и 10 ампул (флаконов) оставляют в архиве государственного контролера.

2.4. При получении неудовлетворительных результатов хотя бы по одному из показателей серию вакцины считают не соответствующей требованиям настоящего стандарта.

2.5. Контрольную проверку образцов определенной серии вакцины должен проводить государственный контролер или Государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов.

3. МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ

3.1. Оборудование, реактивы, материалы

3.1.1. Для проведения испытаний применяют:

шкаф сушильный;

весы лабораторные с разновесом;

термометр технический стеклянный ртутный на 150°C по ГОСТ 2823—59;

эксикатор по ГОСТ 6371—64;

чашки Петри;

бюксы стеклянные по ГОСТ 7148—70 или металлические диаметром 45—50 мм, высотой 40—50 мм;

микроскоп;

щипцы тигельные;

кальций хлористый по ГОСТ 4161—67 (прокаленный);

кислоту серную по ГОСТ 4204—66, плотностью 1,84 г/см³.

3.2. Определение физико-химических и биологических свойств штамма бруцелла абортус № 19

3.2.1. Для определения морфологии бруцелл и особенностей их окраски делают мазки на предметном стекле и окрашивают методами Грама и Козловского. Мазки исследуют под микроскопом. Бруцеллы должны быть грамтрицательны, а при окраске по методу Козловского — окрашенными в красный цвет.

3.2.2. Для определения роста бруцелл производят посев их в чашки Петри на печеночный, картофельный, мартеновский или альбумин агары. Посевы выращивают в термостате при 37°C в течение 2—4 суток. В результате выращивания должны образоваться колонии S-формы: круглые, выпуклые, правильно контурированные, гладкие, прозрачные с голубоватым перламутровым оттенком.

3.2.3. При определении культурально-биохимических свойств с целью типирования бруцелл проводят посев их на твердые или полужидкие агары, содержащие краску в разведениях: тионин — 1 : 25000—1 : 100000; фуксин — 1 : 50000—1 : 100000; сафранин — 1 : 5000—1 : 10000 и пенициллин — 0,5, 5 и 10 ед. в 1 мл.

Среды выдерживают в термостате при 37°C от 3 до 7 суток. Рост бруцелл должен наблюдаться на средах, содержащих фуксин, сафранин и пенициллин. Не допускается рост бруцелл на среде, содержащей тионин, а также пенициллин в количестве 5 и более ед.

3.2.4. Для определения способности штамма выделять сероводород (H₂S) производят посев бруцелл в пробирки на скошенный

печеночный сахароглицериновый агар. Между ватной пробкой и стенкой пробирки укрепляют полоску фильтровальной бумаги, предварительно пропитанной насыщенным раствором уксуснокислого свинца и высушенной на воздухе. Пробирки выдерживают в термостате при 37°C в течение 2—4 суток.

Показателем образования сероводорода служит потемнение нижней части бумажной полоски, свисающей над посевом.

3.2.5. Агглютинабельность определяют методом постановки реакции агглютинации (РА) в пробирках со специфической агглютинирующей бруцеллезной сывороткой до ее предельного титра. Штамм должен давать положительную РА с моноспецифической сывороткой вида абортус и не давать РА с моноспецифической сывороткой вида мелитензис.

3.2.6. Агглютиногенность вакцинного штамма (способность вызывать образование в организме животных агглютининов) определяют следующим образом: морским свинкам массой по 300—400 г вводят под кожу двухсуточную агаровую культуру в объеме 1 мл с концентрацией 1—2 млрд. микробных тел по бруцеллезному стандарту мутности или кроликам массой по 2—2,5 кг в объеме 1 мл с концентрацией 3—5 млрд. микробных тел. Через 10—20 суток у этих животных берут кровь и исследуют ее соответствующими бруцеллезными антигенами в реакции агглютинации, которая должна быть положительной в разведении 1:50 и выше.

3.2.7. Для определения диссоциации взвесь бруцелл в физиологическом растворе в концентрации 1 млрд. прогревают при 90°C в течение 30—45 мин. Не должно быть оседания бруцелл и прояснения жидкости. Проба с трипафлавином должна быть отрицательной.

Штамм считается непригодным для изготовления вакцины, если в нем содержится более 5% колоний, имеющих R-форму, устанавливаемую по методу Уайт-Вильсона.

3.2.8. Остаточную вирулентность (приживаемость) штамма устанавливают в опытах на 9 морских свинок методом определения минимальной дозы взвеси бруцелл, способных вызывать регионарный или генерализованный процесс у морских свинок.

После подкожного заражения каждой трех свинок в дозе 500, 1000 и 10000 микробных тел по бруцеллезному стандарту мутности на 35—40 сутки их забивают и производят высева из двух паховых, подчелюстных, заглоточных и параортального лимфоузлов, печени, селезенки и костного мозга.

Двухсуточная агаровая культура бруцелл в дозах 500 и 1000 микробных тел в организме морских свинок приживается не всегда и при вскрытии животных через 35 суток бруцеллы могут обнаруживаться только в регионарных лимфоузлах (паховых, параортальных).

Доза в 10000 микробных тел и выше вызывает генерализованный процесс и бруцеллы обнаруживаются во всех лимфоузлах и внутренних органах.

Доза в 2 млрд. микробных тел не должна вызывать видимых изменений во внутренних органах. Допускается незначительное увеличение селезенки.

3.2.9. Иммуногенные свойства штамма проверяют каждые 1—1,5 года в опытах не менее чем на 30 морских свинок, которым вводят под кожу 2—3-суточную агаровую культуру в дозе 1—2 млрд. микробных клеток в 1 мл. Через 8—10 недель морских свинок заражают вирулентной культурой бруцелл вида абортус в дозе 5—10 инфицирующих доз. Одновременно заражают в той же дозе 5—10 непривитых морских свинок (контроль заражения).

Наличие иммунитета определяют через 35—45 суток после заражения выделением бруцелл заражающего штамма из лимфатических узлов и внутренних органов методами бактериологических посевов. В группе привитых животных высевы должны быть стерильными не менее чем у 70% свинок, в группе контрольных животных должно быть инфицировано не менее 90%.

3.3. Определение физико-химических и биологических свойств вакцины

3.3.1. Для определения внешнего вида, цвета, механической примеси, плесени ампулы (флаконы) с вакциной просматривают в проходящем свете, после чего ампулы (флаконы) проверяют на наличие вакуума.

3.3.2. Наличие вакуума в ампулах (флаконах) с вакциной устанавливают при помощи аппарата Д'Арсенваля или трансформатора Тесла. Фиолетово-синее свечение, сопровождающееся потрескиванием, указывает на наличие вакуума в ампулах (флаконах). Ампулы, не дающие свечения или дающие фиолетово-красное свечение, не допускаются к применению.

3.3.3. Для определения растворимости в ампулу (флакон) с вакциной при помощи пипетки или шприца вливают физиологический раствор или дистиллированную воду в количестве, соответствующем объему вакцины в ампуле до высушивания. Ампулу (флакон) встряхивают и наблюдают за растворением вакцины.

В течение 1—2 мин в ампуле должна образоваться равномерная взвесь серовато-желтого цвета без комочков, хлопьев и осадка.

3.3.4. Для определения влажности вскрывают 2—3 ампулы с вакциной и пересыпают содержимое в заранее подготовленную и взвешенную бюксу. Масса навески препарата в одной бюксе должна быть 75—100 мг (содержимое двух-трех ампул препарата). Анализ проводят на двух-трех параллельных пробах. Закрытые бюксы с препаратом взвешивают и переносят в нагретый до 100°C сушильный шкаф, где их открывают. Пробы оставляют в сушиль-

ном шкафу при 100°C в течение 60 мин. По истечении этого срока бюксы плотно закрывают крышками и переносят в эксикатор с хлористым кальцием на 30 мин для охлаждения до температуры 18—24°C, после чего их снова взвешивают. Влажность (X) в процентах вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A - B) \cdot 100}{A},$$

где A — масса препарата до высушивания, г;

B — масса препарата после высушивания, г.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов трех определений.

Содержание влаги в вакцине должно быть не более 3%.

3.3.5. Бактериальную чистоту определяют посевами вакцины на мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), мясопептонный печеночный бульон (МППБ) под вазелиновым маслом, печеночный и картофельный агары. Посевы на МПБ производят во флаконы с последующим пересевом на агар через 2—3 суток. Посевы выдерживают в термостате при 37—38°C в течение 5—6 суток.

Вакцина не должна содержать посторонних микробов и на питательных средах должен быть чистый характерный рост бруцелл. Отсутствие плесени устанавливают посевом вакцины на среду Сабуро и нейтральный бульон. Посевы выдерживают при комнатной температуре 18—24°C в течение 5—6 суток.

3.3.6. Количество живых бруцелл определяют подсчетом колоний, выросших на агаре в чашках Петри при посеве определенных разведений вакцины при температуре 37°C в течение 3—4 дней.

Для этого сухую вакцину разводят физиологическим раствором до объема жидкой вакцины, разлитой в ампулы перед сушкой. Затем берут 0,5 мл разведенной вакцины и переносят в пробирку с 4,5 мл физиологического раствора. Далее разводят вакцину до 10^{-8} — 10^{-9} . Из двух последних разведений пипеткой по 0,1 мл производят посевы на 3—5 чашках Петри с картофельным или мартеновским агаром.

Определяют количество живых бруцелл в 1 мл. Умножением числа бруцелл в 1 мл на количество миллилитров жидкой вакцины в ампуле (флаконе) устанавливают содержание их в ампуле (флаконе). Для определения количества доз для крупного рогатого скота общее количество живых бруцелл в ампуле (флаконе) делят на 80 млрд.

3.3.7. Агглютиногенность устанавливают определением агглютинационного титра у морских свинок, которые до этого были привиты вакциной с целью определения ее безвредности. Перед убоем у морских свинок берут кровь и ставят реакцию агглютинации со стандартным бруцеллезным антигеном. Агглютинационный титр у морских свинок должен быть в пределах от 1 : 50 и выше.

3.3.8. Проверку реактогенности проводят выборочно, для чего 5—10 телятам в возрасте 5 месяцев и старше подкожно вводят вакцину в дозе 80 млрд. живых бруцелл. На месте введения должна возникнуть местная воспалительная реакция без образования абсцесса, сопровождающаяся кратковременным повышением температуры тела и появлением агглютининов через 15—20 суток после введения вакцины в титре 1 : 100 и выше.

3.3.9. Безвредность каждой серии проверяют на 3 белых мышах, а смесь каждых 10 серий вакцины на 3 морских свинках. Вакцину растворяют физиологическим раствором, смешивают и разводят до концентрации 1 млрд. живых бруцелл в 1 мл, а затем вводят подкожно трем морским свинкам массой по 300—400 г по 1 мл и трем белым мышам массой по 15—20 г по 0,25 мл.

Вакцина не должна вызывать гибели белых мышей в течение 10-дневного наблюдения, морских свинок в течение 20—25-дневного наблюдения. Во внутренних органах не должно быть видимых патологоанатомических изменений, характерных для бруцеллезной инфекции. При наличии изменений во внутренних органах или сильных изменений тканей на месте введения вакцины, а также при падеже свинок каждую серию исследуют отдельно на трех морских свинках.

3.3.10. Иммуногенные свойства сухой бруцеллезной вакцины проверяют выборочно. Для этой цели 30 морским свинкам вводят подкожно по 1 мл вакцины, содержащей 500 млн., 1 и 2 млрд. живых бруцелл. Расчет живых бруцелл производят от общего числа бруцелл, содержащихся в ампуле (флаконе). Через 8—9 недель морских свинок заражают 5—10 инфицирующими дозами. Одновременно заражают в той же дозе 8—10 непривитых морских свинок (контроль заражения). Далее поступают так, как указано в пп. 3.2.8 и 3.2.9.

4. УПАКОВКА, МАРКИРОВКА, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

4.1. Вакцину расфасовывают в стерильные ампулы или флаконы вместимостью 4 мл. Содержимое ампул (флаконов) замораживают и подвергают лиофильной сушке, после чего ампулы (флаконы) с вакциной запаивают под вакуумом.

4.2. На ампулы (флаконы) наклеивают этикетку или несмываемой краской по стеклу наносят:

- а) наименование препарата;
- б) номер серии;
- в) срок годности.

4.3. Ампулы (флаконы) с вакциной упаковывают в картонные или полистироловые коробки с разделительными прокладками.

В каждую коробку вкладывают наставление по применению вакцины.

4.4. На коробку с ампулами наклеивают этикетку, на которой указывают:

- а) наименование или товарный знак предприятия-изготовителя;
- б) полное наименование вакцины;
- в) номер серии;
- г) номер госконтроля;
- д) дату изготовления;
- е) срок годности;
- ж) количество ампул (флаконов) в коробке, шт.;
- з) количество доз в ампуле;
- и) количество растворителя;
- к) условия хранения;
- л) обозначение настоящего стандарта.

4.5. Коробки с вакциной упаковывают в деревянные, фанерные, полистироловые или из гофрированного картона коробки (ящики) массой брутто не более 25 кг.

Внутри каждого ящика вкладывают контрольный лист с указанием.

- а) наименования вакцины;
- б) количества коробок в ящике;
- в) номера серии;
- г) даты упаковки;
- д) фамилии упаковщика.

4.6. Каждый ящик (коробку) маркируют по ГОСТ 14192—71 с нанесением предупредительных знаков, имеющих значение: «Осторожно, хрупкое», «Бойтся нагрева (тепла)»; предупредительных надписей — «Биопрепараты», а также следующих обозначений:

- а) наименования предприятия-изготовителя и его адрес;
- б) наименования вакцины;
- в) количества вакцины в ящике;
- г) номера серии;
- д) даты изготовления;
- е) срока годности;
- ж) условий хранения и транспортирования;
- з) обозначения настоящего стандарта.

4.7. Вакцину хранят в закрытых помещениях при температуре 2—10°C. Допускается хранение при 0°C.

4.8. Транспортируют вакцину всеми видами транспорта в условиях, исключающих возможность непосредственного воздействия солнечных лучей и атмосферных осадков, а также с соблюдением условий, указанных в п. 4.7.

4.9. Срок годности вакцины — 1 год со дня изготовления.

4.10. Срок хранения вакцины в архиве государственного контролера — 2 года.

Изменение № 1 ГОСТ 18589—73 Вакцина живая сухая против бруцеллеза сельскохозяйственных животных из штамма № 19

Утверждено и введено в действие Постановлением Государственного комитета СССР по управлению качеством продукции и стандартам от 30.03.90 № 701

Дата введения 01.07.90

Наименование стандарта дополнить словами: «Технические условия», «Specifications».

Под наименованием стандарта проставить код: ОКП 93 8411.

Пункт 1.2. Таблица 2. Показатель «Вакуум ампул (флаконов)» и его характеристика. Исключить слово: «(флаконов)» (2 раза);

показатель «Влажность, %, не более». Исключить слова: «не более»;

графа «Характеристики и нормы». Заменить значение: 3,0 на 1,6—3,0.

Пункт 3.1.1. Заменить ссылки: ГОСТ 2823—59 на ГОСТ 27544—87, ГОСТ 4161—67 на ГОСТ 450—77, ГОСТ 4204—66 на ГОСТ 4204—77, ГОСТ 6371—70 и ГОСТ 7148—70 на ГОСТ 25336—82;

(Продолжение см. с. 264)

шестой абзац дополнить ссылкой: «по ГОСТ 25336—82».

Пункт 3.3.1 после слов «проходящем свете» изложить в новой редакции: «ампулы проверяют на наличие вакуума».

Флаконы с вакциной заполняют перед укупориванием азотом особой чистоты и на наличие вакуума не контролируют».

Пункты 3.3.2, 3.3.4 изложить в новой редакции: «3.3.2. Определение вакуума в ампулах с вакциной — по ГОСТ 28083—89».

3.3.4. Определение массовой доли влаги — по ГОСТ 24061—89».

Пункт 3.3.6. Второй абзац после слов «в ампулы» дополнить словом: «(флаконы)».

Пункт 4.1 изложить в новой редакции: «4.1. Вакцину расфасовывают по 4 см³ в стерильные ампулы или по 6 см³ в стерильные флаконы. Содержимое ампул и флаконов подвергают лиофильной сушке, после чего ампулы запаивают под вакуумом, флаконы укупоривают в сублиматоре в атмосфере азота особой чистоты».

(ИУС № 7 1990 г.)

Редактор *Н. Е. Шестакова*
Технический редактор *С. Ю. Миронова*
Корректор *В. С. Черная*

Сдано в наб 09.05.73.

Подп. и печ. 17.05.73.

0,75 п. л.

Тир. 6000

Издательство стандартов Москва, Д-22, Новопресненский пер., 3
Тип. «Московский печатник». Москва, Лялин пер., 6, Зак. 762