ГОСТ 29312—92

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

АНТИТЕЛА И АНТИГЕНЫ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

Издание официальное

БЗ 10—2003

ИПК ИЗДАТЕЛЬСТВО СТАНДАРТОВ
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 576.8:006.354 Группа Р35

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

АНТИТЕЛА И АНТИГЕНЫ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА

Технические условия

Antibodies and antigens for laboratory diagnostics of foot-and-mouth disease. Specifications

ГОСТ 29312—92

МКС 11.220
ОКП 93 8880

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на антитела в виде типо- и штаммоспецифических сывороток, а также на гомологичные им эталонные и диагностические антигены, предназначенные для лабораторной диагностики ящура сельскохозяйственных животных.

Требования и нормы, установленные в стандарте, являются обязательными.

1. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

1.1. Характеристики

1.1.1. Типо- и штаммоспецифические сыворотки и антигены должны изготовляться в соответствии с требованиями настоящего стандарта по технологическим инструкциям, утвержденным в установленном порядке.

1.1.2. Типо- и штаммоспецифические сыворотки, независимо от их типовой и вариантной принадлежности, должны соответствовать требованиям, указанным в табл. 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Характеристика и норма для сывороток	
	нативных	сухих
Внешний вид	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость	Пористая аморфная масса, по высоте равная первоначальному объему высушенной жидкости
Цвет	Желто-коричневый разной интенсивности	
Растворимость	В изотонических растворах растворяются в любых пропорциях	При добавлении дистиллированной воды или изотонических растворов должны растворяться в течение 5 мин
Наличие посторонних примесей	Не допускается	
Массовая доля влаги, %	—	2,5±0,5
Активность	В реакции связывания комплемента (РСК) по ГОСТ 25384 с гомологичным антигеном, взятым в удвоенном (рабочем) титре, соответствующем 2 антигенным единицам (2 АЕ), сыворотка как нативная, так и сухая (после регидратации) должна дать задержку лизиса 90—100 % эритроцитов в разведении не ниже 1:64	

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1992
© ИПК Издательство стандартов, 2004

Продолжение табл. 1

Наименование показателя	Характеристика и норма для сывороток	
	нативных	сухих
Специфичность	При использовании сыворотки в учетверенном титре, соответствующем 4 сывороточным единицам (4 СЕ), задержка лизиса эритроцитов в РСК с антигенами гетерологичных типов вируса, взятыми в удвоенных (рабочих) титрах (2 АЕ), не должна превышать 10 %. С антигенами гетерологичных вариантов штаммоспецифические сыворотки в предельном титре, соответствующем 1 сывороточной единице (1 СЕ), могут дать задержку лизиса до 50 % эритроцитов	
Антикомплементарность, прокомплементарность	В разведениях выше 1:8, независимо от предельного титра специфической активности в РСК не допускается	

1.1.3. Эталонные и контрольные штаммоспецифические антигены вируса разных типов должны соответствовать требованиям, указанным в табл. 2.

Таблица 2

Наименование показателя	Характеристика и норма
Внешний вид	Пористая аморфная масса, по высоте равная первоначальному объему высушенной жидкости
Цвет	От светло-желтого до розового
Наличие посторонних примесей	Не допускается
Растворимость	При добавлении дистиллированной воды или изотонических растворов содержимое ампулы должно растворяться в течение 5 мин
Вирулентность	Не допускается
Массовая доля влаги, %	2,5±0,5
Активность	При проверке в РСК по ГОСТ 25384 с гомологичной сывороткой, взятой в удвоенном титре (2 СЕ), антиген должен дать положительную реакцию в разведении не ниже 1:6. В реакции длительного связывания комплемента (РДСК) его активность должна проявляться в разведении не ниже 1:12
Специфичность	При проверке в РСК (РДСК) по ГОСТ 25384 антигены должны быть типо- и штаммоспецифичными, т. е. в удвоенном титре (2 АЕ) они не должны давать задержку лизиса более 50 % с сыворотками гетерологичных штаммов, взятыми в предельных титрах (1 СЕ), а с сыворотками гетерологичных типов при аналогичных условиях реакция должна быть отрицательной
Антикомплементарность, прокомплементарность	В разведениях выше 1:2, не зависимо от предельного титра специфической активности в РСК, не допускается

1.2. Упаковка

1.2.1. Типо- и штаммоспецифические сыворотки и эталонные (контрольные) антигены расфасовывают по 0,5—1 $см^3$ в стерильные ампулы, высушивают методом лиофилизации при соответствующем режиме, обеспечивающем минимальные потери специфической активности и максимальную сохраняемость, герметизируют в атмосфере обезвоженного инертного газа.

1.2.2. Ампулы укладывают в картонные или полистироловые коробки по ГОСТ 12301 и упаковывают в транспортные контейнеры из дерева или картона по ГОСТ 10131 массой брутто не более 10 кг.

1.2.3. Внутрь каждого транспортного контейнера вкладывают этикетку с указанием наименования предприятия-изготовителя, наименования препарата, его количества в контейнере, номера серии, номера контроля, даты упаковывания, срока годности, номера или фамилии упаковщика.

1.3. Маркировка

1.3.1. На ампулы наклеивают или наносят несмываемой краской этикетки с указанием:

наименования;

болезни;

типа и штамма производственного вируса;

номера серии;

объема препарата, $см^3$;

даты изготовления (лиофилизации).

1.3.2. На коробки с ампулами наклеивают или наносят типографским способом этикетки с указанием:

наименования предприятия-изготовителя и его товарного знака;

наименования препарата;

болезни;

типа и штамма возбудителя;

номера серии;

номера контроля;

количества ампул в коробке;

даты изготовления;

условий хранения;

срока годности;

обозначения настоящего стандарта.

1.3.3. На каждое грузовое место наносят транспортную маркировку по ГОСТ 14192 с указанием манипуляционных знаков:

«Хрупкое! Осторожно.», «Беречь от солнечных лучей» и предупредительную надпись «БИОПРЕПАРАТЫ!».

Маркировка, характеризующая упакованную продукцию, должна содержать следующие обозначения:

наименование препарата;

объем препарата;

срок годности;

условия хранения.

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

2. ПРИЕМКА

2.1. Типо- и штаммоспецифические сыворотки и эталонные (контрольные) антигены принимают сериями. Под серией понимают определенное количество ампул с препаратом, изготовленным за один технологический цикл, одновременно расфасованным и лиофилизованным, оформленное документом о качестве с указанием номера контроля.

2.2. Каждая серия соответствующего диагностического препарата должна быть проверена ОБК предприятия-изготовителя.

2.3. Для контроля качества препарата из разных мест серии отбирают 1 % ампул, но не менее 30 ампул, из которых 20 используют для анализа на соответствие требованиям настоящего стандарта, а остальные 10 — хранят в опечатанном виде в архиве государственного контролера в течение срока годности.

2.4. Ампулы, предназначенные для хранения в архиве, сопровождают документом о качестве с указанием:

наименования препарата;

даты изготовления;

номера серии;

номера контроля;

даты отбора проб;

общего количества упакованных ампул;

объема изготовленной серии;

обозначения настоящего стандарта;

должности и подписи бракера, отобравшего пробу.

3. МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ

3.1. Отбор проб

Из каждой выборки произвольно отбирают 20 ампул, из которых 5 используют для определения остаточной влаги, а остальные — для контроля на соответствие другим требованиям настоящего стандарта.

3.2. Определение внешнего вида

Внешний вид, цвет, наличие посторонних примесей, правильность этикетки, качество герметизации и упаковки определяют визуально, просматривая каждую ампулу при дневном освещении.

3.3. Определение растворимости

Сущность метода заключается в определении времени, необходимого для полного растворения сухого диагностикума в исходном объеме растворителя.

3.3.1. Аппаратура и материалы

Часы любого типа.

Пипетки мерные по ГОСТ 29227.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, раствор концентрации 0,15 моль/дм^3.

Вода деионизированная или дистиллированная по ГОСТ 6709.

3.3.2. Проведение испытания

В 3—5 произвольно взятые ампулы с препаратом добавляют изотонический раствор или дистиллированную воду в объеме, равном объему препарата до высушивания, и встряхивают легкими постукиваниями до полного растворения содержимого, фиксируя время с помощью часов.

3.4. Определение массовой доли влаги

Массовую долю влаги диагностикумов определяют по ГОСТ 24061.

3.5. Определение активности

Сущность метода заключается в титровании типо- и штаммоспецифических сывороток и эталонных антигенов в РСК с гомологичными контрольными иммунореагентами, отвечающими требованиям настоящего стандарта.

3.5.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Бани водяные на 37, 56 и 100 °С.

pH-метр лабораторный.

Пробирки серологические.

Эксикаторы для создания атмосферы с повышенной влажностью.

Пипетки мерные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см^3 по ГОСТ 29227.

Штативы лабораторные.

Антигены эталонные и сыворотки диагностические против 7 типов вируса ящура и других везикулярных болезней.

Сыворотка гемолитическая к эритроцитам брана (гемолизин).

Комплемент морской свинки.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, раствор концентрации 0,15 моль/дм^3.

Вода деионизированная или дистиллированная по ГОСТ 6709.

3.5.2. Определение активности типо- и штаммоспецифических сывороток

3.5.2.1. Подготовка к испытанию

Сухие сыворотки в количестве 5 ампул предварительно регидратируют в исходном объеме водой. Для испытания типоспецифических сывороток готовят ряд разведений на 0,15 моль/дм^3 растворе хлористого натрия с интервалом 0,5 $\log_2$ с 1:8 до предельного титра, указанного на этикетке.

Штаммоспецифические сыворотки разводят на два порядка дальше предельного титра. Контрольный (эталонный) антиген, гомологичный контролируемой сыворотке, и остальные компоненты РСК готовят по ГОСТ 25384.

3.5.2.2. Проведение испытания

Реакцию связывания комплемента выполняют с 2 АЕ гомологичного антигена по ГОСТ 25384 в трехкратной повторности.

3.5.2.3. Обработка результатов

Результаты реакции учитывают визуально.

Предельным титром сыворотки (1 СЕ) считают ее максимальное разведение, обусловившее задержку лизиса более 90 % эритроцитов в присутствии 2 АЕ гомологичного антигена.

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов всех титрований, допустимые расхождения между которыми не должны превышать 0,5 $\log_2$.

3.5.3. Определение активности штаммоспецифических антигенов

3.5.3.1. Подготовка к испытанию

Сухие антигены в количестве 5 ампул предварительно регидратируют в исходном объеме воды, а затем готовят ряд разведений с интервалом в 1 $\log_2$ с 1:2 до предельного титра, указанного на этикетке. Штаммоспецифические сыворотки, гомологичные контролируемому антигену, и остальные компоненты РСК готовят по ГОСТ 25384.

3.5.3.2. Проведение испытания

Реакцию связывания комплемента выполняют с 2 СЕ гомологичной сыворотки по ГОСТ 25384 в трехкратной повторности.

3.5.3.3. Обработка результатов

Результаты реакции учитывают визуально.

Предельным титром антигена (1 АЕ) считают максимальное разведение, обусловившее задержку лизиса более 90 % эритроцитов в присутствии 2 СЕ гомологичной сыворотки.

За окончательный результат испытаний принимают среднеарифметическое значение результатов всех титрований, допустимые расхождения между которыми не должны превышать 1,0 $\log_2$.

3.6. Определение специфичности

Сущность метода заключается в титровании типо- и штаммоспецифических сывороток и эталонных антигенов в РСК с наборами гетерологичных иммунореагентов.

3.6.1. Аппаратура, материалы и реактивы — по п. 3.5.1.

3.6.2. Определение специфичности типо- и штаммоспецифических сывороток

3.6.2.1. Подготовка к испытанию

Сухие штаммоспецифические сыворотки в количестве 5 ампул регидратируют и разводят, как указано в 3.5.2.1. Помимо гомологичного антигена готовят рабочие разведения всех гетерологичных антигенов и остальных компонентов РСК по ГОСТ 25384.

3.6.2.2. Проведение испытания

Реакцию связывания комплемента выполняют по ГОСТ 25384 с 2 АЕ гомологичного и гетерологичных антигенов, в перечень которых при контроле типоспецифических сывороток включают антигены всех 7 типов вируса ящура и возбудителей других везикулярных болезней, а при контроле штаммоспецифических сывороток используют антигены актуальных вариантов вируса ящура.

3.6.2.3. Обработка результатов

Результаты реакции учитывают визуально. Во всех повторностях с антигенами возбудителей других везикулярных заболеваний реакция должна быть отрицательной, а с антигенами гетерологичных типов и вариантов — не превышать норм, установленных в табл. 1.

В контроле всех разведений сыворотки без комплемента должна быть 100 %-ная задержка лизиса эритроцитов, а в контроле без антигенов — их полный лизис.

3.6.3. Определение специфичности штаммоспецифических антигенов

3.6.3.1. Подготовка к испытанию

Контролируемые антигены разводят в количестве 5 ампул, как указано в п. 3.5.3.1. Рабочие разведения гетерологичных сывороток и остальных компонентов РСК готовят по ГОСТ 25384.

3.6.3.2. Проведение испытания

РСК выполняют по ГОСТ 25384 в трехкратной повторности с 2 АЕ гомологичных и гетерологичных сывороток, в перечень которых включают сыворотки против всех 7 типов вируса ящура, а также возбудителей других везикулярных болезней.

3.6.3.3. Обработка результатов

Результаты реакции учитывают визуально. Во всех повторностях с сыворотками других везикулярных болезней реакция должна быть отрицательной, а с сыворотками гетерологичных типов и вариантов — не превышать норм, установленных в табл. 2.

В контроле всех разведений антигена без комплемента должна быть 100 %-ная задержка лизиса эритроцитов, а в контроле без сыворотки — их полный лизис.

3.7. Определение вирулентности штаммоспецифических антигенов

Сущность метода заключается в выявлении биологической активности остаточного вируса при инокуляции исследуемого антигена 4—6 сут мышатам или в монослойные культуры клеток первично-трипсинизированных почек свиней 2—4-месячного возраста (СП).

3.7.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Термостат на 37 °С.

Шприцы «Рекорд» вместимостью 1 $см^3$.

Иглы инъекционные № 0625 или 0420 по ГОСТ 25377*.

Пробирки серологические.

Пипетки мерные вместимостью 1, 2 и 5 $см^3$ по ГОСТ 29227.

Мышата белые нелинейные 4—6-суточного возраста.

Белые мыши-самки лактирующие (кормилицы).

Культуры клеток СП, выращенные в пробирках, флаконах вместимостью 50—100 $см^3$ или в пенициллиновых флаконах и отмытые от ростовой среды.

Раствор солевой Эрла с 0,5 % гидролизата лактальбумина (pH 7,6) и антибиотиками по стандартной прописи (поддерживающая среда).

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, раствор концентрации 0,15 моль/$дм^3$ (pH 7,0—7,2).

Хлороформ свежедистиллированный или отмытый от водорастворимых фракций.

Вода деионизированная или дистиллированная по ГОСТ 6709.

3.7.2. Подготовка к испытанию

Сухие антигены в количестве 5 ампул предварительно регидратируют в исходном объеме водой или раствором хлористого натрия концентрации 0,15 моль/$дм^3$ и готовят два разведения 1:10 и 1:100 на солевом растворе Эрла с гидролизатом лактальбумина и антибиотиками. Флаконы (пробирки) с монослойной культурой клеток СП освобождают от поддерживающей среды.

3.7.3. Проведение испытания

3.7.3.1. Выявление вируса с использованием культуры клеток

Каждое разведение испытуемого антигена вносят в 3—5 флаконов вместимостью 50—100 $см^3$ или 5—10 пробирок (пенициллиновых флаконов) с монослойной культурой клеток СП в объеме 1,0; 0,2 и 0,1 $см^3$ соответственно на 1 ч при 37 °С. Затем растворы антигена удаляют, монослойные культуры ополаскивают поддерживающей средой, подогретой до 37 °С, вносят свежие порции поддерживающей среды в объеме 10; 2 и 1 $см^3$ соответственно и инкубируют при 37 °С в течение 5 сут. В случае выявления признаков дегенерации монослоя клеточные культуры промораживают, оттаивают, осветляют центрифугированием и используют для пассажа на культуре клеток СП.

При появлении признаков дегенерации монослоя клеток и во втором пассаже полученную культуральную жидкость после термолиза эмульгируют в течение 3—5 мин с хлороформом (10—15 %) для очистки от балластных веществ и исследуют в РСК по ГОСТ 25384 на наличие специфических антигенов размножающегося вируса ящура.

3.7.3.2. Выявление вируса с использованием белых мышат

Разведения испытуемого антигена вводят в дозе 0,1 $см^3$ подкожно 10 белым мышатам, которых вместе с двумя самками-кормилицами помещают в клетки для лабораторных животных. За инокулированными животными наблюдают 7 сут. Павших в течение этого периода мышат используют для дальнейшего пассирования. С этой целью готовят 10 %-ную суспензию скелетной мускулатуры павшего мышонка на поддерживающей среде и очищают ее 10—15 %-ным раствором хлороформа. В случае гибели мышат во втором пассаже готовят 33—50 %-ную суспензию их скелетной мускулатуры, обрабатывают ее 10—15 %-ным раствором хлороформа и исследуют в РСК по ГОСТ 25384.

3.7.4. Обработка результатов

Антиген считают вирулентным, если выявляемая в любом пассаже дегенерация монослойной культуры клеток СП или гибель мышат обусловлены репродукцией вируса с накоплением специфического комплементсвязывающего антигена.

3.8. Определение стандартности расфасовки сухих сывороток и антигенов

Сущность метода заключается в определении колебаний массы препарата, высушенного в ампулах.

3.8.1. Аппаратура и реактивы

Шкаф сушильный с регулируемой температурой в диапазоне 60—105 °С.

Весы аналитические.

Вода деионизированная или дистиллированная по ГОСТ 6709.

3.8.2. Подготовка к испытанию

5 ампул сухого препарата освобождают от этикеток, тщательно моют и высушивают на воздухе или в термостате при 37 °С в течение 30 мин.

3.8.3. Проведение испытания

Высушенные ампулы порознь взвешивают, освобождают от содержимого, моют в воде, высушивают при 100 °С в течение 60 мин и повторно взвешивают.

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ 25377—82.

3.8.4. Обработка результатов

По разности масс ампул до и после удаления содержимого находят массу препарата в каждой из них и высчитывают среднюю массу. Показатель варьирования массы препарата в процентах (X) вычисляют по формуле

$$X = 100 \frac{\Sigma (m_{ср} - m_{п})}{m_{ср}},$$

где $m_{п}$ — масса препарата в отдельной ампуле, г;

$m_{ср}$ — средняя масса препарата в 5 ампулах, г;

$\Sigma (m_{ср} - m_{п})$ — сумма отклонений массы препарата в каждой отдельной ампуле от среднего значения, г.

4. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

4.1. Типо- и штаммоспецифические сыворотки и эталонные антигены транспортируют всеми видами транспорта в соответствии с правилами перевозок скоропортящихся грузов, действующими на данном виде транспорта.

4.2. Диагностикумы хранят в темном сухом месте при температуре не выше 8 °С.

4.3. Гарантийный срок хранения нативных сывороток и сухих антигенов — 18 мес, а сухих сывороток — 24 мес со дня изготовления. По истечении указанных сроков препараты проверяют на активность и в случае ее сохранения в пределах, предусмотренных настоящим стандартом, они могут быть увеличены на 9 и 12 мес соответственно.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** Всесоюзным научно-исследовательским ящурным институтом

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 28.02.92 № 187

3. **ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

4. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 4233—77	3.5.1; 3.7.1
ГОСТ 6709—72	3.3.1; 3.5.1; 3.7.1; 3.8.1
ГОСТ 10131—93	1.2.2
ГОСТ 12301—81	1.2.2
ГОСТ 14192—96	1.3.3
ГОСТ 24061—89	3.4
ГОСТ 25377—93	3.7.1
ГОСТ 25384—82	1.1.2; 1.1.3; 3.5.2.1; 3.5.2.2; 3.5.3.1; 3.5.3.2; 3.6.2.1; 3.6.2.2; 3.6.3.1; 3.6.3.2; 3.7.3.1; 3.7.3.2
ГОСТ 29227—91	3.3.1; 3.5.1; 3.7.1

5. **ПЕРЕИЗДАНИЕ.** Май 2004 г.

Редактор *Т.П. Шашина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Н.Л. Рыбалко*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Изд. лиц. № 02354 от 14.07.2000. Сдано в набор 29.04.2004. Подписано в печать 03.06.2004. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд.л. 0,90.
Тираж 56 экз. С 2478. Зак. 206.

ИПК Издательство стандартов, 107076 Москва, Колодезный пер., 14.
e-mail: info@standards.ru
Набрано и отпечатано в ИПК Издательство стандартов

gost.e-ecolog.ru