ГОСТ 16739—88

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ТУБЕРКУЛИН ОЧИЩЕННЫЙ (ППД) ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

Издание официальное

БЗ 12—2004

Москва
Стандартинформ
2006

gost.e-ecolog.ru

УДК 616—074:619:006.354 Группа Р31

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ТУБЕРКУЛИН ОЧИЩЕННЫЙ (ППД) ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Технические условия

ГОСТ 16739—88

Purified tuberculin (PPD) for mammals.
Specifications

МКС 11.220
ОКП 93 8850

Дата введения 01.07.89

Настоящий стандарт распространяется на очищенный туберкулин ППД (purified protein derivative) для млекопитающих, выделенный из культуральной жидкости возбудителя туберкулеза бычьего вида, выращенного для синтетической питательной среде.

Очищенный туберкулин для млекопитающих предназначен для диагностики туберкулеза у млекопитающих животных.

Туберкулин изготовляют в лиофилизованном виде с прилагаемым к нему растворителем или в виде стандартного раствора.

1. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

1.1. Очищенный туберкулин для млекопитающих должен изготовляться в соответствии с требованиями настоящего стандарта по технологическим инструкциям, утвержденным в установленном порядке.

1.2. Характеристики

1.2.1. Туберкулин по физико-химическим и биологическим свойствам должен соответствовать требованиям и нормам, указанным в табл. 1.

1.3. Упаковка и комплектность

1.3.1. Туберкулин расфасовывают по 1000000 МЕ в пенициллиновые флаконы вместимостью 20 $см^3$, плотно закрывают резиновыми пробками и обкатывают алюминиевыми колпачками.

Флаконы с сухим туберкулином перед укупоркой заполняют инертным газом или осушенным воздухом.

Таблица 1

Наименование показателя	Характеристика и норма для	
	сухого туберкулина	стандартного раствора туберкулина
Внешний вид	Сухая пористая масса светло-коричневого цвета с серым оттенком	Прозрачная жидкость светло-коричневого цвета без механических примесей
Растворимость	Должен полностью растворяться в растворителе в течение 2 мин	—
Однородность раствора	Прозрачная жидкость светло-коричневого цвета без механических примесей	—
Показатель концентрации водородных ионов (pH)	$7,0 \pm 0,5$	

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1988
© Стандартинформ, 2006

Продолжение табл. 1

Наименование показателя	Характеристика и норма для	
	сухого туберкулина	стандартного раствора туберкулина
Массовая доля белка в сухом туберкулине, %	80,0 ± 20,0	—
Количество белка в стандартном растворе туберкулина, мг/см^3	—	0,8 ± 0,2
Массовая доля хлористого натрия, %	—	0,85 ± 0,05
Массовая доля фенола, %	—	0,3 ± 0,1
Массовая доля глицерина, %	—	10,0 ± 1,0
Стерильность	Должен быть стерильным	
Реактогенность	Не должен вызывать изменений в месте внутрикожного введения здоровым животным, допускается покраснение диаметром не более 5 мм	
Отсутствие сенсибилизирующих свойств	Многократное внутрикожное введение не должно вызывать у животных повышенной чувствительности замедленного типа	
Активность, МЕ/мг	50000 ± 10000	

1.3.2. На флаконы наклеивают этикетку или несмываемой краской по стеклу наносят надпись с указанием сокращенного наименования препарата (с сухим туберкулином — «ППД туберкулин для млекопитающих», с жидким туберкулином — «ППД туберкулин для млекопитающих, стандартный раствор») и номер серии.

1.3.3. Флаконы с туберкулином помещают в коробки с разделительными перегородками по ГОСТ 12301.

В коробку с сухим туберкулином устанавливают равное количество флаконов с растворителем микобактериальных аллергенов или к каждой коробке с сухим туберкулином прилагают коробку с таким же количеством флаконов, содержащих по 20 см^3 растворителя.

В каждую коробку с туберкулином вкладывают наставление по применению биопрепаратов. На коробку наклеивают или наносят этикетку, на которой указывают:

наименование предприятия-изготовителя и его товарный знак;
полное наименование препарата;
количество флаконов с туберкулином и растворителем;
количество доз препарата во флаконе;
количество МЕ во флаконе;
количество растворителя во флаконе;
номер серии туберкулина;
номер серии растворителя;
номер госконтроля туберкулина и растворителя;
условия хранения;
обозначение настоящего стандарта;
дату изготовления;
срок годности туберкулина.

1.3.4. Коробки с туберкулином и растворителем упаковывают в дощатые ящики по ГОСТ 10131, в ящики из листовых древесных материалов по ГОСТ 5959 массой брутто не более 15 кг, которые при соблюдении условий транспортирования должны обеспечивать сохранность и целостность флаконов с туберкулином.

Внутрь каждого ящика вкладывают контрольный лист с указанием наименования препарата и его количества, номер серии туберкулина и растворителя (для сухого туберкулина), даты упаковки, фамилии или номера упаковщика.

1.4. Маркировка

1.4.1. На каждое грузовое место наносят транспортную маркировку по ГОСТ 14192 с указанием манипуляционных знаков: «Хрупкое. Осторожно», «Беречь от влаги», «Соблюдение интервала температур» и предупредительную надпись «Биопрепараты».

Маркировка, характеризующая данные об упакованной продукции, должна содержать следующие обозначения:

наименование предприятия-изготовителя и его товарный знак;

наименование препарата;

количество доз препарата в ящике;

срок годности;

условия хранения;

обозначение настоящего стандарта;

массу брутто.

Совмещение транспортной маркировки и маркировки, характеризующей данные об упакованной продукции, на одной стороне транспортной тары не допускается.

2. ПРИЕМКА

2.1. Очищенный туберкулин для млекопитающих принимают сериями. Под серией понимают количество препарата, полученное в результате одноразового смешивания в одной емкости исходных материалов и специальной обработки их в одних производственных условиях, фасованное во флаконы, оформленное одним документом о качестве.

2.2. Каждая серия туберкулина должна быть принята на предприятии-изготовителе государственным контролером Всесоюзного государственного научно-контрольного института ветеринарных препаратов Госагропрома СССР.

2.3. Внешний вид препарата определяют по каждому флакону всей серии туберкулина.

2.4. Для контроля качества туберкулина от каждой серии отбирают 60 флаконов препарата. Флаконы отбирают произвольно из разных мест упаковочных единиц.

Флаконы сухого туберкулина отбирают вместе с прилагаемыми к ним флаконами растворителя.

2.5. Определение активности и реактогенности туберкулина на морских свинках проводят по каждой серии препарата, на крупном рогатом скоте — по каждой десятой серии.

Определение отсутствия сенсибилизирующих свойств туберкулина проводят на морских свинках по каждой десятой серии препарата.

2.6. При получении неудовлетворительных результатов испытаний хотя бы по одному из показателей по нему проводят повторные испытания на удвоенном количестве флаконов с препаратом.

Результаты повторных испытаний распространяют на всю серию.

При получении неудовлетворительных результатов повторной проверки испытуемую серию бракуют.

2.7. Контроль качества препарата по требованию потребителя проводит государственный контролер или Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов Госагропрома СССР.

3. МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ

3.1. Метод отбора проб

3.1.1. Из флаконов, отобранных по п. 2.4, 30 флаконов используют для испытаний, 30 оставляют в архиве государственного контролера.

3.2. Определение внешнего вида туберкулина проводят визуально.

3.3. Для проверки растворимости сухого туберкулина во флакон вливают растворитель из прилагаемого к туберкулину флакона. Содержимое флакона взбалтывают и просматривают в проходящем свете.

3.4. Однородность туберкулина в растворе устанавливают просмотром флакона с растворенным препаратом в проходящем свете.

3.5. Концентрацию водородных ионов (pH) определяют потенциометром pH-121 или другим прибором того же класса точности, предварительно растворив препарат сухого туберкулина, как указано в п. 3.3.

3.6. Определение массовой доли белка в туберкулине

3.6.1. Определение массовой доли белка в сухом туберкулине и количества белка в стандартном растворе туберкулина методом Кьельдаля

3.6.1.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Колба Кьельдаля вместимостью 50—100 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Аппарат перегонный Кьельдаля.

Холодильник.

Шкаф сушильный с температурой нагрева до 110 °С.

Весы аналитические не ниже 2-го класса точности.

Элемент нагрева (электроплитка).

Пипетки вместимостью 1, 2, 5 $см^3$ 2-го класса точности по НТД или дозаторы с той же вместимостью с погрешностью дозирования не более 5 %.

Бюретки вместимостью 25 и 50 $см^3$ 2-го класса точности по НТД.

Колбы Эрленмейера вместимостью 250 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Тигли фарфоровые вместимостью 2—5 $см^3$ по ГОСТ 9147.

Капельница.

Бумага лакмусовая.

Фильтры бумажные обеззоленные.

Кислота серная по ГОСТ 4204 концентрированная, плотностью 1,84 $г/см^3$ и раствор 0,05 $моль/дм^3$.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор с массовой долей 30 % — 33 % и раствор 0,1 $моль/дм^3$, приготовленный на кипяченой дистиллированной воде.

Водорода перекись по ГОСТ 10929.

Метиловый красный, раствор с массовой долей 0,2 %.

Синь метиленовая, раствор с массовой долей 0,1 %.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962*, раствор с массовой долей 70 %.

Метиловый оранжевый, раствор с массовой долей 0,1 %.

Кислота трихлоруксусная, растворы с массовой долей 5 % и 10 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечание. Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду или другие мерные средства измерений с аналогичными или лучшими метрологическими характеристиками.

3.6.1.2. Проведение испытания

В пробирку вносят 2 $см^3$ раствора туберкулина, приготовленного следующим образом. Содержимое пяти флаконов сухого туберкулина растворяют в 20 $см^3$ дистиллированной воды и объединяют. Содержимое пяти флаконов стандартного раствора туберкулина также объединяют.

В пробирку с 2 $см^3$ раствора туберкулина вносят 2 $см^3$ раствора трихлоруксусной кислоты с массовой долей 10 % и оставляют в холодильнике на 30 мин при температуре 4 °С — 6 °С для коагуляции белка и фильтруют через обеззоленный фильтр, смывая остатки белка из пробирки раствором трихлоруксусной кислоты с массовой долей 5 %. Белок на фильтре трижды промывают раствором трихлоруксусной кислоты с массовой долей 5 % для удаления остаточного азота. Фильтр с белком просушивают на воздухе, затем помещают в колбу Кьельдаля, прибавляют 2—5 $см^3$ концентрированной серной кислоты и минерализуют при нагревании.

Минерализацию проводят в присутствии катализатора — перекиси водорода, которую добавляют по 0,5 $см^3$ через каждые 15—20 мин до полного обесцвечивания раствора.

После охлаждения содержимое колбы переносят в колбу для отгона, остатки раствора смывают порциями дистиллированной воды общим объемом 10—12 $см^3$. Полноту переноса проверяют по индикатору метиловому оранжевому. Последняя проба промывных вод должна остаться желтой.

В колбу Эрлейнмейера наливают 20 $см^3$ раствора серной кислоты 0,05 $моль/дм^3$ и 10—15 капель индикатора Таширо. Индикатор Таширо готовят смешиванием в равных объемах спиртового раствора метилового красного с массовой долей 0,2 % и спиртового раствора метиленовой сини с массовой долей 0,1 %.

Отгонную колбу подсоединяют к холодильнику и парообразователю. Содержимое колбы нейтрализуют раствором гидроокиси натрия с массовой долей 30 % — 33 % по индикатору метиловому оранжевому. Затем содержимое отгоняют. Отгон аммиака проводят до тех пор, пока в приемной колбе соберется около 20 $см^3$ раствора. Окончание отгона проверяют по лакмусовой бумаге.

Содержимое приемной колбы титруют раствором гидроокиси натрия 0,1 $моль/дм^3$ до перехода окраски раствора от лилового к зеленому (индикатор — реактив Таширо).

Одновременно проводят определение массовой доли азота в обеззоленном фильтре.

3.6.1.3. Массовую концентрацию белка в испытуемой пробе туберкулина (X) в $мг/см^3$ вычисляют по формуле

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51652—2000 (здесь и далее).

$$X = \frac{(VK - V_1K_1) - (V_2K - V_3K) \cdot 1{,}4}{2} \cdot 6{,}25,$$

где V — объем 0,1 моль/дм^3 раствора серной кислоты, налитый в приемную колбу при анализе испытуемой пробы, см^3;

K — поправочный коэффициент к титру 0,1 моль/дм^3 раствора серной кислоты;

V_1 — объем 0,1 моль/дм^3 раствора гидроокиси натрия, израсходованный на титрование испытуемой пробы, см^3;

K_1 — поправочный коэффициент к титру 0,1 моль/дм^3 раствора гидроокиси натрия;

V_2 — объем 0,1 моль/дм^3 раствора серной кислоты, налитый в приемную колбу при анализе обеззоленного фильтра, см^3;

V_3 — объем 0,1 моль/дм^3 раствора гидроокиси натрия, израсходованный на титрование при анализе обеззоленного титра, см^3;

1,4 — масса азота, соответствующая 1 см^3 0,1 моль/дм^3 раствора серной кислоты, мг.

3.6.1.4. Для определения массовой доли белка в сухом туберкулине определяют массовую долю сухого вещества в препарате.

Для этого 1 см^3 раствора сухого туберкулина, взятого после растворения содержимого пяти флаконов туберкулина в 20 см^3 дистиллированной воды, вносят в предварительно прокаленные и охлажденные до 20 °С — 22 °С и взвешенные фарфоровые тигли. Тигли с туберкулином высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 105 °С — 110 °С. После охлаждения в эксикаторе тигли взвешивают. Массу сухого вещества туберкулина в 1 см^3 раствора определяют по разнице массы тигля с высушенным туберкулином и предварительно высушенного пустого тигля.

Массовую долю сухого вещества в туберкулине вычисляют по результатам трех параллельных определений.

3.6.1.5. Массовую долю белка в сухом туберкулине (X_1) в процентах вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{X \cdot 100}{m},$$

где X — массовая концентрация белка в испытуемой пробе, мг/см^3;

m — масса сухого вещества в 1 см^3 раствора туберкулина, мг.

3.6.2. Определение массовой доли белка в сухом туберкулине рефрактометрическим методом

3.6.2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Рефрактометр.

Пипетки мерные вместимостью 1 см^3 по НТД.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962, раствор с массовой долей 70 %.

Эфир медицинский.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

3.6.2.2. Проведение испытания

Содержимое пяти флаконов сухого туберкулина растворяют в 20 см^3 дистиллированной воды, объединяют, раствор наносят на нижнюю призму рефрактометра и определяют показатель преломления.

Массовую концентрацию белка в растворе определяют по табл. 2.

Таблица 2

Показатель преломления (ПД)	Массовая концентрация белка в растворе, мг/см^3	Показатель преломления (ПД)	Массовая концентрация белка в растворе, мг/см^3	Показатель преломления (ПД)	Массовая концентрация белка в растворе, мг/см^3
1,3330	H_2O	1,3336	3,21	1,3338	4,13
1,3335	2,75	1,3337	3,67	1,3339	4,59
				1,3340	5,05

3.6.2.3. Массовую долю белка в сухом туберкулине определяют по пп. 3.6.1.4 и 3.6.1.5.

3.7. Определение массовой доли хлористого натрия в стандартном растворе туберкулина

3.7.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Колбы по ГОСТ 1770.

Пипетки мерные 2-го класса точности по НТД.

Цилиндры мерные вместимостью 100 см^3 по ГОСТ 1770.

Бюретки вместимостью 50 см^3 2-го класса точности по НТД.

Калий хромовокислый по ГОСТ 4459, раствор с массовой долей 10 %.

Серебро азотнокислое по ГОСТ 1277, раствор 0,1 моль/дм^3.

3.7.2. Проведение испытания

10 см^3 стандартного раствора туберкулина разбавляют до 40 см^3 дистиллированной водой, приливают 5—10 капель раствора хромовокислого калия с массовой долей 10 % в качестве индикатора и титруют раствором азотнокислого серебра 0,1 моль/дм^3 до оранжево-красного окрашивания.

1 см^3 раствора азотнокислого серебра 0,1 моль/дм^3 соответствует 0,005845 г хлористого натрия.

3.7.3. Обработка результатов

Массовую долю хлористого натрия (X_2) в процентах вычисляют по формуле

$$X_2 = \frac{V_4 \cdot K_2 \cdot 0{,}5845}{10},$$

где V_4 — объем раствора азотнокислого серебра 0,1 моль/дм^3 израсходованный на титрование, см^3;

K_2 — поправочный коэффициент к титру 0,1 моль/дм^3 раствора азотнокислого серебра.

3.8. Определение массовой доли фенола в стандартном растворе туберкулина

3.8.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Колбы с притертой пробкой по ГОСТ 12738.

Пипетки мерные 2-го класса точности по НТД или дозаторы той же вместимости с погрешностью дозирования не более 5 %.

Бюретки вместимостью 50 см^3 2-го класса точности по НТД.

Калий бромноватокислый по ГОСТ 4457.

Калий бромистый по ГОСТ 4160, раствор 0,1 моль/дм^3.

Калий йодистый по ГОСТ 4232, раствор с массовой долей 20 %.

Кислота соляная по ГОСТ 14261, раствор с массовой долей 10 %.

Натрия гипосульфит по ГОСТ 244, раствор 0,05 моль/дм^3.

Крахмал (индикатор), раствор с массовой долей 1 %.

3.8.2. Подготовка к испытанию

Для приготовления 0,1 моль/дм^3 раствора бромата калия растворяют 2,7837 г чистого бромноватокислого калия, высушенного при температуре 110 °С до постоянной массы, 10 г бромистого калия в 1 дм^3 дистиллированной воды.

3.8.3. Проведение испытания

2 см^3 стандартного раствора туберкулина вносят в колбу с притертой пробкой, добавляют 2 см^3 раствора соляной кислоты с объемной долей 10 % и 25 см^3 0,1 моль/дм^3 раствора бромата калия. Сразу же начинают выделяться кристаллы трибромфенола. Реакция окисления фенола в трибромфенол продолжается при комнатной температуре в течение 15 мин. По истечении этого времени в колбу добавляют 4 см^3 раствора йодистого калия с массовой долей 20 %. Выделившийся йод оттитровывают 0,05 моль/дм^3 раствором гипосульфита натрия. Индикатором служит раствор крахмала с массовой долей 1 %.

1 см^3 раствора гипосульфита натрия 0,05 моль/дм^3 соответствует 0,001568 г фенола.

3.8.4. Обработка реультатов

Массовую долю фенола (X_3) в процентах вычисляют по формуле

$$X_3 = \frac{(25 \cdot K_3 - V_5 \cdot K_4) \cdot 0{,}1568}{2},$$

где K_3 — коэффициент поправки раствора бромата калия;

V_5 — объем раствора гипосульфита натрия, израсходованный на титрование, см^3;

K_4 — коэффициент поправки раствора гипосульфита.

3.9. Определение массовой доли глицерина в стандартном растворе туберкулина

3.9.1. Аппаратура и реактивы

Цилиндры мерные исполнений 1, 2, 3, 4 вместимостью 250—500 см^3 по ГОСТ 1770.

Ареометры.

Хлористый натрий по ГОСТ 4233, раствор с массовой долей 0,85 %.

3.9.2. Проведение испытания

С помощью ареометра определяют плотность стандартного раствора туберкулина и плотность физиологического раствора хлористого натрия с массовой долей 0,85 %.

Отсчет делений шкалы ареометра проводят по нижнему мениску жидкости в цилиндре.

3.9.3. Обработка результатов

Для определения массовой доли глицерина от величины плотности раствора туберкулина вычитают величину плотности физиологического раствора хлористого натрия.

По полученному результату плотности раствора глицерина с помощью табл. 3 определяют массовую долю глицерина.

Таблица 3

Плотность раствора глицерина, г/см^3	Массовая доля глицерина, %
1,0173	8,0
1,0197	9,0
1,0221	10,0
1,0246	11,0
1,0271	12,0

3.10. Определение стерильности

Стерильность туберкулина определяют высевом на питательные среды. Сухой туберкулин предварительно растворяют в стерильном физиологическом растворе, который вносят по 20 см^3 в каждый флакон с препаратом.

Для исследования используют смесь из трех флаконов туберкулина.

3.10.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Термостат с температурой нагрева 20 °С — 40 °С.

Автоклав.

Пипетки пастеровские.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 23932, ГОСТ 25336.

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.

Пробки ватно-марлевые.

Фильтры бумажные.

Пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805.

Агар пищевой по ГОСТ 16280.

Глицерин по ГОСТ 6259.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Масло вазелиновое по ГОСТ 3164.

Глюкоза по ГОСТ 6038.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

3.10.2. Подготовка к испытанию

Готовят мясопептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ) по ГОСТ 20730, мясопептонный печеночный бульон (МППБ) под вазелиновым маслом (среда Китт-Тароцци) и среду Сабуро в соответствии с рецептурой, утвержденной в установленном порядке.

Разливают мясопептонный бульон и мясопептонный печеночный бульон по 100 см^3 во флаконы, мясопептонный агар и среду Сабуро по 5—6 см^3 в пробирки, стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при 0,1 МПа.

3.10.3. Проводят высев по 1—1,5 см^3 раствора туберкулина в три флакона (пробирки) с каждой средой.

3.10.4. Обработка результатов

Посевы должны оставаться стерильными при выдерживании их в термостате в течение 10 сут при температуре 37 °С — 38 °С, на среде Сабуро — при 20 °С — 22 °С.

3.11. Определение реактогенности

3.11.1. Аппаратура и реактивы

Шприцы стеклянные с бегунком вместимостью 1—2 см^3 по ГОСТ 22967.

Иглы инъекционные исполнения № 0415 (для работы с морскими свинками).

Иглы с двойной трубкой из нержавеющей стали для туберкулинизации или исполнения № 0612.

Инъектор безыгольный БИ-7 (для применения у крупного рогатого скота).

Кутиметр.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962, раствор с массовой долей 17 %.

Туберкулин контрольной серии.

3.11.2. Проведение испытания

3.11.2.1. Испытание на морских свинках

У трех здоровых морских свинок-альбиносов или с белыми боками массой 400—500 г каждая выщипыванием (выбриванием) удаляют с боков волосяной покров.

Вводят внутрикожно с одной стороны тела препарат испытуемой серии в дозе 500 МЕ в объеме 0,1 см^3 растворителя, с другой — контрольную серию туберкулина в той же дозе.

В качестве контрольной серии очищенного туберкулина (ППД) для млекопитающих используют одну из серий, отвечающую требованиям настоящего стандарта и специально апробированную для этой цели Всесоюзным государственным научно-контрольным институтом ветпрепаратов Госагропрома СССР.

Через 24 ч на месте введения препарата воспалительная реакция должна отсутствовать. Допускается покраснение кожи в месте инъекции на участке диаметром не более 5 мм.

3.11.2.2. Испытание на крупном рогатом скоте

В благополучном по туберкулезу хозяйстве отбирают 10 голов здорового крупного рогатого скота, выстригают у них волосяной покров в средней части шеи слева и справа, дезинфицируют кожу в этом месте спиртом и вводят внутрикожно в подготовленные участки соответственно слева и справа по 10000 МЕ контрольной и испытуемой серии туберкулина в объеме 0,2 $см^3$ раствора.

Туберкулин считают не обладающим реактогенностью при отсутствии через 72 ч в месте введения препарата воспалительной реакции. Допускается проявление реакции у отдельных животных в том случае, если они реагируют в такой же степени на контрольную серию туберкулина. Животных используют не ранее чем через 30 сут после предыдущей туберкулинизации.

3.12. Определение отсутствия сенсибилизирующих свойств

3.12.1. Аппаратура и реактивы

Шприцы стеклянные с бегунком вместимостью 1 $см^3$ по ГОСТ 22967.

Иглы инъекционные исполнения № 0415.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962, раствор с массовой долей 70 %.

3.12.2. Проведение испытания

Берут шесть здоровых морских свинок массой 400—500 г каждая, не использованных ранее ни в каких опытах, и трем из них вводят внутрикожно трехкратно по 500 МЕ препарата в объеме 0,1 $см^3$ растворителя с интервалом в 5 сут. Всех свинок содержат вместе. Через 15 сут после последней инъекции туберкулина трем подопытным и трем контрольным свинкам вводят внутрикожно по 500 МЕ препарата в объеме 0,1 $см^3$ растворителя.

3.12.3. Обработка результатов

Реакцию учитывают через 24 ч после инъекции туберкулина. Сенсибилизирующие свойства отсутствуют, если реакция у морских свинок на введение препарата отсутствует.

3.13. Определение активности

Активность испытуемой серии препарата в международных туберкулиновых единицах (МЕ) устанавливают сравнением ее с контрольной серией туберкулина на сенсибилизированных морских свинках и на крупном рогатом скоте, больном туберкулезом.

3.13.1. Определение активности туберкулина на морских свинках

3.13.1.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Шприцы с бегунком вместимостью 1 $см^3$ по ГОСТ 22967.

Иглы инъекционные исполнения № 0415.

Пипетки мерные исполнений № 1, 2, 4, 5, 6 2-го класса точности по НТД.

Краска для метки.

Целлофан.

Вакцина БЦЖ.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962, раствор с массовой долей 70 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Туберкулин контрольной серии.

3.13.1.2. Подготовка к испытанию

Проведение сенсибилизации морских свинок.

Здоровым морским свинкам-альбиносам или с белыми боками массой не менее 400 г внутрикожно вводят 0,2 мг вакцины БЦЖ в объеме 0,1 $см^3$ стерильного физиологического раствора.

Морские свинки могут быть использованы через 30 сут после сенсибилизации. Животные могут быть использованы многократно с интервалом не менее 30 сут между исследованиями.

3.13.1.3. Приготовление разведений туберкулина

Готовят смесь из пяти флаконов с туберкулином испытуемой серии. Сухой туберкулин предварительно растворяют в прилагаемом к нему растворителе. 1 $см^3$ раствора туберкулина переносят в пробирку с 9 $см^3$ стерильного физиологического раствора и перемешивают.

Из пробирки 1 $см^3$ переносят во вторую пробирку с 4 $см^3$ физиологического раствора и таким образом получают 1-е разведение туберкулина. Из второй пробирки 1 $см^3$ раствора переносят в пробирку с 9 $см^3$ физиологического раствора и получают 2-е разведение туберкулина.

Таким же способом готовят разведения 3 и 4 контрольной серии туберкулина, содержащие в 1 см^3 1000 и 100 МЕ.

Для приготовления разведений контрольной серии туберкулина используют три флакона с сухим туберкулином, содержимое которых растворяют в растворителе микобактериальных аллергенов с таким расчетом, чтобы в 1 см^3 содержалось 50000 МЕ.

3.13.1.4. Проведение испытания

Перед проведением испытания волосяной покров на боках морских свинок удаляют выщипыванием или выбриванием. Приготовленные разведения препаратов вводят внутрикожно каждой морской свинке в депилированные участки кожи в дозе 0,1 см^3 по два разведения с каждой стороны тела в условные точки инъекции *а*, *б*, *в*, *г*. Расстояние между этими точками с одной стороны тела должно быть не менее 40 мм.

Каждое разведение туберкулина вводят отдельным шприцем, имеющим номер, соответствующий номеру разведения препарата. Шприцы с набранными растворами раскладывают на крышке стерилизатора в порядке их нумерации (1, 2, 3, 4). Иглу вводят в складку кожи свинки, зажатую между большим и указательным пальцами, параллельно поверхности кожи с таким расчетом, чтобы не менее 3 мм иглы было введено в кожу, затем складку отпускают и нажимом на поршень медленно вводят точно 0,1 см^3 раствора. В месте введения должна образоваться выпуклость величиной с горошину. Для предупреждения вытекания капель раствора иглу после введения дозы задерживают на мгновение в коже и затем извлекают.

После инъекции первой свинке разведения 1 шприц с этим разведением перекладывают в конец ряда, за шприц № 4, остальные шприцы после введения разведений препарата кладут на прежнее место.

При инъекциях второй свинке начинают со шприца № 2 и затем перекладывают его направо, за шприц № 1, остальные шприцы после введения препарата кладут на прежнее место.

Таким образом, условный номер каждой свинки соответствует номеру разведения, которое вводится этой свинке первым в условную точку инъекции.

Каждую свинку после инъекции ей разведений туберкулина метят несмываемой краской. Животных, которым разведения туберкулина вводят в одном порядке, метят одной меткой.

Порядок инъекции разведений и метки свинок указан в приложении 1.

3.13.1.5. Обработка результатов

Интенсивность реакции учитывают через 24 ч после введения препаратов измерением диаметра папулы, образующейся в месте инъекции туберкулина. Для этого намечают чернилами контур папулы, затем на бок животного накладывают лист целлофана и перерисовывают на него эти контуры с обозначением точек инъекции *а*, *б*, *в*, *г*.

На лист целлофана перерисовывают контуры папул всех морских свинок группы с обозначением условного номера каждого животного. Затем лист подписывают лица, проводившие испытания туберкулина, указывают дату учета реакции, номер серии туберкулина. Этот лист целлофана подшивают в журнал учета активности туберкулина.

Для определения активности туберкулина лист целлофана накладывают на миллиметровую бумагу, устанавливают значение поперечного и продольного диаметров каждой папулы, вычисляют их среднюю величину и результаты заносят в таблицу (см. приложение 2).

При обработке результатов испытания учитывают только свинок, реагирующих на все разведения туберкулина. Для определения активности препарата количество морских свинок, реагирующих на все разведения туберкулина, должно быть не менее десяти.

Активность туберкулина (*А*) в Международных единицах (МЕ) вычисляют по формуле

$$A = \frac{d_1}{d_2} \cdot 50000,$$

где d_1 — сумма средних диаметров папул на испытуемую серию, мм;

d_2 — сумма средних диаметров папул на контрольную серию туберкулина, мм;

50000 — содержание МЕ в 1 см^3 основного раствора контрольной серии туберкулина.

3.13.2. Определение активности туберкулина на крупном рогатом скоте

Активность туберкулина устанавливают сравнением с контрольной серией препарата на больном туберкулезом крупном рогатом скоте.

3.13.2.1. Аппаратура, реактивы и материалы

Шприцы с бегунком вместимостью 1—2 см^3 по ГОСТ 22967.

Иглы инъекционные с двойной трубкой из нержавеющей стали для туберкулинизации или исполнения № 0612.

Инъекторы безыгольные БИ-7.

Кутиметр.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962, раствор с массовой долей 70 %.

Тампоны ватные.

Туберкулин контрольной серии.

3.13.2.2. Подготовка к испытанию

У 10—15 больных туберкулезом животных выстригают шерсть в средней части шеи слева и справа на участке величиной 5 × 5 см или крестообразно и спиртом дезинфицируют кожу в этом месте.

Сухой туберкулин испытуемой и контрольной серий непосредственно перед применением растворяют в прилагаемом к ним растворителе.

3.13.2.3. Проведение испытания

Животным вводят внутрикожно в депилированные участки кожи соответственно слева и справа по 0,2 $см^3$ испытуемой и контрольной серий туберкулина. Реакцию учитывают через 72 ч и оценивают по степени утолщения кожной складки в месте введения туберкулина в миллиметрах с помощью кутиметра. Полученные результаты заносят в ведомость (см. приложение 3).

3.13.2.4. Обработка результатов

Различия в интенсивности реакции на испытуемую и контрольную серии туберкулина определяют с помощью таблицы (см. приложение 4).

Испытуемую серию считают активной, если нет различия в интенсивности вызываемых туберкулинами реакций или оно статистически недостоверно.

4. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

4.1. Транспортируют туберкулин транспортом всех видов в соответствии с правилами перевозок скоропортящихся грузов и багажа, действующими на транспорте данного вида.

При транспортировании препарата в районы Крайнего Севера и приравненные к ним местности тара должна соответствовать ГОСТ 15846.

4.2. Туберкулин должен храниться в упаковке изготовителя в закрытых сухих и чистых складских помещениях при температуре 2 °С — 8 °С.

5. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

5.1. Изготовитель гарантирует соответствие очищенного туберкулина (ППД) для млекопитающих требованиям настоящего стандарта при соблюдении потребителем условий транспортирования и хранения.

5.2. Гарантийный срок хранения туберкулина — 3 года со дня изготовления.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
Обязательное

Порядок маркировки и введения туберкулина морским свинкам

Условный номер свинки	Место метки	Разведения туберкулина, вводимые в условные точки инъекции			
		слева от головы		справа от головы	
		а	*б*	*в*	*г*
1	Метка не наносится	1	2	3	4
2	Голова	2	3	4	1
3	Спина	3	4	1	2
4	Крестец	4	1	2	3
5	Метка не наносится	1	2	3	4
6	Голова	2	3	4	1
7	Спина	3	4	1	2
8	Крестец	4	1	2	3
9	Метка не наносится	1	2	3	4
10	Голова	2	3	4	1

ПРИЛОЖЕНИЕ 2
Обязательное

Определение активности туберкулина на морских свинках

Условный номер свинки разведения	Интенсивность реакции на введение разведений туберкулина			
	1	2	3	4
1	20,5	8,0	20,0	10,5
2	24,0	7,5	22,5	11,5
3	15,5	9,0	16,0	7,5
4	17,0	10,0	21,5	13,0
5	20,0	11,5	18,0	10,0
6	18,5	9,0	14,0	8,5
7	21,0	11,0	22,5	10,9
8	25,5	11,0	27,5	11,0
9	20,5	10,0	19,5	13,0
Итого:	182,5	87,0	181,5	95,0

Вычисляют сумму средних диаметров папул на испытуемую серию туберкулина (d_1) и сумму средних диаметров папул на контрольную серию туберкулина (d_2):

$$d_1 = 182{,}5 + 87{,}0 = 269{,}5;$$
$$d_2 = 181{,}5 + 95{,}0 = 276{,}5.$$

Активность испытуемой серии туберкулина

$$A = \frac{269{,}5}{276{,}5} \times 50000 = 48734 \approx 49000 \text{ МЕ/мг},$$

где 50000 — содержание МЕ в 1 $см^3$ основного раствора контрольной серии туберкулина.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
Обязательное

Ведомость проверки активности туберкулина на крупном рогатом скоте

Номер животного (кличка животного)	Утолщение кожной складки, мм		Наличие большей (+), меньшей (—) или одинаковой (=) реакции на испытуемую и контрольную серию
	контрольной серии	испытуемой серии	
1	10	9	—
2	7	8	+
3	6	6	=
4	9	8	—
5	9	11	+
6	10	9	—
7	7	7	=
8	6	3	—
9	3	3	=
10	7	6	—
11	3	3	=
12	8	8	=
13	10	3	—
14	3	5	+
15	0	4	+
16	4	0	—
17	6	10	+

ПРИЛОЖЕНИЕ 4
Обязательное

Таблица определения достоверности различия в активности контрольной и испытуемой серии туберкулина

Количество животных с различными по интенсивности реакциями на испытуемую и контрольную серии туберкулина	Минимальное количество животных с большей (+) или меньшей (—) интенсивностью реакции на испытуемую серию, при которой отличие от контроля достоверно с вероятностью от 95 % до 97,5 %	Количество животных с различными по интенсивности реакциями на испытуемую и контрольную серии туберкулина	Минимальное количество животных с большей (+) или меньшей (—) интенсивностью реакции на испытуемую серию, при которой отличие от контроля достоверно с вероятностью от 95 % до 97,5 %
6	6	14	12
7	7	15	12
8	8	16	13
9	8	17	13
10	9	18	14
11	10	19	15
12	10	20	15
13	11		

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Госагропромом СССР**

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 08.07.88 № 2643**

3. **ВЗАМЕН ГОСТ 16739—71**

4. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта, подпункта
ГОСТ 244—76	3.8.1
ГОСТ 1277—75	3.7.1
ГОСТ 1770—74	3.7.1; 3.9.1
ГОСТ 3164—78	3.10.1
ГОСТ 4160—74	3.8.1
ГОСТ 4204—77	3.6.1.1
ГОСТ 4232—74	3.8.1
ГОСТ 4233—77	3.9.1; 3.10.1; 3.13.1.1
ГОСТ 4328—77	3.6.1.1
ГОСТ 4457—74	3.8.1
ГОСТ 4459—75	3.7.1
ГОСТ 5556—81	3.6.2.1
ГОСТ 5959—80	1.3.4
ГОСТ 5962—67	3.6.1.1; 3.6.2.1; 3.11.1; 3.12.1; 3.13.1.1; 3.13.2.1
ГОСТ 6038—79	3.10.1
ГОСТ 6259—75	3.10.1
ГОСТ 6709—72	3.6.1.1; 3.6.2.1; 3.10.1; 3.13.1.1
ГОСТ 9147—80	3.6.1.1
ГОСТ 10131—93	1.3.4
ГОСТ 10929—76	3.6.1.1
ГОСТ 12301—81	1.3.3
ГОСТ 12738—77	3.8.1
ГОСТ 13805—76	3.10.1
ГОСТ 14192—96	1.4.1
ГОСТ 14261—77	3.8.1
ГОСТ 15846—2002	4.1
ГОСТ 16280—2002	3.10.1
ГОСТ 20730—75	3.10.2
ГОСТ 22967—90	3.11.1; 3.12.1; 3.13.1.1; 3.13.2.1
ГОСТ 23932—90	3.10.1
ГОСТ 25336—82	3.6.1.1; 3.10.1

5. **Ограничение срока действия снято по протоколу № 3—93 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 5-6—93)**

6. **ПЕРЕИЗДАНИЕ. Август 2006 г.**

Редактор *М.И. Максимова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.Е. Нестерова*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 31.07.2006. Подписано в печать 26.09.2006. Формат 60 × 84 $^1/_8$. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,55. Тираж 30 экз. Зак. 235. С 3302.

ФГУП «Стандартинформ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано и отпечатано во ФГУП «Стандартинформ»

gost.e-ecolog.ru