ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

АНТИГЕН И АНТИСЫВОРОТКА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОШАДЕЙ

ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ И МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ

ГОСТ 27145—86
(СТ СЭВ 5156—85)

Издание официальное

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 616—097:619:006.354 Группа Р31

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

АНТИГЕН И АНТИСЫВОРОТКА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОШАДЕЙ

Технические требования и методы испытаний

Antigen and antiserum for diagnosis of equine infectious anaemia. Technical requirements and test methods

ОКСТУ 9382

ГОСТ 27145—86

(СТ СЭВ 5156—85)

Срок действия с 01.01.87 до 01.01.92

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на антиген и антисыворотку, предназначенные для диагностики инфекционной анемии лошадей (ИНАН) с помощью реакции диффузионной преципитации в агаровом геле (РДП).

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 5156—85.

1. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

1.1. Антиген и антисыворотка по физико-химическим и биологическим свойствам должны соответствовать характеристикам и нормам, указанным в таблице.

Наименование показателя	Характеристика и норма
1. Внешний вид	Сухая однородная пористая масса
2. Цвет	
антигена	От светло-желтого до темно-коричневого
антисыворотки	Светло-серая, иногда с розовым оттенком
3. Наличие посторонней примеси, плесени, изменение консистенции, трещин ампул	Не допускается
4. Наличие вакуума в ампулах	Наличие фиолетово-синего свечения, сопровождающегося характерным потрескиванием при испытании
5 Растворимость	Содержимое ампул должно полностью раствориться в течение 2—3 мин в стерильной деионизированной воде
6. Массовая доля влаги, %	1—3

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1987

Продолжение

Наименование показателя	Характеристика и норма
7. Контаминация бактериальной и грибковой микрофлорой	В посевах из диагностикумов на питательные среды не должно быть роста микрофлоры в течение 10 дней при температуре (37±0,5)°С и на агаре Сабуро при температуре (22±2)°С
8. Активность антигена в РДП	Антиген должен давать четкие полосы преципитации с неразведенной и разведенной 1 : 2 положительной сывороткой через 24—48 ч после постановки реакции
9. Активность антисыворотки в РДП	Антисыворотка в разведении 1 : 2 должна давать четкие полосы преципитации с известным антигеном через 24—48 ч после постановки реакции
10. Специфичность антигена в РДП	Антиген не должен давать полосы преципитации с отрицательными сыворотками
11. Специфичность антисыворотки в РДП	Антисыворотка должна давать четкую реакцию со специфическим антигеном и не давать полосы преципитации с контрольным отрицательным антигеном
12. Чувствительность тест-системы антиген-антисыворотка в РДП	Со стандартной слабоположительной сывороткой должна наблюдаться слабоположительная реакция
13. Полнота инактивации антигена и антисыворотки	Не допускается наличие вирулентного вируса ИНАН

2. МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ

2.1. Отбор проб

2.1.1. Для проведения испытания от каждой серии отбирают 26 ампул. Половину ампул используют для анализа, а половину хранят в архиве государственного контролера в течение 18 мес.

2.1.2. Ампулы, предназначенные для хранения, сопровождают документом с указанием:

наименования препарата;
даты изготовления;
номера серии;
номера контроля;
даты отбора проб;
общего количества упаковочных единиц;
объема серии;
обозначения настоящего стандарта;
должности и подписи лица, отобравшего пробу.

2.2. Определение внешнего вида, цвета и наличия посторонних примесей

Для определения внешнего вида, цвета, наличия посторонней примеси, плесени, изменения консистенции и трещин ампул, каждую ампулу просматривают при дневном свете.

2.3. Определение вакуума

Наличие вакуума в ампулах определяют аппаратом Д'Арсонваль или другим аппаратом.

2.4. Определение растворимости

Сущность метода заключается в определении времени, достаточного для полного растворения сухого диагностикума в растворителе.

2.4.1. *Аппаратура и материалы*

Для проведения испытания применяют:

пипетки мерные по ГОСТ 20292—74;

воду деионизированную.

2.4.2. *Проведение испытания*

Для проведения испытания в три ампулы с препаратом добавляют деионизированную воду в объеме, равном объему препарата до сушки.

2.4.3. *Обработка результатов*

Содержимое ампулы должно полностью раствориться в течение 2—3 мин без образования хлопьев и осадка.

2.5. Определение массовой доли влаги — по ГОСТ 24061—80.

2.6. Определение контаминации бактериальной и грибковой микрофлорой

Сущность метода заключается в определении роста бактериальной и грибковой флоры в посевах из проб диагностикумов на питательных средах.

2.6.1. *Аппаратура и материалы*

Для проведения испытаний применяют:

термостаты с температурой нагрева (22±2)°С и (37±0,5)°С;

пипетки мерные вместимостью 1,2 и 5 $см^3$ ГОСТ 20292—74;

флаконы стеклянные вместимостью 100 $см^3$;

бульон мясо-пептонный (МПБ) по ГОСТ 20730—75;

агар мясо-пептонный (МПА);

пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805—76;

агар микробиологический по ГОСТ 17206—84;

масло вазелиновое по ГОСТ 3164—78;

раствор физиологический;

бульон мясо-пептонный печеночный (МППБ) под вазелиновым маслом;

агар Сабуро.

2.6.2. *Проведение испытания*

Для проведения испытания используют по три ампулы каждого диагностикума. Содержимое каждой ампулы растворяют в 4 $см^3$ стерильного физиологического раствора.

Испытание проводят путем посева из каждой ампулы по 0,2 $см^3$ диагностикума в две пробирки с МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом, агаром Сабуро и по 0,5—1 $см^3$ в два флакона с МПБ и МППБ под вазелиновым маслом. Питательные среды

с посевами выдерживают в течение 10 дней при температуре (37±0,5)°С, для агара Сабуро — (22±2)°С.

2.7. Определение активности

Сущность метода заключается в выявлении с помощью реакции диффузионной преципитации в агаровом геле вирусспецифических антител в сыворотке с положительным антигеном.

2.7.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Для проведения испытания применяют:
установку вакуумную;
источник света точечного или щелевого потока светового луча;
пробойник металлический диаметром 7 мм;
иглы;
пинцеты;
канюля;
чашки Петри диаметром 9—10 см;
пипетки пастеровские;
пипетки градуированные вместимостью 5—10 см³ по ГОСТ 20292—74;
микропипетки;
фильтры бумажные;
антиген преципитирующий;
антиген отрицательный контрольный;
сыворотку положительную преципитирующую;
сыворотку слабоположительную преципитирующую;
сыворотки испытуемые;
10 заведомо отрицательных сывороток лошадей;
10 заведомо положительных сывороток лошадей;
агар очищенный;
натрия гидрат окиси по ГОСТ 4328—77;
кислоту борную по ГОСТ 9656—75;
воду деионизированную;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

2.7.2. *Подготовка к испытанию*

2.7.2.1. Приготовление боратного буфера pH 8,6

смешивают 2 г гидроокиси натрия и 9—11 г борной кислоты, доводят объем дистиллированной водой до 1000 см³ и фильтруют через бумажный фильтр.

2.7.2.2. Сухие пробы испытуемых антисывороток и антигена растворяют дистиллированной водой в объеме, равном объему диагностикумов до сушки. Готовят разведение сывороток на боратном буфере 1 : 2.

Сыворотки испытывают неразведенными и в разведении 1 : 2, а антиген испытывают в цельном виде.

2.7.2.3. Приготовление агарового геля

1%-ный и 2%-ный агар готовят на боратном буфере путем кипячения или автоклавирования (без давления) до полного расплавления агара.

2.7.2.4. В чашку Петри сначала вносят 5 см³ горячего 2%-ного агара и дают ему застыть. Затем, не сдвигая чашек с места, во избежание неравномерного распределения агара, вносят 15 см³ охлажденного до 60°С 1%-ного агара. При использовании пластмассовых чашек Петри применяют 0,7%-ный агар в одном слое. После застывания среды приступают к вырезанию лунок. Лунки вырезают только в слое 1%-ного (верхний слой) агара металлическим пробойником.

2.7.3. *Проведение испытания*

Испытание проводят по одной из двух схем постановки реакции

Первая схема

Диаметр лунок	— 7 мм
Расстояние от центральной лунки	— 3 мм
Расположение лунок	— 1 лунка в центре, другие 6 лунок — по окружности
Компоненты реакции	— центральная лунка — антиген; 3 периферические через одну — антисыворотки; 3 свободных — испытуемые сыворотки
Объем компонентов реакции	— 0,05—0,06 см³
Время реакции во влажной камере при (18—25)°С	— 48 ч

В одной чашке Петри испытывают 12 проб сыворотки.

Вторая схема

Диаметр лунок	— 7 мм
Расстояние от центральной лунки	— 3 мм
Расположение лунок	— 1 лунка в центре, другие 6 лунок — по окружности
Компоненты реакции	— центральная лунка — антиген; две периферические, диаметрально расположенные лунки — контрольная положительная сыворотка; оставшиеся четыре — испытуемые сыворотки
Объем компонентов реакции	— 0,05—0,06 см³
Время реакции во влажной камере при 18—25°С	— 48 ч

В одной чашке Петри испытывают 16 проб сыворотки.

Результаты испытания учитывают через 24 и 48 ч.

Оценку реакции в чашках Петри проводят в проходящем пучке света на темном фоне.

Реакцию учитывают по контрольной линии преципитации, но если она отсутствует или слабо выражена, испытание повторяют.

Контрольные линии преципитации должны быть четкими, расположенными посередине между лунками с антигеном и положительной сывороткой.

При образовании интенсивного ореола вокруг лунок, затрудняющего учет реакции, пробы сыворотки исследуют повторно, добавив к агару 5% хлористого натрия (к 100 см³ буфера добавляют 5 г химически чистого хлористого натрия).

2.7.4. *Обработка результатов*

Реакция отрицательная — контрольные линии продолжаются в сторону лунки с испытуемой сывороткой без изгибов или с небольшим изгибом. Полоса преципитации с испытуемой сывороткой не образуется.

Реакция положительная:

а) между лункой с испытуемой сывороткой и антигеном образуется полоса преципитации, которая соединяется с контрольной линией;

б) линия преципитации отсутствует, но контрольные линии образуют вблизи с испытуемой сывороткой изгиб, направленный в сторону антигена — слабоположительная сыворотка;

в) контрольные линии укорачиваются со стороны лунки с испытуемой сывороткой, в отдельных случаях контрольные линии полностью растворяются, что свидетельствует о высоком титре антигена.

Более четкие линии преципитации будут образовываться, если эти пробы развести 1 : 4 или 1 : 8 и повторить реакцию.

Реакция сомнительная — слабый изгиб контрольной линии плохо просматривается; образуются интенсивные неспецифические линии или ореол вокруг лунки, что затрудняет учет реакции.

Реакция неспецифическая образуется с некоторыми пробами сывороток, особенно полученных от старых лошадей. Признаками неспецифической реакции является перекрещивание линий преципитации, в той же пробе сыворотки могут быть специфические и неспецифические антитела.

2.8. Определение специфичности

Сущность метода заключается в определении взаимодействия антигена и антисыворотки каждой тест-системы с десятью заведомо отрицательными сыворотками и контрольного антигена с антисыворотками в РДП.

2.8.1. Аппаратура, материалы и реактивы — по п. 2.7.1.

2.8.2. Подготовка и проведение испытания — по пп. 2.7.2 и 2.7.3.

2.8.3. *Обработка результатов*

Каждая тест-система антиген-антисыворотка должна давать специфическую реакцию с 10 заведомо положительными сыворотками и не давать реакции с 10 заведомо отрицательными сыворотками. Антисыворотки не должны давать специфическую реакцию с контрольным отрицательным антигеном.

2.9. Определение чувствительности тест-системы антиген-антисыворотка

Сущность метода заключается в определении чувствительности составляемой тест-системы антиген-антисыворотка в РДП со стандартной слабоположительной сывороткой и положительной преципитирующей сывороткой.

2.9.1. *Проведение испытания*

Постановка реакции диффузионной преципитации — по п. 2.7.3.

2.9.2. *Обработка результатов*

Должна наблюдаться слабоположительная реакция с отклонением контрольной линии преципитации у лунки со слабоположительной сывороткой в ее сторону.

2.10. Определение полноты инактивации

Сущность метода заключается в постановке биопробы, после которой у животных не должны проявляться признаки, указывающие на наличие вирулентного вируса: клинические, гематологические, серологические, характерные для инфекционной анемии. Проверяют каждую серию антигена и антисыворотки.

2.10.1. *Материалы и реактивы*

Для проведения испытания применяют:

шприцы с иглами;

антиген и антисыворотки;

физиологический раствор.

2.10.2. *Подготовка к испытанию*

Отбирают клинически здоровых жеребят в возрасте 8—10 мес, проверенных на отсутствие инфекционных, кровепаразитарных и инвазионных болезней, согласно действующим инструкциям. Во время отбора животных проводят клинико-гематологические и серологические обследования с целью исключения инфекционной анемии.

Отобранных животных выдерживают в карантине в течение 30 дней и сыворотки их крови повторно исследуют на инфекционную анемию.

2.10.3. *Проведение испытания*

Двум здоровым жеребятам с соблюдением правил асептики вводят подкожно в нижнюю треть шеи по 1—3 $см^3$ антигена (одной серии) и антисыворотки (одной или нескольких серий). За животными ведут наблюдение в течение 2 мес. В течение этого срока еженедельно проводят клинические и гематологические ис-

следования. По окончании срока наблюдения проводят паталого-анатомические и серологические исследования.

2.10.4. *Обработка результатов*

Заключение о положительных или отрицательных результатах биопробы делают по данным анализов.

3. ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЯ

Для каждой проверенной серии препарата составляют протокол испытания, который должен содержать следующие данные:

наименование штамма ИНАН;

использованный метод;

результат испытания показателей качества;

дату изготовления;

подпись лица, проводившего испытание;

обозначение настоящего стандарта.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Госагропромом СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

Г. Ф. Коромыслов, д-р биол. наук; **Ю. А. Малахов**, д-р вет. наук; **К. П. Юров**, д-р вет. наук; **Б. И. Токарик**, канд. вет. наук; **В. В. Гуненков**, д-р биол. наук; **О. И. Шарабрин**, канд. биол. наук

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 11 декабря 1986 г. № 3760

3. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

4. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта, подпункта, перечисления, приложения
ГОСТ 3164—78	2.6.1.
ГОСТ 4328—78	2.7.1
ГОСТ 6709—72	2.7.1
ГОСТ 9656—75	2.7.1
ГОСТ 13805—76	2.6.1
ГОСТ 17206—84	2.6.1
ГОСТ 20730—75	2.6.1
ГОСТ 20292—74	2.4.1; 2.6.1; 2.7.1
ГОСТ 24061—80	2.5

Редактор *Т. П. Шашина*
Технический редактор *М. И. Максимова*
Корректор *И. Л. Асауленко*

Сдано в наб. 30.12.86 Подп. в печ. 24.02.87 0,75 усл. п. л. 0,75 усл. кр.-отт. 0,57 уч.-изд. л.
Тир. 8000 Цена 3 коп.

gost.e-ecolog.ru

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