МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

СЫВОРОТКА ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ ДЛЯ РЕАКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

Издание официальное

БЗ 1—99

ИПК ИЗДАТЕЛЬСТВО СТАНДАРТОВ
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 612.398.12:619:006.354 Группа Р31

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

СЫВОРОТКА ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ ДЛЯ РЕАКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

Технические условия

ГОСТ 16445—78

Haemolytic serum for the compliment fixation test.
Specifications

Дата введения 01.01.79

Настоящий стандарт распространяется на гемолитическую сыворотку (гемолизин), представляющую собой консервированную глицерином сыворотку крови кролика, иммунизированного эритроцитами барана.

Гемолитическая сыворотка предназначена для применения в качестве компонента реакции связывания комплемента (РСК) в ветеринарии.

1. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

1.1. Гемолитическую сыворотку (гемолизин) готовят в соответствии с требованиями настоящего стандарта по технологическим правилам, утвержденным в установленном порядке.

1.2. По физико-химическим и биологическим свойствам гемолитическая сыворотка должна соответствовать требованиям и нормам, указанным в табл. 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Характеристика и норма
Внешний вид	Прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость желтовато-розового цвета, без плесени, хлопьев, осадка и посторонней примеси. Допускается образование на поверхности сыворотки пристеночного белого кольца
Массовая доля глицерина, %	50±5
Стерильность	Посевы на питательные среды не должны давать роста бактериальной микрофлоры и грибов в течение десятисуточного выдерживания в термостате при температуре 37—38 °С
Безвредность	Не должна вызывать гемолиза эритроцитов барана
Активность (титр), не ниже	1:1000

2. ПРАВИЛА ПРИЕМКИ

2.1. Гемолитическую сыворотку принимают сериями. Под серией гемолитической сыворотки следует понимать определенное количество препарата, изготовленное в процессе одноразового (одновременного) смешивания в одной емкости исходного сырья и специальной обработки его в одних производственных условиях, фасованное в течение одного рабочего дня, получившее свой номер и оформленное одним документом о качестве.

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

(Измененная редакция, Изм. № 1).

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1978
© ИПК Издательство стандартов, 1999
Переиздание с Изменениями

2.3. Для контроля качества гемолитической сыворотки от каждой серии отбирают 20 ампул.

2.4. При получении неудовлетворительных результатов хотя бы по одному из показателей по нему проводят повторные испытания на удвоенном количестве ампул, отобранных от той же серии гемолитической сыворотки.

Результаты повторных испытаний распространяют на всю серию.

2.5. Контроль качества определенной серии гемолитической сыворотки по требованию потребителя проводит государственный контролер на предприятии-изготовителе или Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов Госагропрома.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

3. МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ

3.1. Метод отбора проб

3.1.1. Ампулы отбирают из разных мест упаковочных единиц. 10 ампул используют для анализа, а 10 оставляют в архиве государственного контролера.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

3.2. Для определения внешнего вида, наличия или отсутствия посторонней примеси, плесени, хлопьев и осадка ампулы с гемолитической сывороткой встряхивают и просматривают в проходящем свете.

3.3. Определение массовой доли глицерина

Массовую долю глицерина в гемолитической сыворотке в процентах устанавливают по плотности сыворотки, соответствующей определенной плотности раствора глицерина.

3.3.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Для проведения испытания применяют:

пикнометр вместимостью 1—2 $см^3$ по ГОСТ 22524;

баню водяную или термостат;

термометр технический стеклянный ртутный со шкалой от 0 до 100 °С по ГОСТ 28498;

весы лабораторные аналитические с разновесом;

эксикатор по ГОСТ 25336;

пипетки для отбора жидкости по ГОСТ 29227;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709, кипяченую или бидистиллированную.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

3.3.2. *Подготовка к испытанию*

Пикнометр тщательно очищают хромовой смесью, промывают водой, ополаскивают спиртом, затем эфиром, высушивают продуванием воздуха или в сушильном шкафу и охлаждают в эксикаторе.

3.3.3. *Проведение испытания*

Пикнометр взвешивают на аналитических весах с погрешностью не более 0,0002 г. Наполняют его дистиллированной водой до метки, выдерживают на водяной бане или в термостате при 20 °С в течение 20—30 мин и вновь корректируют заполнение водой до метки. Затем пикнометр обтирают и взвешивают на аналитических весах. Освобождают пикнометр от воды, сушат, как указано выше, и заполняют испытуемой гемолитической сывороткой. Дальнейшие операции проводят так же, как при определении массы воды.

3.3.4. *Обработка результатов*

Плотность гемолитической сыворотки (d), содержащей глицерин, в $г/см^3$, вычисляют по формуле

$$d = \frac{m}{m_1},$$

где m — масса пробы сыворотки в объеме пикнометра, г;

m_1 — масса пробы воды в объеме пикнометра, г.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,0008 $г/см^3$.

Плотность гемолитической сыворотки (d) должна составлять 1,115—1,145 $г/см^3$, что соответствует 45—55 % массовой доли глицерина в сыворотке.

3.4. Определение стерильности

3.4.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Для проведения испытания применяют:
термостат с температурой нагрева 37—38 °С;
автоклав;
пипетки вместимостью 10 $см^3$;
пипетки пастеровские;
пробирки стеклянные по ГОСТ 25336;
воронки стеклянные;
пробки ватно-марлевые;
фильтры бумажные;
пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805;
агар микробиологический по ГОСТ 17206;
вазелин медицинский по ГОСТ 3582.

3.4.2. *Подготовка к испытанию*

Готовят в соответствии с действующей рецептурой мясопептонный бульон (МПБ), отвечающий требованиям ГОСТ 20730, мясопептонный агар (МПА) и мясопептонно-печеночный бульон (МППБ) под вазелиновым маслом и среду Сабуро. Среды разливают по 8—10 $см^3$ в пробирки, закрывают ватно-марлевыми пробками и пергаментными колпачками и стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при 0,15 МПа.

3.4.1, 3.4.2. **(Измененная редакция, Изм. 1).**

3.4.3. *Проведение испытания*

Посев производят из трех ампул, используя по две пробирки каждой среды на одну ампулу гемолизина. Для этого содержимое ампулы над пламенем горелки предварительно вносят в пробирку с мясопептонным бульоном, тщательно перемешивают и затем рассевают по остальным пробиркам со средами. Посевы на МПБ, МПА, МППБ выдерживают в термостате при 37—38 °С, а на среде Сабуро — при 20—22 °С в течение 10 сут.

3.4.4. *Обработка результатов*

Среды в пробирках должны оставаться стерильными.

3.5. Определение активности (титра) и безвредности

Активность гемолитической сыворотки определяют по 100 %-ному гемолизу эритроцитов барана в гемолитической системе. Титрация гемолизина производится комплементом с титром 0,19—0,25 по ГОСТ 16446 в гемолитической системе.

Под титром гемолитической сыворотки следует понимать наименьшее количество его (наибольшее разведение), при котором в течение 10 мин при 37—38 °С наступает полный (100 %-ный) гемолиз 0,5 $см^3$ 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана в присутствии 0,5 $см^3$ комплемента в разведении 1:20 в общем объеме жидкости 2,5 $см^3$.

Безвредность гемолитической сыворотки характеризуется полным отсутствием гемолиза эритроцитов барана в пробирке без комплемента.

3.5.1. *Оборудование и реактивы*

Для проведения испытания применяют:
штативы;
пробирки стеклянные по ГОСТ 25336;
стаканы лабораторные, колбы по ГОСТ 25336;
колбы мерные вместимостью 100, 500 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770;
пипетки вместимостью до 10 $см^3$ с ценой деления 0,1 $см^3$ по ГОСТ 29227;
пипетки вместимостью 1 $см^3$ с ценой деления 0,01 $см^3$;
баню водяную;
карандаши восковые;
физиологический раствор pH 6,8—7,2.

3.5, 3.5.1. **(Измененная редакция, Изм. № 1).**

3.5.2. *Подготовка к испытанию*

3.5.2.1. Приготовление разведений гемолитической сыворотки.

Готовят основное разведение гемолитической сыворотки 1:100, для чего берут 0,1 $см^3$ гемолитической сыворотки и 9,9 $см^3$ физиологического раствора.

Из основного разведения сыворотки (1:100) готовят разведения от 1:500 до 1:2000, как указано в табл. 2.

Таблица 2

Доза основного разведения (1 100), см³	Доза физиологического раствора, см³	Общий объем, см³	Получаемое разведение
0,2	0,8	1,0	1 500
0,2	1,3	1,5	1 750
0,2	1,8	2,0	1 1000
0,2	2,3	2,5	1 1250
0,2	2,8	3,0	1 1500
0,2	3,3	3,5	1 1750
0,2	3,8	4,0	1 2000

Примечание Разведения гемолизина приготовлены с учетом массовой доли в нем 50 % глицерина, поэтому при расчете количества гемолизина для постановки РСК следует исходить из его титра, не учитывая глицерина, то есть при титре гемолизина 1 1000 его удвоенный титр будет 1:500, для приготовления которого следует взять 0,1 см³ гемолизина и 49,9 см³ физиологического раствора, при титре 1 1500 удвоенный титр 1 750 (0,1 см³ гемолизина +74,9 см³ физиологического раствора) и т.д

3.5.2.2. Приготовление 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана.

Кровь у барана берут с утра, до кормления, из яремной вены, набирают во флакон со стеклянными или металлическими бусами или без них. Встряхивают 7—10 мин, затем фильтруют через марлю, 3—5 раз отмывают физиологическим раствором путем центрифугирования с частотой вращения 2500 мин$^{-1}$ по 10 мин до полного обесцвечивания промывной жидкости. Из осадка эритроцитов готовят 2,5 %-ную взвесь на физиологическом растворе.

3.6. Проведение испытания

По 0,5 см³ каждого разведения гемолизина переносят в пробирки, имеющие соответствующие надписи, начиная с наибольшего разведения (1:2000). Затем в эти пробирки добавляют по 0,5 см³ комплемента в разведении 1:20, имеющего титр по ГОСТ 16446, по 1,0 см³ физиологического раствора и по 0,5 см³ 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана.

Одновременно, в тот же штатив, с правой стороны (конца) ставят три пробирки для контроля В первую пробирку контроля вносят 0,5 см³ гемолитической сыворотки в разведении 1:100, 1,5 см³ физиологического раствора и 0,5 см³ 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана; во вторую пробирку вносят 0,5 см³ комплемента в разведении 1:20, 1,5 см³ физиологического раствора и 0,5 см³ 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана; в третью пробирку — 0,5 см³ 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана и 2 см³ физиологического раствора (табл. 3).

Таблица 3

Компоненты	Дозы компонентов, см³, при разведении гемолизина								Контроль (гемолизин 1 100)		
									Номера контрольных пробирок		
	1 100	1 500	1 750	1 1000	1 1250	1 1500	1 1750	1 2000	1	2	3
1 Гемолизин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—	—
2 Комплемент (1 20)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—	0,5	—
3 Физиологический раствор	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	2,0
4 Эритроциты барана (2,5 %-ная взвесь)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

В первой контрольной пробирке определяют безвредность гемолитической сыворотки, во второй — безвредность комплемента, в третьей — наличие резистентности эритроцитов барана.

Штатив встряхивают и переносят в водяную баню на 10 мин при 37—38 °С. Штатив с пробирками извлекают из бани и проводят учет результатов реакций в проходящем свете.

3.5.2.1, 3.5.2.2, 3.6. **(Измененная редакция, Изм. № 1).**

3.6.1. *Обработка результатов*

Гемолитическую сыворотку считают активной при титре не менее 1:1000 и безвредной при отсутствии гемолиза эритроцитов в первой пробирке контроля.

4. УПАКОВКА, МАРКИРОВКА, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

4.1. Гемолитическую сыворотку фасуют по 1 $см^3$ в хорошо промытые стерильные ампулы, изготовленные из нейтрального стекла, и запаивают.

На ампулы наносят надпись с указанием:

наименования препарата (гемолизин);

номера серии;

количества препарата в миллилитрах.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

4.2. Ампулы с гемолизином по 10—20 шт. упаковывают в картонные коробки с разделительными перегородками (прокладками), обеспечивающими неподвижность и целостность ампул.

4.3. На каждую коробку наклеивают этикетку, на которой указывают:

наименование или товарный знак предприятия-изготовителя;

наименование препарата;

количество ампул в коробке;

количество препарата в ампуле в миллилитрах;

количество доз в миллилитре по удвоенному титру;

номер серии;

дату изготовления;

титр;

номер госконтроля;

срок годности;

условия хранения;

фамилию и номер браковщика и укладчика;

обозначение настоящего стандарта.

Кроме того, на этикетку каждой коробки наносят надпись: «Разводить без учета массовой доли глицерина!».

4.4. Коробки с гемолизином упаковывают в деревянные, фанерные ящики или картонные коробки массой брутто не более 15 кг.

Внутрь каждого ящика (коробки) вкладывают контрольный лист с указанием:

наименования препарата;

количества ампул препарата в ящике;

номера серии;

даты упаковывания;

фамилии или номера упаковщика.

4.5. Каждую транспортную единицу маркируют по ГОСТ 14192 с указанием следующих дополнительных данных:

наименования предприятия-поставщика и его адреса;

наименования организации-потребителя и его адреса;

наименования препарата;

количества ампул препарата в ящике;

номера серии;

даты выпуска;

условий хранения;

массы брутто и нетто;

обозначения настоящего стандарта.

На каждый ящик наносят манипуляционные знаки: «Хрупкое. Осторожно», «Ограничение температур» и предупредительную надпись «Биопрепараты».

4.4, 4.5. **(Измененная редакция, Изм. № 1).**

4.6. Гемолитическую сыворотку транспортируют всеми видами транспорта при температуре 2—15 °С.

Допускается транспортировать при более высокой температуре, но не выше 20 °С, при этом срок транспортирования должен быть не более 7 сут.

4.7. Гемолитическую сыворотку хранят в чистом, сухом, темном помещении при температуре 2—15 °С.

4.8. Срок годности гемолитической сыворотки 3 года со дня изготовления. По истечении указанного срока годность препарата устанавливают по соответствию показателя титра сыворотки требованиям настоящего стандарта. Титр определяется потребителем перед постановкой реакции связывания комплемента.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Министерством сельского хозяйства СССР**

   РАЗРАБОТЧИКИ

   Д.Ф. Осидзе, А.Н. Шаров, А.М. Силаев, М.К. Шевченко, Л.Я. Телишевская, А.А. Гринев, М.Х. Демченко, Г.Г. Попова

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 09.03.78 № 635**

3. **ВЗАМЕН ГОСТ 16445—70**

4. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта	Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 1770—74	3.5.1	ГОСТ 17206—96	3.4.1
ГОСТ 3582—84	3.4.1	ГОСТ 20730—75	3.4.2
ГОСТ 6709—72	3.3.1	ГОСТ 22524—77	3.3.1
ГОСТ 13805—76	3.4.1	ГОСТ 25336—82	3.3.1; 3.4.1; 3.5.1
ГОСТ 14192—96	4.5	ГОСТ 28498—90	3.3.1
ГОСТ 16446—78	3.5; 3.6	ГОСТ 29227—91	3.3.1, 3.5.1

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

6. **ПЕРЕИЗДАНИЕ (май 1999 г.) с Изменением № 1, утвержденным в июле 1988 г. (ИУС 11—88)**

Редактор *Т.А. Леонова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.И. Кануркина*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Изд. лиц. № 021007 от 10.08.95. Сдано в набор 24.06.99. Подписано в печать 26.07.99. Усл. печ. л. 0,93
Уч.-изд. л. 0,75. Тираж 102 экз. С3377. Зак. 602.

ИПК Издательство стандартов, 107076, Москва, Колодезный пер., 14.
Набрано в Издательстве на ПЭВМ
Филиал ИПК Издательство стандартов — тип. "Московский печатник", Москва, Лялин пер., 6.
Плр № 080102

gost.e-ecolog.ru