

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ОВЦЕВОДСТВА И КОЗОВОДСТВА
355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 15, тел./факс 8 (8652) 71-70-33

РАССМОТРЕНО И ОДОБРЕНО:
Ученый Совет ФГБНУ ВНИИОК

Протокол № 8
от «19» декабря 2016 г.

УТВЕРЖДАЮ:
Директор ФГБНУ ВНИИОК

М.И. Селионова
20/16 г.

ПОЛОЖЕНИЕ

о центре коллективного пользования
«Генофондное хранилище криоконсервированной спермы МРС» ВНИИОК

1. Общие положения

1.1 Настоящее Положение устанавливает основу деятельности центра коллективного пользования «Генофондное хранилище криоконсервированной спермы МРС» ВНИИОК.

1.2 Деятельность хранилища осуществляется в соответствии с существующими нормативными и правовыми актами:

1.2.1 Федеральный закон от 3 августа 1995 года N 123-ФЗ «О племенном животноводстве» (Собрание законодательства Российской Федерации, 1995, N 32, 3199; 2003, N 2, ст.167; 2005, N 19, ст.1752) (далее – Федеральный закон «О племенном животноводстве»);

1.2.2 Закон РФ от 14.05.1993 N 4979-1 (ред. от 22.08.2004) «О ветеринарии» (Собрание законодательства Российской Федерации);

1.2.3 Положение о Министерстве сельского хозяйства Российской Федерации, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 24 марта 2006 года N 164 (Собрание законодательства Российской Федерации, 2006, N 14, ст.1543);

1.2.4 Инструкция по технологии работы организаций по искусственному осеменению и трансплантации эмбрионов сельскохозяйственных животных, утвержденной приказом МСХ РФ от 09.06.2003 N 819;

1.2.5 Правила определения видов организаций по племенному животноводству (приказ МСХ РФ от 19 октября 2006 года N 402 (с изменениями на 19 июля 2007 года, утвержденными приказом Минсельхоза России от 19 июля 2007 года N 365);

1.3 В настоящем Положении использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

1.3.1 ГОСТ 12.1.008-76 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

1.3.2 ГОСТ 12.2.003-91 Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности

1.3.3 ГОСТ 12.3.002-75 Система стандартов безопасности труда. Процессы производственные. Общие требования безопасности

1.3.4 ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

1.3.5 ГОСТ 9293-74 Азот газообразный и жидкий. Технические условия

1.3.6 ГОСТ 14192-96 Маркировка грузов

1.3.7 ГОСТ 27775-88 Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. Термины и определения

1.3.8 ГОСТ 32198-2013 Средства воспроизведения. Сперма. Методы микробиологического анализа

1.3.9 ГОСТ 32222-2013 Средства воспроизведения. Сперма. Метод отбора проб

1.3.10 ГОСТ 32277-2013 Средства воспроизведения. Сперма. Методы испытаний физических свойств, биологического, биохимического, морфологического анализов

1.4 Центр коллективного пользования «Генофондное хранилище криоконсервированной спермы МРС» создан на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский НИИ овцеводства и козоводства».

1.5 Руководитель ЦКП «Генофондное хранилище криоконсервированной спермы МРС» ВНИИОК – заведующий отделом овцеводства, доктор сельскохозяйственных наук, профессор Айбазов М.М.

1.6 Организационная форма центра коллективного пользования «Генофондное хранилище криоконсервированной спермы МРС» ВНИИОК – биоресурсная коллекция.

1.6.1 Биоресурсные коллекции – это центры, предоставляющие услуги по хранению живых клеток, геномов и биоинформации, имеющей отношение к наследственности, функционированию биологических систем и различным аспектам практического использования биоматериалов (ФЗ N 123-ФЗ «О племенном животноводстве» от 3 августа 1995 года).

2. Задачи ЦКП «Генофондное хранилище криоконсервированной спермы МРС» ВНИИОК

2.1 Обеспечивать процесс воспроизводства племенных животных в целях улучшения продуктивных качеств сельскохозяйственных животных и разведения высокопродуктивных сельскохозяйственных животных.

2.2 Сохранять генофонд малочисленных, редких и исчезающих пород сельскохозяйственных животных, а также дикой фауны, полезной для селекционных целей.

2.3 Обеспечивать заявки СХП спермой особо ценных животных перспективных зарубежных пород, линий, а также местных и аборигенных пород с уникальными качествами.

3. Назначение и специфика ЦКП «Генофондное хранилище криоконсервированной спермы МРС» ВНИИОК

3.1 Длительное хранение замороженной в жидким азоте (-196°C) спермы производителей особой биологической, генетической и селекционной ценности для использования в следующих случаях:

3.1.1 При решении наиболее важных селекционных задач в ведущих госплемзаводах и племфермах учреждений (выведение новых и коренное улучшение существующих пород, типов, линий). При этом предполагается использование спермы производителей лучших зарубежных пород с выдающимися качествами, а также животных отечественных пород с рекордными показателями.

3.1.2 Для обеспечения замкнутого разведения малочисленных популяциях на генофондных и реликтовых фермах местных исчезающих и локальных аборигенных пород. Осуществляется мерами по сохранению генофонда ценных исчезающих пород путем чистопородного их разведения с аутбредным типом подбора.

3.1.3 Для селекционного использования в будущем через десятки лет и воспроизводства чистопородных животных в случае необходимости на маточном поголовье любой породы. Осуществляется сохранением генофонда исчезающих пород длительное время в виде, замороженной спермы, как основной формы генофонда.

4. Комплектование ЦКП «Генофондное хранилище криоконсервированной спермы МРС» ВНИИОК

4.1 ЦКП «Генофондное хранилище криоконсервированной спермы МРС» ВНИИОК комплектуется генофондным материалом производителей особой генетической и селекционной ценности. В эту категорию включаются:

4.1.1 Сpermопродукция производителей наиболее ценных зарубежных, мало распространенных в России пород;

4.1.2 Сpermопродукция производителей, оцененных как абсолютные улучшатели продуктивности;

4.1.3 Сpermопродукция производителей резко сокращающихся или локальных, малочисленных отечественных пород и отдельных генетически ценных популяций.

4.1.4 Сpermопродукция производителей разных видов дикой фауны

(туры, сайгаки, косули и т.д.).

4.2 Расчет нормативов заготавливаемой спермы при комплектовании генофондного хранилища должен исходить из необходимого требования о том, что генофонд породы должен соответствовать основным качествам самой породы.

4.3 Наличие в генофондовом хранилище замороженной спермы производителей разных линий (или родственных групп) позволяет в случае необходимости через любой отрезок времени воспроизвести чистопородных животных данной породы путем чистопородного разведения при наличии маточной отары и продолжать его разведение без инбридинга длительное время, а также в случае полного исчезновения маточного поголовья данной породы - путем поглотительного скрещивания на маточном поголовье другой породы.

4.4 Для сохранения генофонда ценных аборигенных и локальных отечественных пород, которым грозит скорое исчезновение, рекомендуется иметь в хранилище минимально 1000 доз замороженной спермы.

4.5 Качественный объем генофонда в спермопродукции от уникальных производителей и животных лучших зарубежных пород, мало распространенных в нашей стране, а также сокращающихся или локальных, малочисленных отечественных пород и отдельных генетически ценных популяций, производителей разных видов дикой фауны (туры, сайгаки, косули и т.д.) может быть целесообразным в любом практически доступном количестве.

5. Методы и способы консервации спермопродукции

5.1 Для длительного хранения спермы производителей применяют метод глубокого замораживания в жидким азоте (до температуры - 196°C).

5.2 Сперму можно замораживать двумя способами: в гранулах и пайетах.

5.2.1 Криоконсервация спермы в виде гранул (пеллетты). Фторопластовую пластину промывают дистиллированной водой, сушат и обеззараживают 96° спиртом. После этого её опускают в жидкий азот и выдерживают до прекращения кипения азота, затем поднимают на штативе на 8-10 см выше уровня азота, чтобы жидкость испарилась из лунок пластины. Далее пластины опускают до 1,5-2 см над уровнем жидкого азота, так, чтобы она находилась в парах газа. Таким образом, температура на поверхности пластины будет минус 80-90°C (температура контролируется термометром). В лунки раскладывают разбавленную эквилибрированную сперму, примерно по 0,2 см³.

Через 3 мин. пластину с гранулами погружают в жидкий азот, где происходит окончательное охлаждение гранул до -196°C и отделение их от пластины. Пластины вынимают из жидкого азота, гранулы собирают в емкости для хранения.

Одна доза отаянной спермы должна содержать 60-80 млн. спермиев с

прямолинейно-поступательным движением.

5.2.2 Криоконсервация спермы в соломинках (пайетты). Пайетты представляют собой пластиковые трубы, изготовленные из спермодобротного материала (не оказывающего воздействия на живые клетки), с хлопковой пробкой на одном конце. Для фасовки спермы используют пайетты объемом 0,25 мл.

Для криоконсервации спермы в пайеттах необходим комплект оборудования: аппарат для маркировки пайетт; автоматическая или полуавтоматическая фасовочная система, для расфасовки рассчитанных доз спермы в соломинки и укупорки их специальными пробками-шариками, либо запаивания ультразвуком; плавучая морозильная рама или управляемый компьютером, программируемый прибор заморозки.

6. Технические требования для свежеполученной спермы

6.1 Сперма для замороживания должна соответствовать требованиям стандарта «Единый перечень товаров, подлежащих ветеринарному контролю (надзору), утвержденный Решением Комиссии Таможенного союза от 18 июня 2010 года № 317», должна быть получена от производителей, свободных от возбудителей инфекционных болезней в соответствии с требованиями, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

6.2 Свежеполученная сперма по органолептическим, физическим, биологическим и морфологическим показателям должна соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Характеристика и норма
Внешний вид, консистенция, цвет	Однородная, молочно-белая с желтоватым оттенком, вязкая, сливкообразная жидкость без примеси крови, гноя и мочи
Объем эякулята, см ³ не менее	0,5
Концентрация сперматозоидов, млрд/см ³ не менее	2,0
Количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением (ППД), %, не менее	80
Количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением (ППД) в дозе для осеменения, млн, не менее	100
Количество сперматозоидов с аномальной морфологией, %, не более	18
Количество сперматозоидов с интактной акросомой, %, не менее	90
Объем дозы для осеменения, см ³ не более	0,2

6.3 Свежеполученная сперма по ветеринарно-санитарным показателям должна соответствовать нормам, указанным в таблице 2.

Таблица 2

Наименование показателя	Норма
Общее число непатогенных микроорганизмов, шт./см ³ не более	5000
Коли-титр, см ³ не более	0,1
Патогенные и условно патогенные бактерии, вирусы и грибы	Не допускаются

6.4 Разбавление спермы осуществляют в мерных колбах по ГОСТ 1770 после перенесения свежеполученной спермы из спермоприемника, используя среды или разбавители, разрешенные к применению для хранения спермы в замороженном виде.

Разбавление спермы проводят с таким расчетом, чтобы выполнялись требования таблицы 1 к числу сперматозоидов в спермодозе.

7. Технические требования для замороженной спермы

7.1 Замороженная сперма после оттаивания по органолептическим, физическим, биологическим и морфологическим показателям должна соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице 3.

Таблица 3

Наименование показателя	Характеристика и норма
Внешний вид	Однородная жидкость без посторонних примесей
Цвет	Желтый или светло-желтый
Количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением (ППД), %, не менее	40
Объем спермадозы для осеменения, см ³ не менее	0,2
Количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением (ППД) в дозе для осеменения, млн, не менее	100
Выживаемость сперматозоидов при температуре 37 °С, ч, не менее	5
Количество сперматозоидов с интактной акросомой, %, не менее	60
Количество сперматозоидов с аномальной морфологией, %, не более	20

7.2 Замороженная сперма по ветеринарно-санитарным показателям должна соответствовать нормам, указанным в таблице 4.

Таблица 4

Наименование показателя	Норма
Общее число непатогенных микроорганизмов в спермодозе, шт., не более	500
Коли-титр, см ³ не более	0,1
Патогенные и условно патогенные бактерии, вирусы и грибы	Не допускаются

7.3 Комплексная оценка замороженной спермы долгосрочного хранения по показателям (табл. 3,4) проводится через каждые 3 года.

8. Криооборудование для хранения спермы

8.1 Заготовленная сперма производителей закладывается в стационарные хранилища (сосуды Дьюара), где она хранится до использования при температуре -196° С.

8.2 Для долговременного хранения спермы наиболее пригодны хранилища с узкой горловиной. Такие сосуды имеют низкую испаряемость жидкого азота и позволяют до минимума сократить дополнительную их заправку. Хранилища с широкой горловиной и полностью раскрываемой верхней частью, несмотря на достоинства (свободный доступ и хороший обзор любой точки объема сосуда, большая вместимость и легкость очистки) для долговременного хранения генофонда более затратны. Такие хранилища (сосуды) имеют значительно большую испаряемость азота по сравнению с хранилищами с узкой горловиной (8-10 кг азота в сутки по сравнению против 0,5-1,0 кг), нуждаются в частых заправках азотом, что значительно удорожает содержание генофондного банка.

8.3 Потребность в стационарных хранилищах (сосудах) рассчитывается исходя из следующих нормативов:

8.3.1 В хранилище (сосуд) емкостью 50 литров (например отечественный сосуд Дьюара СДС-50) можно поместить 15-20 тыс. доз спермы замороженной в соломинках (пайеттах) или в гранулах (пеллетах) объемом 0,15-0,2мл.

8.3.2 Количество хранилищ большей или меньшей емкости уменьшается или увеличивается соответственно, при этом не рекомендуется использовать в качестве стационарного хранилища сосуды с объемом меньше 30 литров (например СДС - 20 , СДС-5 и т.д.).

8.4 К оборудованию для сохранения и использования генофонда нужно отнести сосуды средней и малой емкости (от 4-5 до 15-20 литров), основное назначение которых сводится к кратковременному хранению спермы в период заготовки и перевозки.

8.5 Для систематической подвозки азота с завода-производителя генофондное хранилище комплектуется спецавтомашиной с транспортным резервуаром (например, ТРЖК- 2 У).

9. Маркировка

9.1 Каждую упаковочную единицу спермы маркируют с указанием наименования продукции, номера партии, клички и инвентарного номера производителя, даты разбавления и замораживания, предприятия-изготовителя и его товарного знака с приложением инструкции о порядке использования.

9.2 Транспортная маркировка осуществляется по ГОСТ 14192 с нанесением манипуляционных знаков: «Беречь от солнечных лучей», «Хрупкое. Осторожно».

10. Упаковка

10.1 Замороженная в гранулах сперма должна быть упакована в специальные закрывающиеся канистры, пластиковые тубы или гоблеты.

10.2 При замораживании спермы в полипропиленовых соломинках используют соломинки (пайеты) вместимостью 0,25 см³.

10.3 Упаковочные материалы должны соответствовать требованиям документов, в соответствии с которыми они изготовлены, и обеспечивать сохранность качества и безопасности спермы при транспортировании, хранении и реализации.

11. Требования безопасности

11.1 Производственный процесс и оборудование должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.2.003, ГОСТ 12.3.002.

11.2 Требования безопасности, производственной санитарии и санитарно-противоэпидемического режима должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.008.

11.3 Утилизацию спермы проводят ее кипячением в течение 20 мин.

12. Правила приемки и учета

12.1 Сперму принимают партиями. Под партией понимают количество спермы, полученное за один технологический цикл и оформленное одним документом, удостоверяющим качество и безопасность спермы.

12.2 В документе, удостоверяющем качество и безопасность спермы, должно быть указано: наименование предприятия-изготовителя и его товарный знак; наименование продукции; вместимость упаковочной единицы; число упаковочных единиц в единице транспортной тары; номер партии; дата изготовления; номер документа, удостоверяющего качество спермы; дата выдачи документа, удостоверяющего качество спермы; результаты контроля качества спермы; штамп предприятия-изготовителя и подпись ветеринарного врача предприятия-изготовителя, удостоверяющего, что сперма свободна от возбудителей инфекционных болезней.

12.3 Точность учета хранимой спермы конкретных животных обеспечивается системой условной нумерации и обозначения всех емкостей, используемых в генофондовом хранилище.

12.4 По каждому сосуду (хранилищу) оформляется специальная карточка с указанием местонахождения отдельных емкостей с размещенной в них спермой.

12.5 Полные данные с характеристикой спермы и места ее хранения фиксируются в специальном журнале.

12.6 Результаты деятельности генофондового хранилища ежегодно публикуются в форме «Каталог спермопродукции ЦКП «Генофондовое хранилище криоконсервированной спермы МРС» ВНИИОК».

13. Методы контроля

13.1 Отбор проб и подготовка к испытаниям – по ГОСТ 32222.

13.2 Внешний вид, консистенцию и цвет спермы определяют визуально.

13.3 Определение концентрации сперматозоидов – по ГОСТ 32277.

13.4 Определение количества сперматозоидов с ППД – по ГОСТ 32277.

13.5 Определение количества сперматозоидов с аномальной морфологией – по ГОСТ 32277.

13.6 Определение количества сперматозоидов с интактной акросомой – по ГОСТ 32277.

13.7 Определение числа сперматозоидов в спермодозе – по ГОСТ 32277.

13.8 Выживаемость сперматозоидов при температуре 37°C – по ГОСТ 32277.

13.9 Определение общего числа непатогенных микроорганизмов в спермадозе – по ГОСТ 32198.

13.10 Определение бактерий группы кишечной палочки (coli-титра) – по ГОСТ 32198.

13.11 Определение патогенных и условно патогенных бактерий, вирусов и грибов – по ГОСТ 32198.

14. Транспортирование и хранение

14.1 Замороженную сперму хранят и транспортируют в сосудах Дьюара различной вместимости и конструкции (типов СДС-6, СДС-35, СДС Т-35, СДС Т35М), заполненных жидким азотом по ГОСТ 9293 с температурой минус 196°C не менее 1/3 объема.

14.2 Срок хранения замороженной спермы при соблюдении условий хранения неограничен.

14.3 Транспортируют замороженную сперму всеми видами транспорта в соответствии с правилами перевозок скоропортящихся грузов и багажа, действующими на данном виде транспорта.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ОВЦЕВОДСТВА И КОЗОВОДСТВА

355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 15, тел./факс 8(8652) 71-70-33

РАССМОТРЕНО И ОДОБРЕНО:
Ученый Совет ФГБНУ ВНИИОК

Протокол № 8

от «19» декабря 2016 г.

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБНУ ВНИИОК

М.И. Селионова

2016 г.



КАТАЛОГ

Коллекции

«Банк иммунодиагностикумов - сыворотки моноспецифические»
(ВНИИОК «БИ-СМ»)

Введение

Коллекция, федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства» (ФГБНУ ВНИИОК) «Банк иммунодиагностикумов - сыворотки моноспецифические», далее - Коллекция (ВНИИОК «БИ-СМ»), была создана в 1979 году на базе Всесоюзного научно-исследовательского института овцеводства и козоводства (ВНИИОК).

Основными задачами Коллекции ВНИИОК «БИ-СМ» являются:

- 1) формирование, пополнение и сохранение набора иммунодиагностикумов - моноспецифических сывороток, эритроцитарных антигенов определенного вида животных и обеспечение длительного их хранения;
- 2) разработка и совершенствование технологий консервации иммунодиагностикумов, обеспечивающих их длительное хранение и поддержание оптимального титра;
- 3) выполнение прикладных и теоретических исследований для обеспечения научной, производственной, образовательной, диагностической работы.

В каталоге представлена информация о четырнадцати иммунодиагностикумах - моноспецифических сыворотках для определения

групп крови у овец. Сыворотки, перечисленные в каталоге, расположены в алфавитном порядке, по шести системам.

В каталоге приводятся правила получения моноспецифических сывороток, указан перечень требований соответствия специфическим свойствам, дана информация по их маркировке, упаковке, контролю на специфичность, хранению и транспортировке

1. Область применения. Настоящая Коллекция ВНИИОК «БИ-СМ» предназначена для определения групп крови при иммуногенетическом тестировании племенных овец.

2. Технические требования

2.1. Сыворотки моноспецифические (иммунодиагностикумы) должны изготавливаться согласно инструкции по изготовлению и контролю сывороток моноспецифических для определения групп крови у овец.

2.2. Сыворотки моноспецифические по органолептическим, физическим свойствам, активности и специфичности должны соответствовать требованиям, указанным в таблице 1.

Наименование показателя	Характеристика показателя
Внешний вид	Прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость. Допускается незначительный осадок образующийся при хранении
Цвет	От бледно- желтого до желтого
Консистенция	Коллоидный раствор
Наличие посторонних примесей	Не допускается наличие посторонних примесей, плесени, хлопьев
Специфичность	Должна быть специфическая к соответствующему эритроцитарному антигену
Активность	Титр реализуемых сывороток моноспецифических не должен быть ниже 1:2 для Да и 1:4 для остальных сывороток-реагентов
Погрешность фасовки	Допустимые отклонения массы нетто не должны превышать требований ГОСТ 8.579
Температура расфасованного препарата, °C	Минус 20

2.3. Специфичность сывороток для определения группы крови овец.

2.3.1. Сыворотки специфические должны соответствовать эталонам.

2.3.2. Различают 6 систем групп крови у овец, отличающихся между собой по иммунологическим показателям.

2.3.3. Системы обозначаются заглавными буквами латинского алфавита, антигенные факторы - малыми буквами (A, B, C, M, R, D: Aa; Ab; Bb; Bd; Be; Bg; Bi; Ca; Cb; Ma; Mb; R; O; Da).

2.3.4. Эритроцитарные антигены, наследуемые по менделеевским законам, как простые качественные признаки, по численности сочетания их между собой широко варьируют, вследствие чего животные имеют индивидуальный тип крови.

2.3.5. Наличие антигенов определяется при помощи специфических к каждому антигену сывороток-реагентов. Реагент представляет собой иммунную или натуральную сыворотку, содержащую моноспецифические антитела к определенному антигену. Реагент обозначается теми же буквами, что и антигены с приставками «Анти»: «Анти - Аа», «Анти - Bb», «Анти - Da» и т. д.

2.3.6. Получение иммунодиагностикумов для определения групп крови у овец слагается из следующих производственных этапов:

- формирование стада овец-продуцентов изоиммунных сывороток;
- типирование (аттестация) животных по группам крови;
- комплектование контрольной (аттестованной) группы животных;
- подбор пар животных для иммунизации;
- изоиммунизация животных;
- получение и обработка изоиммунных сывороток;
- выявление антител в «сырых» иммунных сыворотках;
- расшифровка антител и получение моноспецифических сывороток (реагентов);
- контроль специфичности реагентов;
- расфасовка, маркировка, хранение и транспортирование реагентов.

2.3.7. Работа по производству реагентов проводится с соблюдением санитарно-гигиенических правил при производстве биологических препаратов.

2.3.8. Формирование стада овец-продуцентов для получения иммунных сывороток производится из клинически здоровых животных, средней упитанности, независимо от пола (лучше валухи) в возрасте 5-6 месяцев из благополучных по инфекционным заболеваниям хозяйств.

2.4. Требования безопасности

2.4.1. Требования безопасности, производственной санитарии и санитарно-противоэпидемического режимов выполняется в соответствии с «Правилами техники безопасности, производственной санитарии, охранно-карантинного и ветеринарно-санитарного режимов на предприятиях биологической промышленности», утвержденные Департаментом ветеринарии.

2.4.2. Реагенты пожаро-, взрыво-безопасны. Токсических соединений с другими веществами иммунодиагностикумы не образует.

2.4.3. По биологической безопасности иммунодиагностикум должен соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.008.

2.4.4. Производственные процессы при изготовлении иммунодиагностикума должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.3.002, а производственное оборудование ГОСТ 12.2.003.

2.4.5. В процессе получения иммунодиагностикума персонал должен быть обеспечен средствами защиты по ГОСТ 12.4.011, а также пройти обучение по безопасности труда по ГОСТ 12.0.004.

2.4.6. Требования к воздуху в рабочей зоне по ГОСТ 12.1.005.

2.4.7. Утилизация иммунодиагностикума, не прошедшего контроль, а также серий с истекшим сроком годности, не требует специальных мер безопасности.

3. Маркировка

3.1. Маркировка потребительской тары.

3.1.1. Маркировка потребительской тары (флакона) должна быть нанесена на каждую единицу и содержать информацию:

наименование сыворотки;

титр сыворотки;

наименование предприятия-изготовителя и его местонахождение (юридический адрес, включая страну);

массу нетто (количество доз);

дату изготовления (месяц, год);

срок годности;

условия хранения;

номер серии;

обозначение документа, в соответствии с которым изготовлен и может быть идентифицирован иммунодиагностиком.

3.2. Каждую транспортную единицу (термос) маркируют в соответствии с требованиями ГОСТ 14192, с внесением манипуляционных знаков: «Ограничение температуры» с указанием интервала температур, «Беречь от солнечных лучей», «Верх» или наносят информацию на лист-вкладыш:

наименование предприятия изготовителя, его товарный знак;

наименование сыворотки;

номер серии;

массу нетто или брутто;

дату изготовления;

количество единиц потребительской тары;

срок годности;

условия хранения;

обозначение документа, в соответствии с которым изготовлен и может быть идентифицирован иммунодиагностиком.

4. Упаковка

4.1. Иммунодиагностикумы для определения групп крови выпускаются в комплектах.

4.2. В комплект иммунодиагностикумов входит: 14 сывороток для определения антигенов 6 систем групп крови: Aa и Ab (A система), Bb, Be, Bd, Bg, Bi (B система), Ca, Cb (C система), Da (D система), Ma, Mb (M система), R, O (R система).

4.3. Сыворотка расфасовывается во флаконы из стеклянных или полимерных материалов вместимостью 25 и 50 мл (250 и 500 доз).

4.4. Флаконы закрываются резиновыми пробками по ТУ 38-006-108-84, обкатываются их алюминиевыми колпачками по ОСТ 64-009-86.

4.5. Предел допустимых отрицательных отклонений по ГОСТ 8.579 (табл. 2).

Таблица 2

Номинальное количество нетто M, г или мл	Предел допускаемых отрицательных отклонений, T	
	% от M	г или мл
Св. 5 до 50 включ.	9	-
» 50 » 100 »	-	4,5
» 100 » 200 »	4,5	-
» 200 » 300 »	-	9
» 300 » 500 »	3	-

4.6. Флаконы с сывороткой укладываются в контейнеры (картонные коробки), с разделительными перегородками, обеспечивающими неподвижность и целостность флаконов. В каждый контейнер вкладывается экземпляр листа-вкладыша с наставлениями по применению реагента.

4.7. На коробку с флаконами наносится или наклеивается этикетка, на которой указывается наименование и товарный знак предприятия-изготовителя, полное наименование иммунодиагностикума, номер серии и контроля, количество флаконов в коробке, дату изготовления, срок годности, условия хранения и надпись: «Для животных».

5. Методы контроля

5.1. Для проверки качества иммунодиагностикума отбираются пробы из разных мест серии в количестве – 6 флаконов, половина ($n=3$) из которых используется для проведения испытаний, а вторая - остается в архиве контроля. Каждый флакон, предназначенный для хранения, должен иметь штамп с отметкой «Архив».

5.2. Для определения внешнего вида, наличия посторонних примесей, плесени, хлопьев сыворотки во флаконах размораживаются и переливаются в чистые стеклянные пробирки и просматривается в проходящем свете.

5.3. Определение специфичности.

5.3.1. Специфичность сывороток определяется реакциями гемолиза и агглютинации в образцах крови не менее 100 эталонных (тестированных) животных.

5.3.2. Материалы и реактивы.

Для изготовления моноспецифических сывороток требуется следующее оборудование и химические реактивы.

Оборудование:

центрифуги с разной емкостью стаканов и скоростью оборотов не менее 3000 в минуту;

термостаты для поддержания температуры 28-30°C и 56°C;

сушильные шкафы для стерилизации посуды при температуре 60°C и 180°C;

холодильные камеры для поддержания температуры минус 20°C;

мерные пипетки на 1, 2, 5, 10 мл по ГОСТ 29227;

штативы для пробирок;

полиэтиленовые флаконы на 20, 250, 500 и 1000 мл;

вакуумный насос;

кровебрательные иглы или система «Моновет»;

водоструйный насос;

дистиллятор;

иммунологические блоки из оргстекла;

алюминиевые колпачки;

центрифужные пробирки;

резиновые пробки;

химические стаканы объемом 50, 100, 200, 250, 500, 1000, и 3000 мл по ГОСТ 25336;

колбы на 100, 200, 500, 1000 и 3000 мл по ГОСТ 25336;

кролики;

эталонные (контрольные) животные.

Реактивы:

натрий хлористый по ГОСТ 4233;

натрий лимоннокислый (трехзамещенный) по ГОСТ 22280;

сульфацил натрий (альбуцид);

этакридин лактат (ривонол);

глюкоза кристаллическая гидратная;

левомицетин;

калий двухромовокислый по ГОСТ 4220;

кислота соляная по ГОСТ 3118;

кислота серная по ГОСТ 4204;

вода дистиллированная по ГОСТ 6709;

комплément сухой морской свинки по ГОСТ 16446.

5.3.3. Подготовка к испытанию. У контрольных овец отбираются образцы крови и готовится 2,5 % суспензия эритроцитов для постановки реакции гемолиза или агглютинации с проверяемой моноспецифической сывороткой.

5.3.4. Проведение испытаний. Реакция гемолиза осуществляется в иммунологических блоках из оргстекла. В лунке блока вносится 2 капли соответствующей сыворотки, 1 капля 2,5% суспензии эритроцитов и 1 капля комплемента. Смесь встряхивается и помещается в термостат при температуре 32 ± 2 °С. Учет результатов реакции проводится 2 раза: через 2 и 4 часа с момента внесения комплемента. При постановке реакции агглютинации в лунки блока вносится 2 капли соответствующей сыворотки и одна капля 2,5% суспензии

эритроцитов, после встрихивания пластины помещаются в термостат при той же температуре. Учет результатов реакции проводится через 30 минут и 2 часа с момента постановки реакции. При постановке реакций необходим контроль. Для реакции гемолиза ставится два контроля: один – на качество эритроцитов, другой – на качество комплемента. Контроль эритроцитов - три капли изотонического раствора плюс одна капля 2,5 % суспензия эритроцитов. Контроль комплемента - две капли изотонического раствора плюс одна капля 2,5 % суспензия эритроцитов и плюс одна капля комплемента. Контроль обязателен и для постановки реакции агглютинации, где вместо двух капель сыворотки берется две капли изотонического раствора.

5.3.5. Реакция гемолиза оценивается по балльной системе:

4 - все эритроциты гемолизированы, жидкость равномерно окрашенная, прозрачная, никаких следов эритроцитов;

3 - на дне лунки видны следы эритроцитов, образуется легкое помутнение при взбалтывании;

2 - $\frac{1}{2}$ часть эритроцитов на дне лунки, жидкость над осадком умеренно окрашена в красный цвет;

1 - около 3/4 частей эритроцитов на дне лунки, жидкость над осадком слабого красного цвета;

\pm - все эритроциты на дне лунки, над осадком жидкость слегка красная, следы гемолиза заметны в виде ободка над осевшими эритроцитами;

0 - все эритроциты целые, надосадочная жидкость прозрачная.

Степень агглютинации определяется следующим образом:

+ - наличие реакции, в лунке образуются конгломераты склеенных эритроцитов;

\pm - при наличии небольшого количества малых конгломератов склеенных эритроцитов на дне лунки;

- - отсутствие реакции.

Полный или частичный лизис эритроцитов в реакции гемолиза или + и \pm в реакции агглютинации в данной сыворотке свидетельствует о наличии у

животного соответствующего антигена, отсутствие лизиса или агглютинации - животное не имеет данного антигена. Результаты реакции фиксируются в специальном журнале.

5.3.6. По результатам гемолитических реакций контрольных животных, отбирается 2 - 3 положительно реагирующих образца крови, полученные, из каждого образца 3 - 4 мл 2,5 % суспензии эритроцитов, используются для контрольной абсорбции испытуемой сыворотки (3 - 4 мл сыворотки каждого образца крови).

Для исследования «Анти»- Да - агглютинина применяется такая же схема, что и антител- гемолизинов.

Результаты контрольной абсорбции сывороток проверяются гемолитическими реакциями и реакциями агглютинации - на всех образцах крови аттестованных животных, давших положительные реакции при ее испытании.

5.3.7. Сыворотка считается специфической, если все образцы крови контрольных животных, имеющие тот же антиген, для которого она изготовлена, дает положительные, а не имеющие этого антигена - отрицательные реакции гемолиза, при условии, что контрольная абсорбция сывороток с любым положительно реагирующим образом крови, полностью истощает ее в образцах крови аттестованных овец. Сыворотка моноспецифической считается, если она после контрольной абсорбции вызывает лизис или агглютинацию эритроцитов той части животных, которые не имеют специфического к ней антигена или его подтипа.

5.4. Определение активности. Активность сыворотки проверяется по титру, т. е. наибольшему ее разведению изотоническим раствором, при котором она реагирует со всеми эритроцитами контрольных животных, содержащими данный специфический антиген. Перед проведением испытаний сыворотка размораживается при комнатной температуре (18-20°C), встряхивается и готовится нужное ее количество в рабочем титре (табл. 3).

Таблица 3

Титр сыворотки (форма нативная)	Соотношение компонентов		Рабочий титр
	объем сыворотки (частей)	объем изотонического раствора (частей)	
1:2	не разводится		1:2
1:4	не разводится		1:4
1:8	1	1	1:4
1:16	1	3	1:4
1:32	1	7	1:4
1:64	1	15	1:4
1:128	1	31	1:4
1:256	1	63	1:4
1:512	1	128	1:4
1:1024	1	255	1:4

Коллекция включает более 3 млн. доз иммунодиагностикумов 14 антигенных факторов шести систем (табл. 4).

Таблица 4

Классификация систем групп крови

Система	Антигенный фактор	Количество доз (тыс.)
A	Aa	380
	Ab	400
B	Bb	200
	Bd	270
	Be	250
	Bg	260
	Bi	250
	Ca	180
C	Cb	160
	Ma	180
M	Mb	150
	R	130
R	O	120
	Da	350
Итого:		3280

6. Транспортирование и хранение

6.1. Иммунодиагностикумы - сыворотки моноспецифические хранятся на предприятии-изготовителе (ФГБНУ ВНИИОК) при температуре минус 20 °С.

6.2. Иммунодиагностикумы - сыворотки моноспецифические отпускаются в реализацию в замороженном виде в термосах, сумках-холодильниках, в контейнерах с сухим льдом.

6.3. Не допускается изменение температуры иммунодиагностикумов при транспортировании и хранении.

6.4. Срок годности иммунодиагностикумов - сывороток моноспецифических составляет 2 года, при условии соблюдения температурного режима, указанного в п. 6.1.