ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА

ГОСТ 25385—91

Издание официальное

30 руб. БЗ 9—91/1046



КОМИТЕТ СТАНДАРТИЗАЦИИ И МЕТРОЛОГИИ СССР
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 636.9.001.4:006.354 Группа С70

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

Методы диагностики бруцеллеза

Agricultural animals. Methods of diagnostics of brucellosis

ГОСТ 25385—91

ОКСТУ 9809

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на методы диагностики бруцеллеза животных.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для бактериологического исследования берут абортированные плоды (от свиноматки не менее трех плодов) или их части (перевязанный желудок с содержимым, печень, селезенка), околоплодную жидкость, плодовые оболочки, молоко, содержимое гигром (бурситов), абсцессов, а от животных, убитых с диагностической целью — паренхиматозные и половые органы и лимфатические узлы.

Жидкий материал берут в стерильную посуду (пробирки, банки).

Для исследования на инфекционный эпидидимит в лабораторию направляют: от баранов — семенники с придатками; от овцематок — абортированные плоды с плодовыми оболочками.

Отобранные для бактериологических исследований пробы упаковывают в полиэтилен, целлофан или пергаментную бумагу, помещают в общую тару (ящик, пакет) и в тот же день отправляют в лабораторию

Одновременно с материалом в лабораторию направляют кровь животного для серологического исследования и акт с анамнестическими данными.

1.2. Для серологического исследования берут кровь из яремной вены (у свиней из ушной или хвостовой) в стерильные про-

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1992

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен без разрешения Госстандарта СССР

бирки по 5—10 см³ от каждого животного или используют кровь, полученную при убое.

Пробирки маркируют, составляют опись проб и направляют в лабораторию.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Метод бактериологического исследования

Сущность метода заключается в выявлении бруцелл в исследуемом материале путем определения характера роста выделенных культур микробов на питательных средах, их морфологии, тинкториальных, антигенных и патогенных свойств для морских свинок.

2.1.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Гомогенизатор электрический бактериологический.

Инкубатор вакуумный.

Микроскоп иммерсионный с контрастным приспособлением или стереоскопический.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 и 100 см³ по ГОСТ 20292.

Прибор для получения CO_2.

Потенциометр или pH-метр.

Центрифуга лабораторная.

Эксикатор по ГОСТ 25336.

Чашки бактериологические по ГОСТ 25336.

Пробирки бактериологические по ГОСТ 25336.

Пипетки пастеровские по ГОСТ 20292.

Стекла предметные по ГОСТ 9284.

Масло иммерсионное для микроскопии.

Ножницы Купера (изогнутые).

Перчатки анатомические.

Пинцеты анатомические.

Шпатели.

Спиртовка.

Агар микробиологический по ГОСТ 17206 или агар пищевой по ГОСТ 16280.

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805.

Глицерин по ГОСТ 6259.

D-глюкоза по ГОСТ 6038.

Спирт этиловый 96%-ный по ГОСТ 5962.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Генциан фиолетовый (генцианвиолет).

Йод металлический (кристаллический).

Калий йодистый.

Зелень малахитовая.

Кристаллический фиолетовый.

Метиленовый синий.
Сафранин.
Фуксин основной.
Фильтр бумажный.
Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.
Калия гидроокись по ГОСТ 24363.
Кислота карболовая кристаллическая.
Кислота лимонная по ГОСТ 908.
Кислота соляная по ГОСТ 3118.
Кислота уксусная по ГОСТ 61.
Кислота серная по ГОСТ 4204.
Натрий хлористый по ГОСТ 4233.
Натрий уксуснокислый по ГОСТ 2080.
Натрий лимоннокислый по ГОСТ 22280.
Паранитрофенилглицерин.
Сыворотка крови бычья или лошадиная (нормальная).
Набор компонентов для серологической дифференциации культур бруцелл.
Свинки морские массой 300—400 г.

2.1.2 *Подготовка к исследованию*

2.1.2.1. Для приготовления карболового кристаллического фиолетового или генциан фиолетового для окраски по Граму берут 1 г кристалл- или генцианфиолетового, растирают в ступке с 2 г кристаллической карболовой кислоты. Во время растирания небольшими порциями прибавляют 10 см³ 96%-ного этилового спирта. После того как краска полностью растворится, прибавляют при постоянном помешивании 100 см³ дистиллированной воды. Раствор краски фильтруют через бумажный фильтр.

2.1.2.2. Для приготовления раствора Люголя в 10 см³ дистиллированной воды растворяют 2 г йодистого калия. Затем прибавляют 1 г кристаллического йода. Раствор выдерживают от 5 до 6 ч до полного растворения йода, после чего прибавляют 290 см³ дистиллированной воды. Хранят раствор в склянке из темного стекла.

2.1.2.3. Для приготовления карболового фуксина Циля берут 1 г основного кристаллического фуксина, растирают в ступке с 5 г кристаллической карболовой кислоты и 0,5 см³ глицерина. Во время растирания небольшими порциями прибавляют 10 см³ этилового 96%-ного спирта. После того как краска полностью разотрется, прибавляют при постоянном помешивании 100 см³ дистиллированной воды. Раствор краски фильтруют через бумажный фильтр. Фуксин Циля стойкий и его хранят во флаконах из темного стекла с притертой пробкой.

Перед работой к одной части карболового фуксина Циля прибавляют девять частей дистиллированной воды.

2.1.2.4. Для проведения исследований используют также готовые стандартные растворы генциана фиолетового, Люголя, фуксина Циля, зелени малахитовой.

2.1.2.5. Для приготовления сывороточно-декстрозного и кровяного агара на мясном экстракте вначале готовят питательный агар. К 1000 см³ дистиллированной воды прибавляют 15 г агара, 10 г пептона, 5 г хлористого натрия, 5 г мясного экстракта. Все ингредиенты помещают в сосуд и подвергают обработке текучим паром в течение 1 ч. Устанавливают pH 6,8. Затем автоклавируют при 127°С для выпадения фосфатов. Среду фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают pH 7,4 и стерилизуют при 115°С в течение 15 мин.

Для приготовления сывороточно-декстрозной среды питательный агар охлаждают до 50°С и добавляют 5% нормальной инактивированной лошадиной или бычьей сыворотки и 1% раствора декстрозы.

Для приготовления кровяной среды питательный агар охлаждают до 50°С и добавляют от 10 до 20% дефибринированной крови нормальных телят, лошадей или овец. Смешивают и разливают в стерильные пробирки или бактериологические чашку.

2.1.2.6. Для исследования на Brucella ovis приготовляют сывороточно-глицериново-декстрозный агар.

Расплавленный питательный агар охлаждают до 50°С и добавляют к нему глицерина 2%, декстрозы 1% и сыворотки инактивированной 10—20%. Смешивают и разливают в стерильные пробирки или бактериологические чашки.

2.1.2.7. Для приготовления печеночного настоя свежую говяжью печень освобождают от жира и пленок и пропускают через мясорубку. Фарш заливают водопроводной водой (на 1 кг фарша — 1 дм³ воды) и настаивают при 25—30°С в течение 3 ч или при 4—10°С в течение 6—10 ч. Затем смесь подвергают обработке текучим паром в течение 20 мин или варят в котле 2 ч, постоянно помешивая и снимая накипь. После варки настой фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по бутылям и стерилизуют 30 мин при 112—115°С.

2.1.2.8. Для приготовления печеночного бульона к 500 см³ печеночного настоя, приготовленного по п. 2.1.2.7, добавляют 500 см³ водопроводной воды, 10 г сухого пептона и 5 г хлористого натрия. Смесь кипятят, устанавливают pH 7,4 и фильтруют через фильтровальную бумагу, затем разливают в необходимую по емкости посуду и стерилизуют 20 мин при 115—120°С. После стерилизации pH бульона должен быть 7,1—7,2.

2.1.2.9. Для приготовления печеночного агара к 500 см³ печеночного настоя, приготовленного по п. 2.1.2.7, добавляют 500 см³ водопроводной воды, 10 г сухого пептона, 5 г хлористого натрия

и 25 г агара. Устанавливают pH 7,4 и варят до растворения агара. Затем автоклавируют при 115°С в течение 20 мин, отстаивают и фильтруют через ватно-марлевый фильтр (предварительно смоченный теплой водой). Устанавливают pH 7,1—7,2. Разливают в необходимую по емкости посуду и стерилизуют при 115°С в течение 20 мин.

2.1.2.10. Для приготовления мазков из патологического материала требуются чистые обезжиренные предметные стекла. Абортированный плод вскрывают, поверхность паренхиматозных органов стерилизуют, прикладывая раскаленный шпатель или обжигая тампоном, смоченным в спирте. Затем вырезают стерильными ножницами кусочки размером 1,5×1,0×1,5 $см^3$ и прикладывают поверхностями срезов к предметному стеклу по три отпечатка на двух предметных стеклах. В таком же порядке готовят мазки из котиледонов последа, лимфатических узлов и другого материала. Содержимое желудка плода и другой жидкий материал набирают пастеровской пипеткой и также готовят мазки. Препараты высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки. Один мазок из каждого объекта окрашивают по Козловскому или Stamp, другой — по Граму. Мазки микроскопируют.

2.1.2.11. Для окраски мазков по Граму на фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги и наливают карболовый генциан фиолетовый на 2 мин, после чего снимают бумажку, сливают краску и промывают водой, наливают на мазок раствор Люголя (мазок чернеет). Через 1—2 мин раствор сливают, наливают этиловый спирт на 0,5—1 мин. Затем мазок промывают водой и дополнительно окрашивают разведенным 1 : 10 фуксином Циля в течение 1—2 мин. Краску сливают, промывают водой и просушивают мазок фильтровальной бумагой.

2.1.2.12. Для окраски мазков по Козловскому фиксированный мазок окрашивают 2%-ным водным раствором сафранина с подогреванием до появления пузырьков. Затем мазок промывают водой и дополнительно окрашивают 0,75—1%-ным водным раствором малахитовой зелени в течение 0,5—1 мин. Краску сливают, промывают водой, просушивают мазок фильтровальной бумагой.

2.1.2.13. Для окраски мазков по Stamp фиксированный мазок окрашивают в течение 10 мин раствором карболового фуксина Циля в разведении 1 : 10. Затем мазок промывают водой и дифференцируют 0,5%-ным раствором уксусной кислоты в течение 30 с. Вновь тщательно промывают и докрашивают 1%-ным раствором метиленового синего в течение 20—30 с. Краску сливают, промывают водой, подсушивают мазок фильтровальной бумагой.

2.1.2.14. Для проведения посева из патологического материала кожу абортированного плода обжигают с поверхности по белой линии тампонами, смоченными спиртом, стерильными ножницами вскрывают брюшину и грудную клетку и пипеткой Пастера высе-

вают жидкое содержимое грудной, брюшной полостей и желудка плода, а также вырезают кусочки печени и селезенки размером не менее 2,0×1,5×2,5 см. Каждую пробу погружают в спирт и обжигают с поверхности, а затем помещают в стерильный стакан (колбу) гомогенизатора для приготовления взвеси. Для этого в стакан добавляют стерильный физиологический раствор в количестве, равном массе жидкой пробы, и гомогенизируют пробы в электрическом гомогенизаторе. Взвесь пипеткой Пастера по 0,1—0,2 см³ втирают в поверхность предварительно подсушенных плотных сред (в пробирках или чашках). Допускается предварительный высев материала в жидкие питательные среды (в пробирках).

При отсутствии гомогенизатора допускается посев кусочка пробы путем внесения отпечатков разными сторонами пробы на поверхность питательной среды в чашках.

Из плодовой оболочки, плаценты вырезают кусочки менее загрязненный и без некротических участков, обрабатывают стерильным физиологическим раствором, подсушивают стерильным тампоном, обжигают на пламени и готовят из этого материала суспензию в электрическом гомогенизаторе. Суспензию засевают на чашки Петри со средой, содержащей препараты, задерживающие рост посторонней микрофлоры: генцианвиолет 1 : 2000 000 или кристаллический фиолетовый 1 : 100 000, уксуснокислый натрий из расчета 0,125 мг на 1 см³ или паранитрофенилглицерин (0,005—0,007%).

2.1.2.15. Для выращивания посевы помещают в термостат при температуре 37—38°С. При исследовании материала от крупного рогатого скота и баранов половину засеянных пробирок и чашек помещают в эксикатор с содержанием 10—20% CO_2 и выдерживают их в термостате при 37—38°С. Через каждые 3—4 сут пробирки с посевами просматривают визуально, при необходимости через лупу или под малым увеличением микроскопа в отношении роста бруцелл. При отсутствии роста бруцелл все посевы выдерживают в термостате до 20 сут.

2.1.3. *Проведение исследования*

2.1.3.1. Бруцелл обнаруживают тремя методами исследований: бактериоскопией мазков из патологического материала; получением культуры бруцелл на питательных средах и постановкой биологической пробы на морских свинках.

2.1.3.2. При бактериоскопии мазков из патологического материала, приготовленных по п. 2.1.2.10, обращают внимание на форму, размеры и расположение отдельных микробов и способность к элективным окраскам. Характерный вид бруцелл — мелких грамотрицательных, отдельно расположенных, не образующих спор кокко-бактерий, окрашивающихся по Козловскому или Stamp в красный цвет, дает основание к предварительному заключению об обнаружении возбудителя бруцеллеза или инфекционного эпи-

дидимита, которое требует подтверждение выделением чистой культуры или положительной биопробой.

2.1.3.3. При осмотре посевов, проведенных по п. 2.1.2.14, обращают внимание на характер роста микробов. В бульоне бруцеллы образуют равномерное помутнение, а в дальнейшем пристеночное кольцо, возвышающееся над уровнем бульона. В отраженном свете пристеночное кольцо имеет голубоватый оттенок.

Из бульонной культуры делают посев в пробирку с плотной средой и готовят мазки. При микроскопировании препарата обнаруживают характерные для бруцелл кокко-бактерии.

На поверхности плотных питательных сред бруцеллы образуют прозрачные, блестящие, выпуклые, с ровными краями и гладкой поверхностью колонии, имеющие в отраженном свете голубоватый оттенок. С возрастом колонии приобретают более темную окраску, что связано с появлением пигмента.

Подозрительные колонии пересевают на скошенный агар в пробирках и двухсуточные культуры идентифицируют путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму, Козловскому или Stamp, агглютинации на предметном стекле с помощью набора компонентов для серологической дифференциации культур бруцелл. В набор компонентов входят: R—сыворотка агглютинирующая бруцеллезная; S- сыворотка агглютинирующая бруцеллезная; R—антиген бруцеллезный цветной; антиген бруцеллезный для роз бенгал пробы (РБП).

Для проведения пластинчатой реакции агглютинации на стекле с использованием набора компонентов для серологической дифференциации культур бруцелл R и S—сыворотки бруцеллезные агглютинирующие разводят 0,5%-ным карболизированным физиологическим раствором до рабочего разведения, указанного на этикетке. Разведенные сыворотки можно использовать в течение месяца. R—антиген бруцеллезный цветной и антиген бруцеллезный для РБП в пластинчатой РА применяют неразведенными.

На предметное стекло раздельно наносят по одной капле R и S сывороток бруцеллезных агглютинирующих и физиологического раствора. Испытуемую культуру эмульгируют в каплях R и S—сывороток и в капле физиологического раствора. Параллельно в каждом опыте ставят контроль: R—сыворотки в рабочем разведении с антигенами цветными и для роз бенгал пробы;

S—сыворотки в рабочем разведении с цветным бруцеллезным антигеном и с антигеном для РБП.

При положительной РА в течение 1—3 мин в капле сыворотки образуется четко выраженный агглютинат в виде хлопьев или комочков, а сама жидкость просветляется, что особенно заметно при покачивании стекла. В физиологическом растворе (контрольном) наблюдается гомогенная взвесь без признаков просветления жидкости.

Следует учитывать, что реакция с R—сывороткой бруцеллезной проходит замедленно, агглютинат, как правило, мелкозернистый. Результаты дифференциации испытуемых культур считают достоверными, если в контролях R и S—бруцеллезных сывороток с гомологичными антигенами наблюдается четко выраженная агглютинация и отсутствует с гетерологичными. Реакцию с испытуемой культурой считают положительной при наличии 50—100%-ной агглютинации.

При отрицательной реакции агглютинации с культурой из одной колонии дополнительно исследуют еще не менее трех-четырех подозрительных колоний.

Культура возбудителя инфекционного эпидидимита баранов постоянно агглютинируется только R—бруцеллезной сывороткой.

Культуры, обладающие типичными для бруцелл морфологическими, тинкториальными и культуральными свойствами, а также дающие положительную реакцию агглютинации с S или R—бруцеллезными сыворотками одновременно или с одной из них в отдельности при отсутствии самоагглютинации в физиологическом растворе относят к бруцеллам.

2.1.3.4. Для постановки биологической пробы используют тот же материал, что и для бактериологического исследования.

Заражение морских свинок (не менее двух), предварительно проверенных на бруцеллез исследованием сыворотки их крови в реакции агглютинации, проводят подкожно в области паха в дозе 1 $см^3$.

Через 15—30 сут у свинок берут кровь и сыворотку, исследуют на бруцеллез в реакции агглютинации в разведениях 1 : 10—1 : 80.

При положительной РА морских свинок убивают, отмечают патологоанатомические изменения в селезенке, печени и лимфатических узлах и при необходимости исследуют их бактериологически. При отрицательной РА свинку выдерживают до 60 сут, а затем исследуют серологически и бактериологически.

2.1.4. *Оценка результатов*

2.1.4.1. Заболевание бруцеллезом или инфекционным эпидидимитом считают установленным при выделении культуры возбудителя из исследуемого материала или от морской свинки (биопроба), а также при получении у свинки положительной РА 1 : 10 и выше.

2.1.4.2. При положительных результатах бактериоскопии и отрицательных результатах биологического исследования и биопробы материал считают подозрительным в заражении бруцеллами и проводят серологическое и аллергическое исследования животных данной группы.

2.2. Метод серологического исследования

Сущность метода заключается в выявлении в сыворотке крови животного специфических антител к бруцеллезному или овисному антигенам.

Применяют реакции:

роз бенгал проба (РБП) rose Bengal test, реакция агглютинации (РА), реакция связывания комплемента (РСК) или реакция длительного связывания комплемента (РДСК).

2.2.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Баня водяная с терморегулятором.

Комплект инструментов и приспособлений для проведения серологических исследований на бруцеллез крови животных (КИ).

Пластины с лунками полистироловые.

Штативы для пробирок.

Потенциометр или pH-метр.

Центрифуга лабораторная.

Фильтр Зейтца, пластины стерилизующие.

Стекла предметные чистые по ГОСТ 9284.

Пробирки серологические по ГОСТ 25336.

Микропипетки.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$ по ГОСТ 20292.

Кальций хлористый.

Кислота карболовая кристаллическая.

Кислота лимонная.

Кислота борная.

Кислота соляная.

Магний хлористый.

Натрий хлористый.

Натрий гидроокись.

Натрий лимоннокислый.

Антиген бруцеллезный единый для РА, РСК, РДСК.

Антиген бруцеллезный цветной для роз бенгал пробы (РБП).

Набор специфических компонентов для диагностики болезни овец, вызываемой бруцеллой овис (антиген овисный для РДСК, позитивная овисная и негативные сыворотки).

Сыворотка бруцеллезная позитивная.

Сыворотка овисная позитивная .

Гемолизин (гемолитическая сыворотка) по ГОСТ 16445.

Комплемент сухой, консервированный или нативный по ГОСТ 16446.

Эритроциты барана.

D-глюкоза по ГОСТ 6038.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Бруцеллезные антигены для реакции агглютинации (РА), роз бенгал пробы (РБП), реакции связывания комплемента (РСК) или реакции длительного связывания комплемента (РДСК) готовят из штаммов Brucella abortus. Антиген овисный для РДСК из штаммов Brucella ovis.

Антигены для диагностики бруцеллеза стандартизуют по международной сыворотке анти-Brucella abortus, антиген овисный—по полиглобулину.

2.2.2. *Подготовка к исследованию*

2.2.2.1. Для приготовления карболизированного физиологического раствора для постановки РА в 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 8,5 г хлористого натрия и 5 г карболовой кислоты. Раствор доводят до кипения, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр.

2.2.2.2. Для приготовления карболизированного 5%-ного раствора хлористого натрия для постановки РА в 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 50 г хлористого натрия и 5 г карболовой кислоты. Раствор доводят до кипения, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр.

2.2.2.3. Для приготовления разбавителя для постановки РСК и РДСК вначале готовят основные растворы солей магния и кальция следующим образом: 1 г хлористого магния растворяют в 11,8 см³ и 1 г хлористого кальция в 54,4 см³ дистиллированной воды Основные растворы этих солей хранят в холодильнике.

Для изготовления 1 дм³ разбавителя берут: 8,5 г хлористого натрия, 1,2 см³ хлористого магния (основного раствора), 1,2 см³ хлористого кальция (основного раствора) и растворяют в 1 дм³ дистиллированой воды. Смесь кипятят, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и доводят pH до 7,3—7,4 прибавлением раствора гидроокиси натрия или соляной кислоты.

2.2.2.4. Для приготовления раствора Алсивера для консервирования эритроцитов в 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 18,7 г глюкозы, 4,2 г хлористого натрия, 8,0 г лимоннокислого натрия, 0,5 г лимонной кислоты. Раствор доводят до кипения, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы или флаконы и стерилизуют в автоклаве при температуре 102—105°С в течение 30 мин или фильтруют через стерилизующие пластины фильтра Зейтца.

2.2.2.5. Для приготовления эритроцитов барана для постановки РСК и РДСК кровь берут из яремной вены барана (овцы) с соблюдением правил асептики в сосуд, содержащий стеклянные или фарфоровые бусы (для дефибринирования), или сосуд, содержащий раствор Алсивера в количестве, равном объему взятой крови (для консервирования).

Для приготовления эритроцитов используют свежедефибринированную кровь барана или через 6—14 сут после ее консервирования в растворе Алсивера и 2—4 раза (по 15 мин) отмывают на центрифуге при 2000—2500 мин$^{-1}$ в разбавителе до полного обесцвечивания надосадочной жидкости. Для постановки РСК используют 2—5%-ную, а для РДСК — 3—4%-ную взвесь эритроцитов (от осадка) в разбавителе.

2.2.2.6. Для РСК применяют гемолитическую сыворотку в удвоенном, а для РДСК — учетверенном титре, указанном предприятием, ее изготовившем. Для изготовления гемолитической системы смешивают равные объемы рабочих растворов гемолизина и эритроцитов и тщательно перемешивают, после чего оставляют на 15—30 мин для сенсибилизации.

2.2.2.7. Сыворотку получают методом отстоя. Для свертывания крови и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживают от 30 до 60 мин при температуре от 20 до 30°С, а затем при температуре от 4 до 10°С. Через 20—24 ч сыворотку исследуют в течение 6 сут со дня взятия крови или консервируют 5-%-ным раствором карболовой кислоты (1—2 капли на 1 см³ сыворотки) или сухой борной кислоты (2% кислоты к объему сыворотки). Сыворотка крови должна быть прозрачной без признаков гемолиза. Сыворотки, консервированные карболовой кислотой, пригодны для исследования в течение 15 сут, а борной кислотой — 30 сут со дня их консервирования.

2.2.3. *Проведение исследования*

2.2.3.1. РБП проводят при температуре 18—30°С на чистом стекле или сухой эмалированной диагностической пластине с лунками при помощи комплекта инструментов и приспособлений для проведения серологических исследований на бруцеллез крови животных. Цельную (неразведенную) исследуемую сыворотку крови в дозе 0,03 см³ микропипеткой или шприцем-полуавтоматом вносят на край дна лунки. При исследовании крови крупного рогатого скота, верблюдов и лошадей в каждую лунку рядом с сывороткой вносят 0,03 см³ антигена, а при исследовании сыворотки крови овец, коз, свиней и северных оленей — 0,015 см³ антигена при помощи калиброванной пипетки-капельницы (две или одну каплю). Затем антиген смешивают с сывороткой полиэтиленовой или стеклянной палочкой или ручным смесителем на 25 лунок, распределяя ее при этом по всей поверхности лунки, и покачивают пластинку осторожным вращательным движением вручную или на аппарате для покачивания диагностических пластин в течение 4 мин.

При проведении реакции контролем служит постановка розбенгал пробы с негативной и позитивной агглютинирующей сыворотками в тех же дозах, а также контроль антигена на спонтанную агглютинацию (к 0,03 см³ антиген добавляют 0,03 см³ физиологического раствора).

Все компоненты реакции (исследуемая сыворотка и антиген) должны иметь температуру не ниже 18°С.

2.2.3.2. Реакцию агглютинации (РА) проводят в пробирках в объеме 1 см³ или полистироловых пластинах с лунками. В начале в объеме 0,5 см³ готовят разведение испытуемой сыворотки, например, для исследования крупного рогатого скота, верблюдов и ло-

шадей — 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100 и 1 : 200; овец, коз и северных оленей — 1 : 12,5, 1 : 25, 1 : 50 и 1 : 100.

Сыворотки разводят карболизированным физиологическим раствором при исследовании крупного рогатого скота и лошадей; карболизированным 5%-ным раствором хлористого натрия при исследовании сывороток крови овец и коз. Затем в каждую пробирку или лунку добавляют по 0,5 см³ рабочего раствора антигена (1 : 10 в соответствующем разбавителе), при этом конечное разведение испытуемых сывороток удваивается.

Одновременно с постановкой реакции проводят контроль: с негативной сывороткой в тех же разведениях, как и испытуемые, и с позитивной сывороткой до ее титра.

После добавления к испытуемым и контрольным сывороткам антигена пробирки тщательно встряхивают и ставят в термостат при 37—38°С на 16—20 ч, а затем выдерживают 1 ч при комнатной температуре.

2.2.3.3. Реакцию связывания комплемента (РСК) проводят в пробирках в объеме 1 см³ (по 0,2 см³ каждого компонента: сыворотки, антигена, комплемента, гемолизина, эритроцитов барана) или полистироловых пластинках с лунками. Все компоненты реакции разводят в разбавителе, приготовленном в соответствии с п. 2.2.2.3.

Испытуемые сыворотки исследуют в разведениях 1 : 5 и выше с антигеном и 1 : 5 без антигена (контроль). Инактивацию разведенных сывороток крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей и других животных проводят при 58—60°С в течение 30 мин; свиней — при 60°С в течение 50 мин; ослов и мулов — при 64—65°С и буйволов — при 62—65°С в течение 30 мин. Антигены берут в рабочем (удвоенном) титре, эритроциты барана — 2,5% от осадка.

Реакцию связывания комплемента проводят в водяной бане при 37—38°С. Время связывания комплемента - 20 мин, время реакции после добавления гемолитической системы — 20 мин. Для контроля реакции служат: негативная и позитивная бруцеллезные сыворотки в разведении 1 : 5 и выше с антигеном и 1 : 5 без антигена, антиген в двойной дозе без сыворотки.

Для контроля гемолитической системы (приготовленной в соответствии с п. 2.2.2.3) служат 0,6 см³ разбавителя и 0,4 см³ гемолитической системы.

Для постановки основного опыта проводят титрование комплемента (сыворотка крови морской свинки). Титром комплемента считают его наибольшее разведение, давшее полный гемолиз 0,4 см³ гемолитической системы в присутствии негативной сыворотки и антигена в течение 20 мин в водяной бане при температуре 37—38°С. Это разведение принимают за единицу (дозу комплемента). Для постановки основного опыта берут 1,2 дозы комплемента.

Титр каждой серии антигена и гемолизина устанавливают предприятия-изготовители.

2.2.3.4. Реакцию длительного связывания комплемента на холоде (РДСК) проводят в пробирках или полистироловых пластинках с лунками в объеме 1 см³ (по 0,2 см³ каждого компонента: сыворотки, антигена, комплемента, гемолизина, эритроцитов барана).

Все компоненты реакции разводят в разбавителе, приготовленном по п. 2.2.2.3.

Испытуемые сыворотки исследуют в разведениях 1:5 и выше с антигеном и 1:5 без антигена (контроль).

Инактивацию разведенных сывороток всех видов животных проводят при температуре 63—64°С в течение 30 мин. Антиген берут в рабочем (удвоенном) титре, комплемент в разведении 1:25 (при титре в гемсистеме, указанном биопредприятием 0,19—0,22), гемолитическую сыворотку в учетверенном титре, эритроциты барана — 3—4% от осадка (пп. 2.2.2.5 и 2.2.2.6). Время связывания комплемента — 15—18 ч при температуре 4—8°С и 20 мин при комнатной температуре, время реакции после добавления гемолитической системы — 20 мин в водяной бане при температуре 37—38°С.

Контроль реакции: негативная, позитивная бруцеллезная и овисная сыворотки в разведениях 1:5 и выше с антигеном и 1:5 без антигена, антиген в двойной дозе без сыворотки.

Перед разливом гемолитической системы в пробирки (пластины с лунками) проводят титрование гемолитической системы в присутствии негативной сыворотки, антигена и комплемента. Титром гемолитической системы считают наибольшее ее количество, которое в присутствии сыворотки и антигена полностью лизируется комплементом, взятым в реакцию. Это количество принимают за единицу (дозу) гемолитической системы. Для постановки основного опыта берут 0,8 дозы гемолитической системы.

2.2.4. *Оценка результатов*

2.2.4.1. Роз-бенгал пробу считают положительной при наличии выраженной агглютинации антигена в виде мелких или крупных хлопьев розового цвета, наступающей в течение 4 мин. Реакцию агглютинации, появляющуюся позже 4 мин, не учитывают.

Все сыворотки, с которыми получена положительная РБП, в в тот же или на другой день исследуют в РА и РСК (РДСК) для установления титра агглютининов и наличия комплемент связывающих антител.

Животных с положительной РА или РСК (РДСК) считают больными бруцеллезом. Животных, с сыворотками которых получена положительная РБП при отрицательных показаниях РА или РСК (РДСК), подвергают повторному исследованию через 15—30 сут.

При получении положительных или вновь сомнительных показаний реакций результат исследования оценивают положительно.

2.2.4.2. Результаты реакции агглютинации учитывают через 1 ч визуально и оценивают в крестах по следующей схеме:

++++ — полное просветление жидкости, бруцеллы осели на дно пробирки в виде «зонтика» (100% агглютинации);

+++ — неполное просветление жидкости и хорошо выраженный «зонтик» (75% агглютинации);

++ — просветление жидкости и «зонтик» умеренно выражен (50% агглютинации);

+ — едва заметное просветление, «зонтик» выражен очень слабо (25% агглютинации);

— — просветление жидкости и образование «зонтика» не наступило, на дне пробирки виден «пунктик» осевшего антигена, при легком встряхивании образуется равномерная взвесь микробов.

За титр антител принимают наибольшее разведение сыворотки, в котором произошла 50%-ная агглютинация (2 креста), что соответствует количеству международных единиц антител в 1 см³ сыворотки (МЕ/см³).

Реакцию агглютинации считают положительной:

у овец, коз и северных оленей — при получении 50 МЕ/см³ и больше;

у крупного рогатого скота, верблюдов и лошадей — при получении 100 МЕ/см³ и больше.

За сомнительный результат считают:

у овец, коз и северных оленей — 25 МЕ/см³;

у крупного рогатого скота, верблюдов и лошадей — 50 МЕ/см³.

Животные, с сыворотками крови которых получена сомнительная РА, подлежат повторному исследованию на бруцеллез через 15—30 сут.

На неблагополучных по бруцеллезу фермах положительно реагирующими считают животных, при исследовании которых получена дважды сомнительная РА.

2.2.4.3. Результаты РСК и РДСК учитывают визуально через 4—6 ч после окончания постановки или на следующий день при условии хранения штативов с реакцией при температуре 4—8°С. Реакцию оценивают в крестах по следующей схеме:

++++ — отсутствие гемолиза, надосадочная жидкость прозрачна и бесцветна;

+++ — 25% гемолиза эритроцитов;

++ — 50% гемолиза эритроцитов;

+ — 75% гемолиза эритроцитов;

— — полный лизис, осадка эритроцитов не видно, жидкость интенсивно окрашена гемоглобином.

Реакцию связывания комплемента и реакцию длительного связывания комплемента считают положительной при задержке гемолиза на 2—4 креста в одном или нескольких разведениях сыворотки (1:5 и выше) и полном гемолизе эритроцитов в контроле (без антигена).

Задержку гемолиза в один крест считают за сомнительный результат и животных через 15—30 сут исследуют повторно. При этом животных, с сывороткой крови которых получена дважды сомнительная РСК (РДСК), считают реагирующими положительно.

2.3. Метод аллергического исследования

Сущность метода заключается в выявлении у животных, больных бруцеллезом и инфекционным эпидидимитом, повышенной чувствительности замедленного типа к специфическому антигену (аллергену).

Аллергический метод применяют для исследования на бруцеллез крупного рогатого скота, свиней и северных оленей, не подвергавшихся иммунизации вакцинами против бруцеллеза, а при инфекционном эпидидимите баранов — через 12 мес после вакцинации.

2.3.1. *Аппаратура, реактивы и материалы*

Инъектор безыгольный для внутрикожного введения.

Иглы инъекционные по ГОСТ 25377.

Шприцы вместимостью 2 и 5 $см^3$ по ГОСТ 22967.

Спирт этиловый, 96%-ный по ГОСТ 5962.

Аллерген бруцеллезный — бруцеллин ВИЭВ, стандартизованный по референтному аллергену.

Аллерген для диагностики инфекционного эпидидимита баранов — бруцелловин.

2.3.2. *Проведение исследований*

Аллергены вводят животным с соблюдением правил асептики подкожно несколько ниже края века со стороны наружного угла глаза (пальцебральная проба), овцам и козам по 0,5 $см^3$, а крупному рогатому скоту 1 $см^3$ или внутрикожно в середину подхвостовой складки по 0,2—0,3 $см^3$ (внутрикожная проба).

Свиньям бруцеллезный аллерген вводят с наружной стороны ушной раковины, ближе к основанию уха внутрикожно по 0,2 $см^3$. Правильность внутрикожной инъекции препарата контролируют по образованию бугорка размером с горошину.

При внутрикожном введении аллергена целесообразно использовать безыгольный инъектор для внутрикожного введения.

Аллергическую пробу у овец, коз и крупного рогатого скота учитывают один раз через 48 ч после введения аллергена. У свиней реакцию учитывают два раза — через 24 и 48 ч после введения аллергена.

2.3.3. *Оценка результатов*

Аллергическую пробу считают положительной, если на месте инъекции аллергена возникает воспалительный (плотный или тестоватый) отек, видимый при осмотре или определяемый при пальпации места введения препарата.

У здоровых и невакцинированных против бруцеллеза животных при учете реакции на аллерген в указанные сроки на месте его введения никаких изменений не отмечается.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Главным управлением ветеринарии при Госкомиссии Совмина СССР по продовольствию и закупкам

РАЗРАБОТЧИКИ

К. В. Шумилов, У. Э. Ниязов, А. И. Климанов

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 27.12.91 № 2240

3. Срок проверки — 1996 г.

4. ВЗАМЕН ГОСТ 25385—82

5. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 61—75	2.1.1
ГОСТ 908—79	2.1.1
ГОСТ 2080—76	2.1.1
ГОСТ 3118—77	2.1.1
ГОСТ 4204—77	2.1.1
ГОСТ 4233—77	2.1.1
ГОСТ 4328—77	2.1.1
ГОСТ 5962—67	2.1.1; 2.3.1
ГОСТ 6038—79	2.1.1; 2.2.1
ГОСТ 6259—75	2.1.1
ГОСТ 6709—72	2.1.1; 2.2.1
ГОСТ 9284—75	2.1.1; 2.2.1
ГОСТ 13805—76	2.1.1
ГОСТ 16280—88	2.1.1
ГОСТ 16445—78	2.2.1
ГОСТ 16446—78	2.2.1
ГОСТ 17206—84	2.1.1
ГОСТ 20292—74	2.1.1; 2.2.1
ГОСТ 22280—76	2.1.1
ГОСТ 22967—82	2.3.1
ГОСТ 24363—80	2.1.1
ГОСТ 25336—82	2.1.1; 2.2.1
ГОСТ 25377—82	2.3.1

Редактор *Т. И. Василенко*
Технический редактор *Г. А. Теребинкина*
Корректор *И. Л. Асауленко*

gost.e-ecolog.ru

Сдано в наб. 27.01.92 Подп. в печ. 09.03.92 Усл. п. л. 1,25 Усл. кр.-отт. 1,25. Уч.-изд. л. 1,18. Тир. 428

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, ГСП, Новопресненский пер., 3
Тип. «Московский печатник», Москва, Лялин пер., 6. Зак. 883