ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ, СИНАНТРОПНАЯ, ДИКАЯ И ЭКЗОТИЧЕСКАЯ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА

ГОСТ 25581—91

Издание официальное

24 руб. БЗ 9—91/1009

КОМИТЕТ СТАНДАРТИЗАЦИИ И МЕТРОЛОГИИ СССР
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 636.5.001.4 : 006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ, СИНАНТРОПНАЯ, ДИКАЯ И ЭКЗОТИЧЕСКАЯ

Методы лабораторной диагностики гриппа

ГОСТ 25581—91

Birds, poultry, synanthropos, game and exotic. Methods of Avian Influenza laboratory diagnostics

ОКСТУ 9209

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на сельскохозяйственную, синантропную, дикую и экзотическую птицу и устанавливает методы лабораторной диагностики гриппа.

1. ОТБОР ПРОБ

1.1. Для проведения исследований отбирают пробы патологического материала:

головной мозг и селезенку или гортанные и клоакальные смывы от больной птицы в первые два дня заболевания или от птицы в агональном состоянии. Патологический материал помещают в термос со льдом или раствор глицерина с массовой долей 50 %, приготовленный на физиологическом растворе с pH 7,2—7,4;

сыворотку крови больной и переболевшей птицы в количестве 1—2 $см^3$ (не менее 20 проб).

1.2. Пробы крови для определения антител в сыворотке берут стерильно из подкрыльцовой вены в пробирки, увлажненные физиологическим раствором. Кровь выдерживают до образования сгустка при комнатной температуре или термостате при 37 °С в течение 1—2 ч, затем осторожно обводят иглой или пастеровской пипеткой по стенке пробирки и оставляют на 16—18 ч при температуре 2—4 °С Образовавшуюся прозрачную без гемолиза сыворотку отсасывают пипеткой в стерильные пробирки.

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1992

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

Для ретроспективной диагностики используют парные пробы сывороток крови, полученные от больных и подозреваемых в заболевании птиц в начале заболевания и через 4—10 сут.

1.3. Пробы патологического материала и сыворотку крови доставляют в лабораторию в термосе со льдом. К пробам прилагают сопроводительный документ, содержащий сведения о клинике, эпизоотологии заболевания, а также данные о результатах вскрытия трупов.

1.4. До начала лабораторного исследования патологический материал хранят в рефрижераторе при температуре 2—4 °С не более 24 ч.

1.5. Сыворотку крови исследуют в течение 3 сут со дня взятия крови. В случае исследования сыворотки в более поздние сроки ее замораживают или консервируют путем добавления мертиолата натрия до концентрации 1 : 10000.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. **Метод выделения вируса**

Сущность метода заключается в выделении вируса на эмбрионах кур и последующей его идентификации.

2.1.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Термостат с температурой нагрева 37—38 °С.

Центрифуга с частотой вращения 3000 $мин^{-1}$.

Центрифужные стаканы вместимостью 50—100 $см^3$.

Весы лабораторные с погрешностью взвешивания не более 0,1 г.

Размельчитель тканей.

Овоскоп.

Колбы конические стеклянные вместимостью 100 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Пробирки стеклянные вместимостью 10, 15, 20 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Пипетки пастеровские или пипетки стеклянные измерительные вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$ по ГОСТ 20292.

Ступка фарфоровая.

Шприцы с иглами.

Стекло кварцевое.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, раствор с массовой долей 0,8 % или другие дезинфицирующие средства.

Натрий лимонно-кислый 3-х замещенный по ГОСТ 22280, раствор с массовой долей 5 %.

Йод по ГОСТ 4159, раствор с массовой долей 5 % на физиологическом растворе.

Антибиотики — пенициллин и стрептомицин.

Среды питательные МПБ и МПА.

Парафин.

Развивающиеся эмбрионы кур 9—10-суточного возраста.

Эритроциты кур на физиологическом растворе, 0,7 и 1 %-ная взвесь, которую готовят следующим образом: кровь берут у петухов или кур в возрасте старше 6 мес из подкрыльцовой вены в колбу с физиологическим раствором в равных объемах с раствором лимонно-кислого натрия.

Полученную кровь трижды отмывают физиологическим раствором, осаждая эритроциты центрифугированием с частотой вращения 1500^{-1} в течение 10 мин. Из осадка эритроцитов готовят 0,7 или 1 %-ную суспензию на физиологическом растворе и хранят не более 5 сут при температуре 4 °С.

2.1.2. *Подготовка к исследованию.*

2.1.2.1. Обработка органов патологического материала

Патологический материал стерильно извлекают из глицеринового раствора, трехкратно ополаскивают стерильным физиологическим раствором и гомогенизируют с помощью размельчителя тканей или размельчают в ступке с кварцевым стеклом. Гомогенат разводят 1 : 10 стерильным физиологическим раствором и центрифугируют с частотой вращения $1500—2000^{-1}$ в течение 15 мин. Надосадочную жидкость переносят в стерильные пробирки, добавляют 1000 ед/см^3 стрептомицина и выдерживают при комнатной температуре 60 мин.

2.1.3. *Проведение исследования*

Для исследования одной пробы материала (надосадочная 10 %-ная суспензия) заражают не менее 10 эмбрионов. Перед заражением эмбрионы предварительно овоскопируют, отмечая границу пуги и участок между кровеносными сосудами для прокола скорлупы и инокуляции исследуемого материала. Скорлупу со стороны пуги и место прокола дезинфицируют раствором йода и фламбируют. В центре воздушного пространства и в месте введения исследуемого материала делают пробойником отверстия, затем через боковое отверстие вводят 0,2 см^3 исследуемого материала на глубину 2—3 мм в аллантоисную полость. Одновременно делают его высевы по 0,2 см^3 на питательные среды МПБ и МПА, которые помещают в термостат при 37—38 °С. Контролем служат 5 незараженных эмбрионов. После заражения эмбрионов отверстия в скорлупе заливают парафином. Зараженные и контрольные эмбрионы инкубируют в термостате в течение 24—96 ч при температуре 37—38 °С и относительной влажности 60—70 %. В процессе инкубации эмбрионы овоскопируют два раза в сутки, погибшие — сохраняют в холодильнике при 4 °С. Через 96 ч инкубации все эмбрионы вскрывают после предварительного охлаждения в холодильнике при 4 °С в течение 10—12 ч.

Перед вскрытием эмбрионов скорлупу обрабатывают йодом и фламбируют и из каждого эмбриона отдельно собирают экстраэмбриональную жидкость в стерильные пробирки, которую высевают на МПБ и МПА и проверяют на гемагглютинирующую активность вируса в капельной реакции гемагглютинации (РГА). Реакцию ставят на стекле путем смешивания равных капель экстраэмбриональной жидкости с 1 %-ной взвесью эритроцитов кур. При отрицательной РГА образцы экстраэмбриональной жидкости в количестве 1—2 см³ от каждого зараженного эмбриона (не менее 5 эмбрионов) объединяют и вновь заражают не менее 10 эмбрионов.

Выделение вируса проводят в течение 3-х пассажей на куриных эмбрионах, проверяя в каждом пассаже экстраэмбриональную жидкость на наличие гемагглютининов в капельной РГА. Если титры гемагглютининов низкие, проводят еще 2—3 дополнительных пассажа.

2.1.4. *Обработка результатов*

Результат исследования пробы патологического материала считают отрицательным, если в трех дополнительных пассажах не будет обнаружено гемагглютинации эритроцитов.

При наличии гемагглютинации эритроцитов проводят идентификацию выделенного вируса.

2.2. **Метод постановки реакции гемагглютинации**

Сущность метода заключается в способности вируса гриппа птиц агглютинировать эритроциты кур.

2.2.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

2.2.1.1. Аппаратура, материалы и реактивы — по п. 2.1.1 и дополнительно:

микротитратор типа Такачи или аналогичный;

микропипетки;

панели из плексигласа.

2.2.2. *Проведение исследования*

Готовят двукратные разведения вирусосодержащего материала (надосадочную жидкость, полученную после обработки патологического материала как указано в п. 2.1.2.1.) от 1 : 2 до 1 : 1024. Для этого в ряд лунок панелей из плексигласа наливают физиологический раствор в объеме 0,2 см³. В первую лунку вносят 0,2 см³ вируса, трехкратно пипетируют и переносят 0,2 см³ во вторую лунку и т. д. до требуемого разведения. Из последней лунки 0,2 см³ удаляют в дезинфицирующий раствор. В каждую лунку добавляют по 0,2 см³ 1 %-ной суспензии куриных эритроцитов. Панели встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин.

Контролем служат две лунки с эритроцитами и физиологическим раствором в равных объемах по 0,2 см³ каждого. Реакцию гемагглютинации и реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) ставят также с использованием микротитраторов или микропипе-

ток в объеме 0,025 см³ в плексигласовых панелях с лунками с 0,7 %-ной суспензией эритроцитов.

2.2.3. *Обработка результатов*

Наличие на дне и стенках лунок осадка эритроцитов в виде опрокинутого «зонтика» свидетельствует о положительной РГА. При отрицательной реакции в опыте и контроле эритроциты образуют на дне лунки диск с ровными краями.

Титром вируса считают предельное разведение его, при котором наблюдается полная агглютинация эритроцитов, что соответствует одной агглютинирующей единице (1 АЕ).

2.3. Метод идентификации вируса

Сущность метода заключается в способности специфических антител нейтрализовать гемагглютинирующую активность вируса в реакции торможения гемагглютинации со специфическими гриппозными сыворотками.

2.3.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

2.3.1.1. Аппаратура, материалы и реактивы — по п. 2.2.1 и дополнительно:

набор сухих инактивированных антигенов вируса гриппа тринадцати серологических вариантов и гипериммунных сывороток для диагностики гриппа птиц;

аппарат Киппа;

баня водяная;

мел или мрамор;

кислота соляная по ГОСТ 3118 с массовой долей 30 %.

2.3.2. *Проведение исследования*

После определения титра исследуемого вируса в количественной РГА по п. 2.2.1 ставят РТГА. Вначале устанавливают рабочую дозу вируса (4 АЕ), для чего вирус разводят физиологическим раствором во столько раз, сколько получится от деления на 4 обратного значения гемагглютинирующего титра вируса. Например: если титр вируса 1 : 256, то рабочее разведение будет 256 : 4 = = 64, т. е. в 0,2 см³ разведенного 1 : 64 вируса будет содержаться 4 АЕ. Для его приготовления в данном примере берут 63 см³ физиологического раствора и 1 см³ исходного вируса.

Перед постановкой основного опыта проверяют правильность выбора 4 АЕ. Для этого на панели в четыре лунки наливают по 0,2 см³ физиологического раствора, затем в первую лунку добавляют 0,2 см³ 4 АЕ вируса и после пипетирования 0,2 см³ переносят во вторую лунку, затем в третью и т. д. Из четвертой лунки 0,2 см³ разведенного вируса удаляют в дезинфицирующий раствор. Таким образом, в первой лунке должно быть 2 АЕ, во второй — 1 АЕ, в третьей 0,5 АЕ, в четвертой — 0,25 АЕ. После этого в каждую лунку добавляют по 0,2 см³ 1 %-ной суспензии эритроцитов. Панель встряхивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. При правильном определении рабочей дозы (4 АЕ) в пер-

вой и второй лунках должна быть полная агглютинация, в третьей — частичная агглютинация, в четвертой — четко выраженный диск («пуговица») осевших эритроцитов.

Если в третьей лунке оказывается полная агглютинация, то это означает, что выбранная доза вируса содержит не 4 АЕ, а больше. В этом случае доза должна быть уменьшена. И наоборот, отсутствие агглютинации во второй и частично в третьей лунках свидетельствует о недостаточности вируса. Увеличивают или уменьшают рабочую дозу, добавляя соответственно вирус или физиологический раствор и затем повторно проверяют правильность выбора 4 АЕ.

2.3.3. Для постановки основного опыта в ряд лунок, начиная со второй, наливают по 0,2 см³ физиологического раствора. Затем в первую и вторую лунки добавляют по 0,2 см³ специфической сыворотки. Во второй лунке смесь пипетируют и переносят 0,2 см³ в третью лунку и т. д. до требуемого разведения. После этого во все лунки вносят по 0,2 см³ рабочего разведения вируса (4 АЕ). Панели встряхивают и после 30-минутного контакта сыворотки с вирусом в каждую лунку добавляют по 0,4 см³ 1 %-ной суспензии эритроцитов.

Для точности учета РТГА ставят контроль:

сыворотки (0,2 см³ сыворотки + 0,2 см³ физиологического раствора и 0,4 см³ 1 %-ной суспензии эритроцитов);

эритроцитов на спонтанную агглютинацию (0,2 см³ физиологического раствора ± 0,2 см³ 1 %-ной суспензии эритроцитов).

2.3.4. *Обработка результатов*

РТГА считают положительной, а идентификацию вируса завершенной, если специфическая сыворотка тормозит гемагглютинирующую активность вируса не менее 1/4—1/8 титра, указанного на этикетке ампулы (флакона).

2.4. Метод выявления специфических антител

Сущность метода заключается в обнаружении специфической способности антител сыворотки крови больных и переболевших птиц подавлять гемагглютинирующую активность вируса в РТГА. С этой целью исследуют в РТГА с диагностическими антигенами вируса гриппа не менее 20 проб сыворотки крови от каждой обследуемой партии птиц.

2.4.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Аппаратура, материалы и реактивы — по пп. 2.1.1, 2.3.1 и дополнительно:

глицерин,

лед сухой.

2.4.2. *Подготовка к исследованию*

Исследуемые сыворотки предварительно разводят в соотношении 1 : 5 дистиллированной водой. Для удаления термолабильных ингибиторов сыворотки прогревают в водяной бане при 60 °С в

течение 30 мин. В ампулы (флаконы) с антигенами добавляют физиологический раствор (pH 7,2—7,4) согласно «Наставлению по применению набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц».

2.4.3. *Проведение исследования*

Вначале готовят двухкратное разведение сыворотки на физиологическом растворе, начиная с разведения 1 : 5. Далее ставят РТГА, как указано в п. 2.3.

При обнаружении в сыворотке крови титров антител 1 : 10 и выше, ее освобождают от неспецифических термостабильных ингибиторов с целью подтверждения наличия специфических антител к вирусу гриппа. Для удаления термостабильных ингибиторов через разведенную и прогретую сыворотку крови пропускают углекислый газ из аппарата Киппа или добавляют кусочки сухого льда. Обработку сыворотки ведут в течение 2—3 мин. Образовавшийся осадок удаляют центрифугированием в течение 10 мин с частотой вращения 1500^{-1}. Надосадочную жидкость исследуют в РТГА.

2.4.4. *Обработка результатов*

Титром антител в сыворотке считают ее последнее разведение, давшее полную задержку гемагглютинации с исследуемым антигеном.

Выявление титра антител 1 : 10 и выше, но не менее, чем в 30 % исследованной сыворотки является основанием для постановки диагноза, который должен быть подтвержден положительным результатом вирусологических исследований.

2.5. **Метод ретроспективной диагностики**

Сущность метода заключается в обнаружении достоверного прироста уровня специфических антител, обусловленного естественным развитием гриппозной инфекции в организме зараженных птиц.

2.5.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Аппаратура, материалы и реактивы — по п. 2.2.1.1.

2.5.2. *Проведение исследований*

Исследуют парные сыворотки, полученные в первые 1—2 сут в начале заболевания и через 4—10 сут после первого взятия крови. Сыворотку крови освобождают от ингибиторов как указано в п. 2.4. РТГА ставят с выделенным вирусом или с антигенами диагностического набора по пп. 2.3 и 2.4 с учетом эпизоотической обстановки по циркуляции того или иного серологического варианта вируса гриппа.

2.5.3. *Обработка результатов*

Четырехкратное и более увеличение титров антител в парных сыворотках является основанием для установления положительного диагноза.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** Московской ветеринарной академией им. К. И. Скрябина и Всесоюзным государственным научно-контрольным институтом ветеринарных препаратов

РАЗРАБОТЧИКИ

Н. Г. Осидзе, д-р биол. наук; **В. И. Смоленский**, канд. вет. наук

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 30.09.91 № 1575

3. **Срок проверки — 1996 г., периодичность проверок — 5 лет**

4. **ВЗАМЕН ГОСТ 25581—83**

5. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 1770—74	2.1.1
ГОСТ 3118—77	2.3.1.1
ГОСТ 4159—79	2.1.1
ГОСТ 4233—77	2.1.1
ГОСТ 20292—74	2.1.1
ГОСТ 22280—76	2.1.1
ГОСТ 25336—82	2.1.1

Редактор *В. М. Лысенкина*
Технический редактор *Г. А. Теребинкина*
Корректор *О. Я. Чернецова*

Сдано в наб. 15.10.91 Подп. в печ. 27.01.92 Усл. п. л. 0,625 Усл. кр.-отт. 0,63 Уч.-изд. л. 0,56 Тир. 383.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, ГСП, Новопресненский пер., 3
Калужская типография стандартов, ул. Московская, 256. Зак. 1048

gost.e-ecolog.ru