УДК 636 : 576.8.07 : 006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ

Методы лабораторной диагностики инфекционного бронхита

Agricultural poultry.
Methods of laboratory diagnostics
of infectious bronchitis

ГОСТ 25583—83

(СТ СЭВ 1744—79)

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 6 января 1983 г. № 18 срок действия установлен

с 01.07.83
до 01.07.88

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на кур и устанавливает методы лабораторной диагностики инфекционного бронхита.

Стандарт применяют при диагностировании заболевания птицы в лабораториях ветеринарных научно-исследовательских учреждений.

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 1744—79.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для вирусологического исследования берут пробы тканей и органов — трахеи, слизистой оболочки носовой полости, почек и легких убитой или только что павшей птицы, а от взрослой птицы — почек и яйцеводов.

1.2. Для серологического исследования берут не менее чем от 10 голов птицы дважды с интервалом 14—21 сут пробы крови по 5 $см^3$ от каждой птицы. Отстаивают сыворотку крови.

1.3. Пробы органов и тканей или их 10%-ную суспензию хранят при температуре минус 20°С. Пробы сыворотки крови хранят без добавления консервантов при температуре минус 20°С.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Вирусологический метод

Сущность метода заключается в изолировании и идентификации возбудителя заболевания на куриных эмбрионах или на культуре клеток.

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

gost.e-ecolog.ru

2.1.1. *Аппаратура и материалы*

Для проведения исследования применяют:
термостат с температурой нагрева 37—38°С;
инкубатор;
ступки фарфоровые;
центрифугу с частотой вращения 3000 об/мин;
пробирки стеклянные вместимостью 10, 15 и 20 см³ по ГОСТ 10515—75;
овоскоп;
шприцы с иглами;
куриные эмбрионы 9-суточного возраста;
культуру клеток почек куриных эмбрионов или фибробласты;
раствор Хенкса;
стрептомицин, пенициллин.

2.1.2. *Подготовка к исследованию*

Пробы органов и тканей растирают в стерильной ступке в изотоническом буферном растворе в соотношении 1 : 10 и экстрагируют в течение 2 ч при 4°С. Суспензию центрифугируют с частотой вращения от 1500 до 2000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость обрабатывают 2000 ЕД/см³ пенициллина и 2 ЕД/см³ стрептомицина.

2.1.3. *Проведение исследования*

Обработанную антибиотиками надосадочную жидкость инокулируют в дозе 0,2 см³ через воздушную камеру в аллантоисную полость шести куриным эмбрионам 9-суточного возраста.

Зараженные эмбрионы инкубируют при 37,5°С и относительной влажности 60—70% и два раза в день овоскопируют. Эмбрионы, погибшие в течение 24 ч после заражения, не учитывают. Оставшихся в течение 72 ч трех живых эмбрионов убивают охлаждением при температуре 4°С, а остальных собирают и охлаждают через 7 сут после заражения. От первых трех эмбрионов собирают аллантоисную жидкость и хориоаллантоисную оболочку для следующего пассажа, а остальные эмбрионы исследуют на наличие макроскопических изменений.

Проводят четыре последовательных пассажа вируса на куриных эмбрионах, так как первый пассаж в большинстве случаев не вызывает гибели или изменения эмбрионов.

Идентификацию вируса проводят на 9-суточных куриных эмбрионах в реакции нейтрализации (РН), используя известные специфические антисыворотки как минимум к двум основным серотипам вируса (Massachusets, Connecticut) с индексом нейтрализации антисывороток более 3 lg (см. п. 2.2.3.1), или в реакции нейтрализации в культуре клеток почек куриных эмбрионов или фибробластов (см. п. 2.2.3.2).

2.1.4. *Обработка результатов*

2.1.4.1. Вирус считают идентифицированным и результат положительным, если эмбрионы, инокулированные смесью испытываемого вируса со специфической антисывороткой, остаются живыми и развиваются нормально, а эмбрионы, инокулированные только испытываемым вирусом, погибают или отстают в развитии; у эмбрионов наблюдается перекручивание тела, сворачивание тела в шар, уменьшается количество амниотической жидкости, оболочки плотно прилегают к эмбриону.

В культуре клеток при положительной реакции специфическая антисыворотка ингибирует цитопатический эффект, вызванный вирусом инфекционного бронхита.

2.1.4.2. При получении отрицательного результата в реакции нейтрализации (это может быть связано с неспецифичностью используемой антисыворотки к присутствующему серотипу вируса— Massachusets, Connecticut) проводят реакцию преципитации в агаровом геле (РПАГ) по п. 2.2.3.3.

2.2. Серологический метод

Сущность метода заключается в выявлении у переболевшей птицы специфических антител в реакции нейтрализации (РН) и реакции преципитации в агаровом геле (РПАГ).

2.2.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Для проведения исследования применяют:

баню водяную;

термостат с температурой нагрева 37—38°С;

центрифугу с частотой вращения 3000 об/мин;

пробирки вместимостью 10, 15 и 20 см³ по ГОСТ 25336—82;

пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ по ГОСТ 20292—74;

чашки Петри по ГОСТ 25336—82;

штамп для изготовления лунок в агаре;

воронку по ГОСТ 25336—82;

пенициллин;

стрептомицин;

агар очищенный;

мединал;

куриные эмбрионы 9-суточного возраста;

культуры клеток почек куриных эмбрионов, выращенные на среде с 10%-ной телячьей сывороткой;

среды питательные для культуры клеток;

антисыворотки типоспецифические к инфекционному бронхиту, положительные;

штаммы эталонные вирусов инфекционного бронхита разных антигенных типов;

натрий хлористый по ГОСТ 4233—77, 0,87%-ный раствор;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

2.2.2. *Подготовка к исследованию*

Пробы сыворотки крови инактивируют прогреванием при температуре 56°С в течение 30 мин. Загрязненную сыворотку фильтруют через бактериальные фильтры или обрабатывают антибиотиками.

2.2.3. *Проведение исследования в реакции нейтрализации на куриных эмбрионах*

2.2.3.1. В реакции используют вирус с титром не ниже 10^7 ЭИД 50/1 $см^3$. Готовят серийные десятикратные разведения вируса от 10^{-3} до 10^{-8}. Равные количества разведенного вируса, специфических антисывороток и испытываемых сывороток крови смешивают и смесь оставляют на 1 ч при комнатной температуре.

Каждым разведением инокулируют по четыре куриных эмбриона 9-суточного возраста в аллантоисную полость в дозе 0,2 $см^3$. Инокулированные куриные эмбрионы овоскопируют ежедневно в течение 3—8 сут (в зависимости от используемого штамма); погибшие эмбрионы в течение первых 24 ч не учитывают.

2.2.3.2. *Обработка результатов*

По истечении 3—8 сут определяют инфекционный статус каждой группы инокулированных куриных эмбрионов и вычисляют $ИД_{50}$. Разница между логарифмами титра контрольного ряда вируса и титра смеси вируса с испытываемой сывороткой выражает индекс нейтрализации.

При значениях индекса нейтрализации от 0,0 до 1,0 результат реакции считают отрицательным, от 1,1 до 2,0 — сомнительным, от 2,1 и выше — положительным.

Если для 20 и более процентов испытываемых сывороток крови получится сомнительный результат, исследование проводят в реакции преципитации в агаровом геле. При получении сомнительных результатов проводят исследование сывороток крови, полученных при повторном взятии крови от птицы на 14—21 сут. Вируснейтрализующие антитела образуются через 2—3 недели после вспышки заболевания и сохраняются пожизненно, а преципитирующие антитела — от 2 до 7 недель после начала заражения.

2.2.4. *Проведение исследования в реакции нейтрализации на культурах клеток*

2.2.4.1. Берут свежеполученную культуру клеток при образовании сплошного монослоя и адаптированный к культурам клеток вирус с титром 5—5,5 ед/$см^3$.

Готовят серийные 10-кратные разведения вируса до 10^{-6}. Каждое разведение вируса смешивают с равным количеством типоспецифической сыворотки. Если в реакции используются кроличьи контрольные сыворотки (положительная и отрицательная), их разводят до 10^{-1}, так как неразведенные сыворотки вызывают неспе-

цифическое гранулирование цитоплазмы клетки. Разведение сыворотки учитывают при вычислении индекса нейтрализации. Для каждого разведения вируса и смеси вируса с сывороткой берут по четыре пробирки. Разведения вируса и смеси вируса с сывороткой вносят в каждую пробирку в объеме 0,1 см³, адсорбируют в течение 30—40 мин при комнатной температуре, а затем добавляют поддерживающую среду в объеме 0,9 см³, содержащую 2,5% телячьей сыворотки, и инкубируют при 37,5°С в течение 6 сут.

2.2.4.2. *Обработка результатов*

Учет реакции ведут по цитопатическому действию вируса. Разница логарифмов титра вируса и смеси вируса с сывороткой считается индексом нейтрализации. Результат реакции определяют по п. 2.2.3.2.

2.2.5. *Проведение исследования в реакции преципитации в агаровом геле*

2.2.5.1. Очищенный агар от 1,1 до 1,5%, содержащий 8% хлористого натрия и имеющий pH 7,6—7,8, наливают в чашки Петри. Штампом делают лунки (углубления) диаметром 4 или 6 мм на расстоянии 4 мм друг от друга. На дно каждой лунки наносят каплю расплавленного агара; антиген получают из гомогенезированных хориоаллантоисных оболочек (ХАО) погибших куриных эмбрионов, инокулированных адаптированным к ним штаммом. Выбирают только те ХАО, которые показывают четкую и сильно выраженную реакцию с преципитирующей специфической антисывороткой; сыворотки — контрольные (положительная и отрицательная) и испытуемые должны быть в нативном состоянии и не инактивированными. Чашки Петри выдерживают во влажной камере при температуре 37°С или при комнатной температуре в течение 24—72 ч.

Кроме контрольной положительной и отрицательной сывороток, в РПАГ ставят и контроль на антиген, изготовленный из гомогената ХАО незараженных куриных эмбрионов того же самого возраста.

2.2.5.2. *Обработка результатов*

Появление линии преципитации между антигеном и сыворотками свидетельствует о положительном результате.

Небольшой процент положительных результатов в реакции преципитации в агаровом геле выявляют в том случае, если заражение птиц происходило за 2—7 недель до исследования.

Если устанавливают большой процент преципитирующих сывороток, стадо птицы считают неблагополучным по инфекционному бронхиту.

Изменение № 1 ГОСТ 25583—83 Птица сельскохозяйственная. Методы лабораторной диагностики инфекционного бронхита

Утверждено и введено в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 17.03.88 № 596

Дата введения 01.07.88

Под наименованием стандарта проставить код: ОКСТУ 9809.

По всему тексту стандарта заменить единицу: об/мин на мин$^{-1}$.

Пункт 2.1.1. Заменить ссылку: ГОСТ 10515—75 на ГОСТ 25336—82.

Пункт 2.1.2. Заменить слова: «изотоническом буферном» на «физиологическом». «Надосадочную жидкость обрабатывают 2000 ЕД/см^3 пенициллина и 2 ЕД/см^3 стрептомицина» на «В надосадочную жидкость добавляют 2000 ЕД/см^3 пенициллина и 2 мг/см^3 стремтомицина, выдерживают при комнатной температуре 1 ч и делают высевы на питательные среды».

Пункт 2.1.3. Третий абзац. Заменить слово: «четыре» на «шесть».

(Продолжение см. с 350)

(Продолжение изменения к ГОСТ 25583—83)

Пункт 2.1.4.2 исключить.

Пункт 2.2.1. Двенадцатый абзац дополнить словами: «или агар Дифко».

Пункт 2.2.5.1. Первый абзац после слов «Очищенный агар» дополнить словами: «или агар Дифко».

(ИУС № 6 1988 г.)

gost.e-ecolog.ru