25381-82

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

МЕЛКИЙ РОГАТЫЙ СКОТ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗНОГО АБОРТА ОВЕЦ

ГОСТ 25381–82
(СТ СЭВ 2699–80)

Издание официальное

Цена 3 коп.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

РАЗРАБОТАН Министерством сельского хозяйства СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

В. В. Гуненков, Л. М. Шалома, Г. Д. Кузнецова

ВНЕСЕН Министерством сельского хозяйства СССР

УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 11 августа 1982 г. № 3152

Редактор *Н. Е. Шестакова*
Технический редактор *Г. А. Макарова*
Корректор *А. В. Прокофьева*

Сдано в наб. 24.08.82 Подп. в печ 17.09.82 0,5 п. л. 0,43 уч.-изд. л. Тир. 10000 Цена 3 коп.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, Новопресненский пер., 3
Тип. «Московский печатник». Москва, Лялин пер., 6. Зак. 930

УДК 636 : 576.8.07 : 006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

МЕЛКИЙ РОГАТЫЙ СКОТ

Методы лабораторной диагностики хламидиозного аборта овец

Small cattle. Methods of laboratory diagnostics of chlamydions abortion

ГОСТ 25381—82

(СТ СЭВ 2699—80)

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 11 августа 1982 г. № 3152 срок действия установлен

с 01.01. 83
до 01.01. 88

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт устанавливает методы лабораторной диагностики хламидиозного аборта овец, вызванного возбудителем из группы хламидий (Chlamydia).

Стандарт предназначается для научно-исследовательских учреждений и республиканских ветеринарных лабораторий.

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 2699—80.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для серологических исследований берут сыворотку крови взрослых овец, не привитых инактивированной или другими вакцинами против хламидиозного аборта, полученную без добавления ингибиторов свертывания.

1.2. Для микроскопических исследований, выделения возбудителя и постановки биопробы отбирают пробы патологического материала — плодовые оболочки, влагалищную слизь, ткань легких, селезенки, желудка и печени плода.

2. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Сущность метода заключается в установлении титра антител против хламидий в сыворотке крови инфицированных животных с помощью реакции связывания комплемента.

Издание официальное Перепечатка воспрещена

© Издательство стандартов, 1982

2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

2.1.1. Для проведения исследования применяют:

центрифугу лабораторную с частотой вращения 3000 об/мин;

холодильник, обеспечивающий температуру 4—8°С;

пробирки бактериологические вместимостью 20 см³ по ГОСТ 10515—75;

пробирки центрифужные вместимостью 10 см³;

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

штативы для бактериологических пробирок;

баню водяную;

микроскоп иммерсионный по ГОСТ 8284—78;

термостат или инкубатор;

пластины с лунками;

сыворотки положительные и отрицательные;

антиген специфический для реакции связывания комплемента в рабочем разведении;

антиген отрицательный;

комплемент;

гемолизин;

суспензию эритроцитов барана, 2,5%-ную;

эмбрионы куриные;

кислоту уксусную по ГОСТ 61—75, 1%-ный раствор;

фуксин карболовый; готовят разведением 0,3 г фуксина основного в 10,0 г этилового спирта (95%-ного);

масло иммерсионное по ГОСТ 13739—78;

раствор физиологический, pH 7,2—7,4;

фуксин основной (фильтрованный); раствор готовят следующим образом: 0,50 г фуксина растворяют в 200 см³ дистиллированной воды и фильтруют через бумажный фильтр;

кислоту лимонную по ГОСТ 3652—69; раствор готовят следующим образом: 0,50 г кристаллической лимонной кислоты растворяют в 200 см³ дистиллированной воды,

синь метиленовую; раствор готовят следующим образом: 2,0 г порошка метиленовой сини растворяют в 200 см³ дистиллированной воды.

2.2. Подготовка к исследованию

2.2.1. Перед постановкой реакции сыворотку крови инактивируют в водяной бане в течение 30 мин при температуре 58—60°С. Затем готовят двукратные разведения сывороток, начиная с 1 : 5.

2.2.2. Титрование гемолизина проводят следующим образом: из гемолизина готовят ряд разведений от 1 : 1000 до 1 : 10000. В лунки пластины для микротитрования вносят капельной трубкой по две капли (объем одной капли принимают равным 0,025 см³) физиологического раствора поваренной соли, по одной

капле разведений гемолизина, по одной капле 10%-ного раствора комплемента и по одной капле суспензии эритроцитов барана. Результаты учитывают через 20 мин инкубации при температуре 37°С. В работе используют две единицы гемолизина.

2.2.3. Титрование комплемента проводят следующим образом: 10%-ный раствор комплемента вносят в пробирки по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 и 0,6 $см^3$. Указанное количество комплемента доводят физиологическим раствором хлористого натрия до объема 1,0 $см^3$. После этого в лунки пластины для микротитрования вносят по две капли физиологического раствора, добавляют по одной капле различных разведений комплемента и по две капли гемолитической системы (смеси гемолизина и эритроцитов, инкубированной в течение 20 мин при комнатной температуре).

Смесь инкубируют в термостате в течение 20 мин при температуре 37°С и учитывают реакцию. За титр комплемента принимают наибольшее разведение его, которое дает полный гемолиз эритроцитов. В основном опыте используют полторы дозы комплемента.

2.3. Проведение исследования

2.3.1. Сыворотки в разведении 1 : 5 вносят по одной капле в две первые лунки двух рядов пластин для микротитрования и готовят разведения от 1 : 10 до 1 : 160 на физиологическом растворе.

Для контроля готовят аналогичные разведения положительной и отрицательной сывороток.

В один ряд лунок добавляют по одной капле специфического антигена в рабочем разведении, во второй — по одной капле контрольного антигена или физиологического раствора, затем в каждую лунку добавляют комплемент в рабочем разведении.

Пластины выдерживают в холодильнике в течение 18 ч при температуре 4—8°С или в термостате в течение 1 ч при температуре 37°С. Затем в каждую лунку вносят по две капли гемолитической системы и выдерживают в водяной бане в течение 20—30 мин при температуре 37°С.

2.4. Обработка результатов

2.4.1. Отсутствие лизиса эритроцитов означает полное (четыре плюса) связывание, т. е. положительную реакцию, а полный их лизис — отсутствие связывания комплемента, т. е. отрицательную реакцию. Титром исследуемой сыворотки крови считают то наибольшее ее разведение, которое вызывало связывание комплемента (три или четыре плюса).

Результаты исследований на хламидиозный аборт овец считают положительными при титре сыворотки 1 : 10.

3. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

Сущность метода заключается в непосредственном обнаружении хламидий в мазках-отпечатках, приготовленных из патологического материала.

3.1. Аппаратура и реактивы

3.1.1. Для проведения исследования применяют аппаратуру и реактивы, указанные в п. 2.1.1.

3.2. Подготовка к исследованию

3.2.1. Для обнаружения возбудителя заболевания из отобранного патологического материала готовят мазки-отпечатки.

Окрашивание проводят одним из следующих методов:

по Циль-Нильсену в модификации Стампа;

по Маккиавелло.

3.2.1.1. При окрашивании по Циль-Нильсену в модификации Стампа мазки сушат на воздухе, фиксируют легким нагреванием над пламенем, окрашивают в течение 10 мин карболовым фуксином Циль-Нильсена, разведенным дистиллированной водой в соотношении 1 : 10, промывают 1%-ной уксусной кислотой в течение 10—30 с (в зависимости от толщины мазка), после чего окрашивают 1%-ным раствором малахитовой зелени в течение 1—2 мин. Окрашенные препараты промывают водой и сушат.

3.2.1.2. При окрашивании по Маккиавелло мазки сушат на воздухе, фиксируют легким нагреванием, окрашивают щелочным фуксином в течение 5 мин, промывают сначала водой, затем раствором лимонной кислоты в течение 15 с, снова промывают водой, окрашивают метиленовой синью в течение 20 с. Окрашенные мазки промывают водой и сушат.

3.3. Проведение исследования

3.3.1. Мазки-отпечатки просматривают под иммерсией светового микроскопа.

3.4. Обработка результатов

3.4.1. Наличие в поле зрения мелких округлых образований, окрашенных в малиново-красный цвет, свидетельствует об обнаружении хламидий.

4. МЕТОД ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Сущность метода заключается в обнаружении с помощью флуоресцирующих антител хламидий в мазках-отпечатках и срезах патологического материала.

4.1. Аппаратура, материалы и реактивы

4.1.1. Для проведения исследования применяют аппаратуру, материалы и реактивы, указанные в п. 2.1.1, и дополнительно:

микроскоп люминисцентный:

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;
стекла покровные по ГОСТ 6672—75;
чашки Петри;
пипетки пастеровские;
масло нефлуоресцирующее;
иммуноглобулины против хламидий флуоресцирующие;
ацетон по ГОСТ 2603—79, ч.;
натрий хлористый по ГОСТ 4233—77;
натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 4172—76, х. ч.;
натрий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 245—76, х. ч.

4.2. Подготовка к испытанию

4.2.1. Для обнаружения возбудителей заболевания из проб патологического материала готовят мазки-отпечатки или срезы на замораживающем микротоме толщиной 5 мкм. Препараты подсушивают на воздухе, фиксируют в ацетоне 5 мин и обрабатывают флуоресцирующим иммуноглобулином в рабочем разведении. Обработку ведут во влажной камере при температуре 37°С в течение 45 мин.

Препараты споласкивают в трех сменах забуферного физиологического раствора pH 7,2—7,4 и в дистиллированной воде, а затем подсушивают на воздухе. На препарат наносят нефлуоресцирующее масло.

Для контроля готовят и обрабатывают флуоресцирующим иммуноглобулином препараты, приготовленные из органов незараженных белых мышей.

4.3. Проведение исследования

4.3.1. Мазки-отпечатки и срезы просматривают под люминисцентным микроскопом в сине-фиолетовых лучах.

4.4. Обработка результатов

4.4.1. Наличие ярко флуоресцирующих зелено-желтым цветом гранул различной величины при тусклом зеленовато-сером свечении клеток свидетельствует об обнаружении хламидий.

5. МЕТОД ПОСТАНОВКИ БИОПРОБЫ

Сущность метода заключается в воспроизведении заболевания у белых мышей.

5.1. Аппаратура, материалы и реактивы

5.1.1. Для проведения исследования применяют аппаратуру, материалы и реактивы, указанные в п. 2.1.1.

5.2. Подготовка к исследованию

5.2.1. Пробу патологического материала — плаценту, легкие, печень и другие органы плода — измельчают на мелкие кусочки и растирают в ступке со стерильным песком. Содержимое разбав-

ляют десятикратным объемом физиологического раствора, содержащим 0,5 мг/см³ стрептомицина. Суспензию центрифугируют с частотой вращения 1000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант ставят на 2 ч в холодильник при температуре 4—8°С. Затем материал снова центрифугируют с частотой вращения 2000 об/мин в течение 30 мин. Полученным супернатантом заражают белых мышей и куриные эмбрионы.

5.3. Проведение исследования

5.3.1. В носовую полость слегка наркотизированных 5—7-недельных белых мышей вносят несколько капель инокулята. Мышей, у которых наблюдаются симптомы болезни (затрудненное дыхание и общая депрессия), забивают и из легких приготовляют мазки-отпечатки для микроскопического исследования, которое проводится согласно разд. 3, и для иммунофлуоресцентного исследования, проводимого согласно разд. 4.

Из той же колонии мышей оставляют в качестве контрольных экземпляров не менее трех мышей.

5.4. Обработка результатов

5.4.1. В случае появления у инфицированных мышей симптомов болезни или их гибели и обнаружения в мазках-отпечатках хламидий результаты считают положительными.

6. МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ХЛАМИДИЙ

Сущность метода заключается в выделении хламидий на куриных эмбрионах и идентификации их микроскопированием.

6.1. Аппаратура, материалы и реактивы

6.1.1. Для проведения исследования применяют аппаратуру, материалы и реактивы, указанные в п. 2.1.1.

6.2. Проведение исследования

6.2.1. Яйца берут от кур, в рационе которых нет антибиотиков. При помощи инъекционной иглы вводят 0,2 см³ исследуемого материала в желточный мешок 5—7-суточных куриных эмбрионов и инкубируют их при 37°С. Гибель их в течение первых двух суток считают неспецифической. Погибшие куриные эмбрионы, а также эмбрионы, пережившие 10—12 дней после заражения, асептически вскрывают и из желточных мешков делают мазки-отпечатки, которые исследуют согласно разд. 3. В случае отрицательного результата проводят дополнительно два-три пассажа.

6.3. Обработка результатов

6.3.1. При обнаружении хламидий в мазках-отпечатках, приготовленных из желточных мешков инфицированных павших или мбрионов, результаты исследования на хламидиозный аборт овец считают положительными.

gost.e-ecolog.ru