26075-84

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА

ГОСТ 26075–84
(СТ СЭВ 3452–81)

Издание официальное

Цена 3 коп.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

РАЗРАБОТАН Министерством сельского хозяйства СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

Б. И. Антонов, Л. П. Каменева

ВНЕСЕН Министерством сельского хозяйства СССР

Зам. начальника Главного управления ветеринарии П. П. Рахманин

УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 9 января 1984 г. № 48

УДК 636:576.8.07:006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

Методы лабораторной диагностики бешенства

Agricultural animals.
Methods of laboratory diagnostics of rabies

ГОСТ 26075—84

(СТ СЭВ 3452—81)

ОКСТУ 9809

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 9 января 1984 г. № 48 срок действия установлен

с 01.07.84
до 01.07.89

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на все виды животных и устанавливает методы лабораторной диагностики заболевания бешенством, вызываемого рабдовирусом.

Стандарт применяют при диагностике заболевания животных в лабораториях ветеринарных научно-исследовательских учреждений, республиканских и областных ветеринарных лабораториях

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 3452—81.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для проведения исследований на бешенство в лабораторию направляют свежие трупы мелких животных целиком, от крупных животных — головной мозг.

Для постановки биопробы допускается использовать пробы мозга, консервированные в 30—50%-ном растворе глицерина.

1.2. Отобранный для исследования патологический материал упаковывают во влагонепроницаемую тару и в металлических контейнерах доставляют в лабораторию.

1.3. Патологический материал сопровождают документом, содержащим следующие данные:

наименование и адрес отправителя;

вид животного;

анамнестические и клинико-эпизоотологические данные.

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1984

2. МЕТОД ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Сущность метода заключается в соединении меченых антител со специфическим антигеном и наблюдении светящихся комплексов «антитело-антиген» в полях зрения люминесцентного микроскопа.

2.1. **Аппаратура, материалы, реактивы и растворы**

Микроскоп люминесцентный.

Термостат с температурой нагрева 37°С.

Холодильник.

Стекла предметные по ГОСТ 9284—75.

Пробирки бактериологические по ГОСТ 25336—82.

Чашки Петри по ГОСТ 25336—82.

Пипетки мерные по ГОСТ 20292—74.

Набор инструментов для вскрытия черепной полости и извлечения головного мозга животных.

Пинцеты по ГОСТ 21241—77.

Горелка газовая или спиртовая.

Ацетон по ГОСТ 2603—79.

Диагностический иммуноглобулин флуоресцирующий антирабический (ДАФИ).

Масло нефлуоресцирующее иммерсионное по ГОСТ 13739—78.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

Раствор фосфатный буферный, pH 7,4.

2.2. **Подготовка к исследованию**

2.2.1. Из каждого отдела головного мозга (аммонова рога, мозжечка, коры больших полушарий и продолговатого мозга) готовят по два препарата — мазка-отпечатка.

Не допускаются для исследования пробы, консервированные глицерином, фиксированные этиловым спиртом, формалином и другими средствами, вызывающими денатурацию и разрушение антигенов или создающими дополнительный («свой») фон свечения.

2.2.2. Препараты высушивают на воздухе и фиксируют в охлажденном ацетоне при плюс 4 или минус 12°С в течение 4—12 ч. Затем препараты извлекают из ацетона, высушивают на воздухе 10—15 мин и помещают их во влажную камеру (чашки Петри с увлажненным дном).

2.2.3. Диагностический антирабический флуоресцирующий иммуноглобулин (ДАФИ) в рабочем разведении наносят равномерно на всю поверхность препарата при помощи пипетки (примерно 0,1 $см^3$ на один препарат), закрывают камеру с препаратами, помещают в термостат и выдерживают 30 мин при 37°С. Затем предметные стекла с препаратом троекратно промывают, погружая их каждый раз на 10 мин в сосуд, наполненный фосфатным

буфером pH 7,4, промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

На окрашенные препараты наносят иммерсионное нефлуоресцирующее масло.

2.3. **Проведение исследования**

2.3.1. Подготовленные препараты просматривают под люминесцентным микроскопом с иммерсионной системой.

2.4. **Обработка результатов**

2.4.1. При положительных результатах исследования в препаратах, содержащих антиген вируса бешенства, обнаруживают разной величины и формы ярко светящиеся желто-зеленым цветом гранулы в нейронах и вне клеток. Размер их колеблется от едва заметных в виде песчинок образований до 15—20 мм.

Не пораженная вирусом бешенства мозговая нервная ткань светится тусклым серовато-желтым или зеленоватым цветом.

3. МЕТОД ПОДАВЛЕНИЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Сущность метода заключается в способности рабического антигена, связанного с нефлуоресцирующими антителами, вторично не входить в соединение с флуоресцирующим специфическим коньюгатом. Это свойство используется для доказательства специфичности свечения комплекса «антиген-антитело» при исследовании препаратов, предварительно не обрабатываемых нефлуоресцирующими антителами.

3.1. **Аппаратура, материалы, реактивы и растворы**

3.1.1. Аппаратура, материалы, реактивы и растворы, указанные в п. 2.1, и дополнительно:

иммуноглобулин 5%-ный антирабический нефлуоресцирующий моноспецифический;

раствор физиологический нейтральный.

3.2. **Подготовка к исследованию**

3.2.1. На фиксированные препараты, приготовленные из исследуемых участков головного мозга, наносят пипеткой 5%-ный антирабический нефлуоресцирующий моноспецифический иммуноглобулин, выдерживают их в течение 30 мин во влажной камере в термостате при 37 °С. Затем препараты промывают двукратно нейтральным физиологическим раствором и окрашивают антирабическим флуоресцирующим иммуноглобулином (ДАФИ) по п. 2.2.3.

3.3. **Проведение исследования**

3.3.1. Препараты просматривают под люминесцентным микроскопом с иммерсионной системой.

3.4. **Обработка результатов**

3.4.1. В препаратах, содержащих антиген вируса бешенства, предварительно обработанных нефлуоресцирующим и затем флуо-

ресцирующим иммуноглобулином, свечения не должно быть, а в препаратах, ранее обработанных только флуоресцирующим иммуноглобулином наблюдают специфическое свечение.

4. МЕТОД РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Сущность метода заключается в свойстве антител-преципитинов и гомологичных им антигенов диффундировать в агаровом геле и при соединении образовывать видимые визуально линии преципитатов-комплексов «антитело-антиген».

Этим методом допускается исследовать несвежий патологический материал, контаминированный бактериальный микрофлорой.

4.1. **Аппаратура, материалы и реактивы**

Термостат.

Баня водяная.

Осветитель для бактериологических работ.

Пипетки мерные и пастеровские по ГОСТ 20292—74.

Чашки Петри по ГОСТ 25336—82.

Трубка металлическая тонкостенная диаметром 4—5 мм.

Перо писчее ученическое.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233—77.

Метиловый оранжевый, 1%-ный раствоор в 50%-ном этиловом спирте по ГОСТ 5962—67.

Мертиолят.

Диагностический иммуноглобулин антирабический.

Антиген отрицательный контрольный.

Антиген положительный контрольный.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

Гель агаровый биофабричного изготовления или приготовленный по рецептуре:

агар-агар «Дифко» или аналогичный	— 15 г,
натрий хлористый	— 8,5 г,
1%-ный раствор метилового оранжевого в 50%-ном этиловом спирте	— 10 см³,
мертиолят	— 0,01 г,
вода дистиллированная	— 1000 см³.

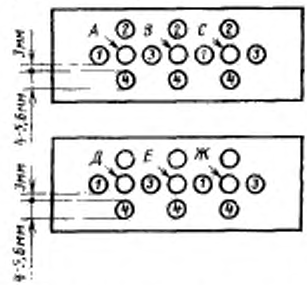
Агаровый гель с pH 7,2—7,4 разливают в стерильную посуду, автоклавируют при 0,5 атм в течение 30 мин, хранят в холодильнике при 4°С.

4.2. **Проведение исследования**

4.2.1. Реакцию преципитации (РП) ставят на обезжиренных предметных стеклах, на которые предварительно наносят каплю расплавленного агара, пипеткой равномерно распределяя ее по стеклу, и делают тонкий мазок. На застывший слой агара наливают сверху 2,5 см³ агарового геля толщиной приблизительно 2 мм.

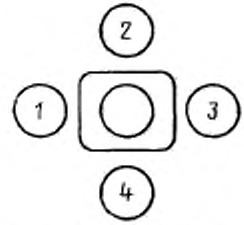
После застывания агара делают в нем лунки металлической тонкостенной трубочкой диаметром 4—5,6 мм согласно трафарету. Агаровые столбики осторожно извлекают ученическим пером, не допуская отслаивания от стекла тонкого слоя агарового геля.

В РП исследуют от крупных животных (лошадей, крупного рогатого скота, собак, лисиц и др.) следующие части головного мозга—кору полушарий левой и правой сторон, аммоновы рога—левый и правый, мозжечок и продолговатый мозг. У мелких животных РП ставят с какими-либо тремя отделами мозга. От мышей исследуют весь головной мозг, который растирают в ступке или в самой черепной коробке в массу пастообразной консистенции.



А—кора (левое полушарие); *Б*—кора (правое полушарие); *С*—аммонов рог (левый); *Д*—аммонов рог (правый); *Е*—мозжечок; *Ж*—продолговатый мозг; *1, 2, 3, 4*—лунки с разведением глобулина соответственно 1:2, 1:4, 1:8, 1:16

Черт. 1



Положительная РП со всеми разведениями глобулина

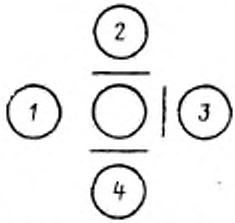
Черт. 2

Подготовленные предметные стёкла помещают во влажную камеру (чашки Петри с увлажненным дном) и при постановке реакции лунки заполняют патологическим материалом и диагностическим антирабическим иммуноглобулином (черт. 1—4).

В центральные лунки, обозначенные на трафарете А,В,С,Д.Е,Ж, вносят исследуемый патологический материал, в периферические лунки 1,2,3,4, (см. черт. 1) — диагностический антирабический иммуноглобулин (1—2 капли) в разведениях 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 (от исходного разведения) на физиологическом растворе.

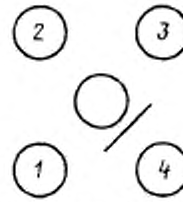
Одновременно ставят контрольные опыты с положительными и отрицательным антигенами, но каждый на отдельном стекле, используя те же разведения иммуноглобулина.

После заполнения лунок соответствующими компонентами чашки Петри (влажные камеры) помещают в термостат при 37°С на 6 ч. Затем выдерживают чашки при комнатной температуре еще 42 ч.



Положительная РП с разведениями глобулина 1:4, 1:8, 1:16

Черт. 3



Положительная РП с разведением глобулина 1:16, отсутствует РП с разведениями 1:2, 1:4, 1:8

Черт. 4

Реакцию преципитации учитывают через 6, 24, 48 ч после ее постановки. Предметные стекла просматривают визуально в затемненной комнате, просвечивая их осветителем снизу вверх под углом 45°.

4.3. **Обработка результатов**

4.3.1. Реакцию считают положительной при появлении одной или двух-трех линий преципитации любой интенсивности между лунками, содержащими антиген и иммуноглобулин.

5. МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ТЕЛЕЦ БАБЕША-НЕГРИ

Сущность метода заключается в выявлении в клетках нервной ткани специфических цитоплазматических включений — телец Бабеша-Негри.

Метод выявления телец Бабеша-Негри является вспомогательным и имеет диагностическое значение только при обнаружении типичных, специфических включений.

5.1. **Аппаратура, материалы и реактивы**

Микроскоп биологический по ГОСТ 8284—78.

Стекла предметные по ГОСТ 9284—75.

Пипетки мерные по ГОСТ 20292—74.

Краситель Селлерса.

Буфер фосфатный pH 7,0—7,5.

5.2. **Подготовка к исследованию**

5.2.1. Готовят мазки-отпечатки из аммонового рога, коры больших полушарий, мозжечка, продолговатого мозга и окрашивают по методу Селлерса.

На свежие не высохшие препараты наносят на 10—30 с краситель Селлерса (одну часть 1%-ного раствора основного фуксина смешивают с двумя частями 1%-ного раствора метиленового синего.) После окраски препараты промывают фосфатным буферным

раствором и высушивают в вертикальном положении при комнатной температуре.

5.3. **Проведение исследования**

5.3.1. Препараты просматривают под биологическим микроскопом с иммерсионной системой.

5.4. **Обработка результатов**

5.4.1. Положительным результатом исследования считают наличие специфических телец Бабеша-Негри, которые представляют собой четко очерченные овальные или продолговатые гранулированные образования диаметром 2—10 мм, розово-красного цвета, расположенные в нейтронах, а также вне их.

От типичных гранулированных включений, обнаруживаемых при бешенстве, следует отличать включения негранулированные, обнаруживаемые при некоторых других инфекциях, поражающих центральную нервную систему.

6. МЕТОД БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЫ

Сущность метода заключается в выделении вируса от больных убитых или павших животных путем инокулирования патологического материала белым мышам и последующей его идентификации.

Биопробу проводят, если выявление рабического антигена методом иммунофлуоресценции (или РП и определение телец Бабеша-Негри) в первичном материале окажется отрицательным.

6.1. **Аппаратура, материалы и растворы**

Центрифуга с частотой вращения 2000 об/мин.

Пробирки центрифужные.

Ступки.

Шприцы с иглами.

Посуда для содержания мышей.

Антибиотики (стрептомицин, пенициллин).

Раствор нейтральный физиологический.

6.2. **Подготовка к исследованию**

6.2.1. Материал для заражения мышей готовят из равных частей нервной ткани аммонова рога, мозжечка, коры полушарий, продолговатого мозга.

Ткань измельчают ножницами и растирают в ступке (или гомогенизаторе), постепенно прибавляя нейтральный физиологический раствор до получения 10%-ной суспензии.

6.2.2. Суспензию центрифугируют с частотой вращения 2000 об/мин в течение 5—10 мин. Надосадочную жидкость переносят в стерильную пробирку и хранят в холодильнике при температуре 0—4 °С до ее использования. При подозрении на бактериальную нестерильность в суспензию добавляют 500 МЕ пенициллина

на и 500 МЕ стрептомицина на 1 см³ суспензии и затем выдерживают ее при комнатной температуре 30 мин.

6.3. **Проведение исследования**

6.3.1. Для биопробы берут белых лабораторных мышей массой 16—20 г или сосунков в возрасте 20—25 сут массой 6—8 г.

Мышей заражают подготовленной суспензией интрацеребрально в дозе 0,015—0,03 см³ в зависимости от массы мышей или подкожно в верхнюю губу в дозе 0,1—0,2 см³.

На одну биопробу заражают 6—10 мышей.

Зараженных мышей помещают в клетки или банки, на которые наклеивают этикетку с указанием даты заражения, количества мышей, способа заражения и номера экспертизы. Горловину банки накрывают сеткой, препятствующей проникновению насекомых.

Зараженных мышей осматривают ежедневно в течение 30 сут. Количество здоровых, больных и погибших мышей регистрируют в журнале.

6.4. **Обработка результатов**

6.4.1. При оценке результатов учитывают проявление клинических признаков у зараженных мышей:

взъерошенность шерсти;

тремор;

нарушение координации движения;

параличи;

прострация;

Гибель зараженных мышей в срок до 48 ч не учитывают в оценке результатов. От мышей, павших после указанного срока, головной мозг исследуют, как указано в разд. 2—5.

6.4.2. Биологическую пробу на бешенство считают положительной, если в препаратах из мозга зараженных мышей обнаруживают тельца Бабеша-Негри или выявляют антиген методами иммунофлуоресценции или в реакции преципитации.

6.4.3. Отрицательный диагноз на бешенство может быть дан только по истечении 30-суточной постановки биопробы при отсутствии специфической гибели мышей.

7. МЕТОД СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЫ

Сущность метода заключается в том, что мыши, зараженные мозговой тканью больных бешенством животных, заболевают бешенством, а зараженные тканью, предварительно обработанной антирабической сывороткой (иммуноглобулином), не заболевают.

7.1. **Аппаратура, материалы, реактивы и растворы**

7.1.1. Аппаратура, материалы и реактивы, указанные в п. 6.1, и дополнительно:

баня водяная;

сыворотка гипериммунная антирабическая (или иммуноглобулин);

сыворотка нормальная или физиологический раствор, pH 7,2—7,4.

7.2. **Подготовка к исследованию**

7.2.1. Для проведения специфической биопробы отбирают 12 белых мышей (п. 6.3.1). Материал для заражения мышей готовят по п. 6.2.

7.2.2. Подготовленную для заражения суспензию разливают в две пробирки по 3 $см^3$. Затем в одну из них вносят 3 $см^3$ антирабической гипериммунной сыворотки или иммуноглобулин, в другую — 3 $см^3$ нормальной сыворотки или физиологический раствор pH 7,2—7,4. Обе пробирки выдерживают в водяной бане в течение 10 мин при 37°С.

7.3. **Проведение исследования**

Каждой смесью заражают по шесть белых мышей интрацеребрально в дозе 0,015—0,03 $см^3$ или в губу в дозе 0,1—0,2 $см^3$.

7.4. **Обработка результатов**

7.4.1. Положительным на бешенство результатом специфической биопробы считают гибель мышей, зараженных материалом, обработанным нормальной сывороткой или физиологическим раствором в течение 30 сут. При этом мыши, инфицированные материалом после обработки антирабической иммунной сывороткой или иммуноглобулином, должны остаться живыми.

7.4.2. Отрицательный диагноз на бешенство может быть дан только по истечении 30 сут постановки биопробы, если нет специфической гибели мышей.

Редактор *Р. С. Федорова*
Технический редактор *В. Н. Малькова*
Корректор *Н. Б. Жуховцева*

gost.e-ecolog.ru

Сдано в наб. 15.03.84 Подп. к печ. 15.03.84 0,75 усл. п. л. 0,75 усл. кр.-отт. 0,62 уч.-изд. л.
Тираж 16000 Цена 3 коп.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, Новопресненский пер., 3.
Калужская типография стандартов, ул. Московская, 256. Зак. 280