25753-83
+

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ

ГОСТ 25753–83
(СТ СЭВ 3454–81)

Издание официальное

Цена 3 коп.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

РАЗРАБОТАН Министерством сельского хозяйства СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

А. В. Селиванов, Э. М. Прохорова, Т. И. Малахова

ВНЕСЕН Министерством сельского хозяйства СССР

Член Коллегии А. Д. Третьяков

УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 22 апреля 1983 г. № 2016

УДК 636:576.8.07:006.354

Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

Методы лабораторной диагностики болезни Ауески

Agricultural animals. Methods of laboratory diagnostics for Morbus Aujeski

ОКСТУ 9809

ГОСТ 25753—83

(СТ СЭВ 3454—81)

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 22 апреля 1983 г. № 2016 срок действия установлен

с 01.07.84
до 01.07.89

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на крупный рогатый скот, овец, свиней и других животных (пушных зверей, собак и кошек), невакцинированных живыми вакцинами, и устанавливает методы лабораторной диагностики болезни Ауески.

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

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 3454 81.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для проведения биологической пробы и выделения вируса патологический материал берут от животных в период максимального проявления клинических признаков болезни (температурная реакция, угнетение, нервная клиника, зуд, расчесы). От вынужденно убитых и павших животных патологический материал должен быть взят и исследован в летнее время в течение 6 ч, а при условии хранения его в охлажденном состоянии в течение 10—12 ч.

1.2. В лабораторию доставляют больных животных, трупы животных или кусочки тканей и органов (головного и спинного мозга, легких, печени, селезенки, лимфатических узлов, миндалин), от абортировавших животных — плоды и плаценту.

1.3. Для серологического исследования пробы крови от исследуемых животных берут в стерильные пробирки в количестве не менее 5 $см^3$.

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1983

Сыворотку получают методом отстоя и хранят ее до 10 сут при температуре плюс 4 °С. Допускается более длительное хранение сыворотки при температуре минус 20 °С. Сыворотка должна быть прозрачной без признаков гемолиза.

1.4. Патологический материал доставляют в лабораторию с сопроводительным документом, в котором указывают наименование хозяйства, вид и возраст животного, эпизоотические данные, клиническую и патолого-анатомическую картину, сведения о проведении иммунизации животных и применяемой вакцине.

2. МЕТОД БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЫ

Сущность метода заключается в воспроизведении заболевания у здоровых кроликов путем инокуляции патологического материала.

2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Для проведения испытания применяют:

центрифугу с частотой вращения не менее 3000 об/мин;

термостат с температурой нагрева 37 °С;

пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82;

пипетки мерные по ГОСТ 20292—74;

шприцы вместимостью 1 или 2 $см^3$;

чашки Петри по ГОСТ 25336—82;

раствор физиологический стерильный, pH = 7,2;

раствор солевой буферный стерильный, pH = 7,2;

антибиотики широкого спектра действия.

2.2. Подготовка к исследованию

Из стерильно отобранных кусочков органов и тканей готовят 10%-ную суспензию на физиологическом или солевом буферном растворе. Суспензию центрифугируют с частотой вращения 2000—3000 об/мин в течение 20—30 мин. Надосадочную жидкость пипеткой переносят в стерильные пробирки, добавляют антибиотики по 100 Ед/$см^3$ и выдерживают в течение 1 ч в термостате при температуре 37 °С или 2—3 ч при комнатной температуре, а затем используют для проведения биологической пробы или выделения вируса в культуре клеток.

2.3. Проведение исследования

Для проведения биологической пробы используют кроликов массой 2—2,5 кг. Надосадочную жидкость, приготовленную по п. 2.2, вводят двум кроликам внутримышечно в дозе 1—2 $см^3$.

2.4. Обработка результатов

Биопробу считают положительной, если животные погибают с клиническими признаками болезни Ауески (нервная клиника, зуд, расчесы) через 2—10 сут после инокулирования суспензии патологического материала. Если животные погибают без призна-

ков болезни Ауески, биопробу повторяют, используя патологический материал первого пассажа.

Гибель кроликов после введения суспензии патологического материала от свиней без признаков зуда и расчесов может свидетельствовать о выделении вакцинных штаммов вируса болезни Ауески.

Гибель кроликов после введения суспензии патологического материала от пушных зверей без признаков зуда и расчесов может свидетельствовать о выделении вакцинных штаммов вируса болезни Ауески, патогенных для пушных зверей.

Для идентификации вируса проводят выделение вируса в культуре клеток с последующей постановкой реакции нейтрализации.

3. МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Сущность метода заключается в выявлении цитопатического действия (ЦПД) вируса в культуре клеток и его последующей идентификации.

3.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Для проведения исследования применяют:

термостат с температурой нагрева 37 °С;

центрифугу с частотой вращения не менее 3000 об/мин;

весы лабораторные с погрешностью взвешивания не более 0,01 г;

шкаф сушильный;

микроскоп любой марки;

холодильники;

баню водяную;

аппарат для трипсинизации тканей;

пипетки мерные по ГОСТ 20292—74;

пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82;

чашки Петри по ГОСТ 25336—82;

фильтры стерилизующие разных размеров;

раствор солевой буферный стерильный, pH=7,2;

среды ростовую питательную и поддерживающую;

раствор трипсина;

соду двууглекислую по ГОСТ 4201—79;

сыворотку крупного рогатого скота для культуры клеток;

антибиотики и препараты микостатические;

феноловый красный по ГОСТ 4599—73;

раствор трипана голубого;

культуру клеток первично-трипсинизированных почек и щитовидной железы свиньи, семенников телят, эмбрионов кур, клеточные линии $РК_{15}$, $ВНК_{21}$ (любую из перечисленных);

вирус болезни Ауески с титром не ниже 10^4 $ТЦД_{50/см^3}$;

сыворотку животных, не содержащую антител к вирусу болезни Ауески (отрицательную);

сыворотку специфическую гипериммунную против болезни Ауески (положительную).

3.2. Подготовка к исследованию — по п. 2.2.

3.3. Проведение исследования

В пробирки с культурой клеток вносят по 0,2 $см^3$ каждого испытуемого материала. Для каждой пробы используют 4—6 пробирок. Пробирки с зараженной культурой клеток выдерживают в термостате при 37 °С в течение 30 мин. Затем из пробирок с культурой клеток удаляют надосадочную жидкость и добавляют 1,8 $см^3$ поддерживающей питательной среды, содержащей антибиотики.

В контроле используют 4—6 пробирок с незараженной культурой клеток, в которой проводят смену питательной среды. Пробирки с зараженной культурой клеток и контрольные инкубируют при температуре 37 °С в течение 2—5 сут и ежедневно микроскопируют для учета цитопатических изменений. При появлении цитопатических изменений культуральную жидкость из каждой пробирки объединяют и производят идентификацию выделенного вируса. Если испытуемый материал токсичен для клеток или невозможно определить специфичность ЦПД, проводят дополнительный пассаж.

3.4. Обработка результатов

Результат исследования испытуемого материала считают положительным, если в культуре клеток обнаруживается цитопатогенное действие вируса, которое проявляется в округлении клеток, появлении гигантских клеток и клеточном лизисе с отпадением пораженных клеток от стекла.

В контрольных культурах (незараженных) не должно быть цитопатических изменений.

По результатам вирусологического исследования болезнь Ауески диагностируют, если видовая принадлежность выделенного вируса в культуре клеток подтверждена в реакции нейтрализации (метод идентификации вируса).

4. МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА

Сущность метода заключается в обнаружении подавления цитопатического действия вируса в культуре клеток с помощью положительной сыворотки.

4.1. Аппаратура, материалы и реактивы — по п. 3.1.

4.2. Проведение исследования

Перед постановкой реакции нейтрализации положительную и отрицательную сыворотки разбавляют в соотношении 1:10 питательной средой для культуры клеток, содержащей антибиотики, и прогревают в водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин. В два ряда пробирок (по 7 шт.) вносят по 2 см³ сыворотки в каждую пробирку: в первый ряд — положительную, во второй — отрицательную.

Готовят десятикратные разведения испытуемого вируса от 10^{-1} до 10^{-7} на питательной среде для культуры клеток в объемах, достаточных для постановки реакции, и вносят в два ряда пробирок с сыворотками, начиная с разведения 10^{-7}, в объеме по 2 см³ на пробирку. Пробирки со смесью разведений вируса и сыворотки встряхивают и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 1 ч. Затем каждую смесь сыворотки с разведениями вируса вносят по 1 см³ в 4 пробирки с культурой клеток. Пробирки инкубируют в термостате при температуре 37 °С.

4.3. Обработка результатов

Результаты реакции учитывают по цитопатическому действию вируса через 2—5 сут. Для этого определяют титр исследуемого вируса в присутствии положительной и отрицательной сывороток и выражают его в логарифмах $ТЦД_{50/см^3}$. Титр вычисляют по методу Рида и Менча. Видовую принадлежность вируса устанавливают при наличии разности в титрах вируса с отрицательной и положительной сыворотками не менее чем на два логарифма.

5. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Сущность метода заключается в специфическом свойстве нейтрализующих антител сыворотки крови подавлять способность вируса вызывать цитопатическое действие в культуре клеток.

5.1. Аппаратура, материалы и реактивы — по п. 3.1.

5.2. Подготовка к исследованию

Для групповой диагностики исследуют пробы сывороток в разведениях 1:2 или 1:4 в культуре клеток против 1000 $ТЦД_{50/0,1\ см^3}$ вируса. Для контроля благополучного стада допускается исследование смеси сывороток от пяти животных. Для подтверждения положительного диагноза сыворотки исследуют в разведениях от 1:2 до 1:16.

Испытуемые сыворотки выдерживают в водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин.

5.3. Проведение исследования

Готовят двукратные разведения испытуемых сывороток от 1:2 до 1:16 на питательной среде для культуры клеток с анти-

биотиками. Затем готовят необходимый объем вируса, содержащего 1000 $ТЦД_{50/0,1\ см^3}$ и добавляют равный объем его в каждую пробирку с последовательными разведениями сывороток. Смесь сывороток и вируса встряхивают, выдерживают при температуре 37 °С в течение 1 ч, после чего в 4 пробирки с культурой клеток вносят по 0,2 см³ смеси сыворотки и вируса и выдерживают при температуре 37°С в течение 30 мин. По истечении указанного срока в пробирки с культурой клеток вносят по 1,8 см³ поддерживающей питательной среды. Одновременно ставят следующие контроли:

контроль незараженных культур клеток в 3—4 пробирках, в которых проводят смену питательной среды;

контроль дозы вируса. Для контроля точности дозы вируса, взятой в реакцию, из рабочего разведения вируса (1000 $ТЦД_{50/0,1\ см^3}$) готовят разведения до 10^{-4}. Для каждого разведения вируса используют 3—4 пробирки с культурой клеток. В пробирки с культурой клеток вносят рабочее разведение вируса и последовательные его разведения в объеме по 0,1 см³. После контакта при температуре 37 °С в течение 30 мин в пробирки с культурой клеток добавляют 1,9 см³ поддерживающей питательной среды;

контроль токсичности сыворотки. Для определения токсичности сыворотки в пробирочные культуры вносят по 0,1 см³ разведения сыворотки и по 1,9 см³ поддерживающей питательной среды (по 3—4 пробирки с культурой клеток на каждое разведение сыворотки);

контроль специфичности вируса. Пробирки с культурой клеток инфицируют смесью вируса в рабочей дозе с двукратным разведением специфической сыворотки до ее титра (по 3—4 пробирки с культурой клеток для смеси каждого разведения специфической сыворотки + вирус).

Все пробирки с культурами клеток, используемые в реакции, инкубируют при температуре 37 °С.

Проводят ежедневный микроскопический контроль клеточных культур. Учет реакции проводят при появлении цитопатического действия вируса в контроле дозы вируса, взятой для реакции нейтрализации.

3.4. Обработка результатов

Результат серологического исследования испытуемых сывороток считают положительным при отсутствии цитопатического действия в разведениях сыворотки 1 : 2 и выше при наличии следующих результатов в контролях:

в контроле культуры клеток не должно быть изменений монослоя клеток;

в контроле дозы вируса цитопатическое действие должно быть в рабочем разведении вируса и в разведениях 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4} (в последнем разведении не менее двух пробирок);

в контроле токсичности сывороток в случае положительной сыворотки (переболевшее животное) отсутствует цитопатический эффект, начиная с разведения сыворотки 1 : 2; при отрицательной сыворотке (отсутствуют специфические антитела) должен быть цитопатический эффект, как и в культурах с контролем дозы вируса (рабочее разведение);

в контроле специфичности вируса отсутствует цитопатический эффект в культурах, инокулированных смесью специфической сыворотки и вируса.

Наличие специфических антител в испытуемых сыворотках крови свидетельствует об инфицировании данной особи, группы животных возбудителем болезни Ауески или возможной вакцинации животных против болезни Ауески.

Положительный результат серологического метода исследования сывороток крови невакцинированных животных свидетельствует о подозрении на заболевание, которое подтверждают постановкой биологической пробы.

Редактор *Н. Е. Шестакова*
Технический редактор *Н. П. Замолодчикова.*
Корректор *Е. И. Евтеева*

gost.e-ecolog.ru

Сдано в наб 06.05.83 Подп в печ. 07.05.83 0,625 п. л. 0,48 уч.-изд. л. Тир. 6000 Цена 3 коп.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, Новопресненский пер., 3
Тип. «Московский печатник». Москва, Лялин пер., 6. Зак. 527