ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА

ГОСТ 25384—82
(СТ СЭВ 2597—80)

Издание официальное

Цена 3 коп.

Всесоюзный информационный фонд стандартов, технических условий

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

РАЗРАБОТАН Министерством сельского хозяйства СССР

ИСПОЛНИТЕЛЬ

Ж. А. Шажко

ВНЕСЕН Министерством сельского хозяйства СССР

Член Коллегии **А. Д. Третьяков**

УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 11 августа 1982 г. № 3155

УДК 636:576.8.07:006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

Методы лабораторной диагностики ящура

Domestic animals. Methods of laboratory diagnostics of foot-and-mouth disease

ГОСТ 25384—82

(СТ СЭВ 2597—80)

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 11 августа 1982 г. № 3155 срок действия установлен

с 01.01.83
до 01.01.88

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на крупный и мелкий рогатый скот, свиней, верблюдов, а также на все виды диких парнокопытных и мозоленогих животных, восприимчивых к ящуру, и устанавливает методы лабораторной диагностики ящура.

Стандарт предназначается для научно-исследовательских учреждений, республиканских и областных (краевых) ветеринарных лабораторий.

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 2597—80.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для проведения диагностических исследований на ящур отбирают стенки и содержимое афт (лимфа) на слизистой оболочке языка (у крупного рогатого скота), на пятачке (у свиньи), на коже венчика и межпальцевой щели (у крупного и мелкого рогатого скота, свиней, верблюдов и др.). При отсутствии афт отбирают пробы крови в момент температурной реакции у животных, а из трупов молодняка всех видов животных — лимфатические узлы головы и заглоточного кольца, поджелудочную железу и мышцу сердца.

Для проведения ретроспективных диагностических исследований на ящур отбирают пищеводно-глоточную слизь. Отбор пищеводно-глоточной слизи производят в любое время после предполагаемого заболевания животных.

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1982

1.2. Для проведения диагностики серологическим методом отбирают не менее 5 г стенок или содержимого афт. Масса проб остальных материалов, предназначенных для выделения вируса ящура и его последующей идентификации, должна быть не менее 10 г.

При невозможности получения указанных количеств проб допускается отбирать максимально возможное количество патологического материала для проведения последующей расплодки вируса в культурах клеток.

1.3. Пробы патологического материала без признаков разложения помещают во флаконы с завинчивающимися или притертыми пробками и замораживают, а при отсутствии условий замораживания — заливают консервирующей жидкостью. Для консервирования стенок и содержимого афт используют консервирующую жидкость, состоящую из равных объемов нейтрального глицерина и забуференного 0,15 М раствора хлористого натрия или среды для культивирования клеток (без сыворотки). Пробы остального патологического материала консервируют растворами антибиотиков с широким спектром действия или глицерин-фосфатным буфером.

1.4. Флаконы с пробами снабжают этикеткой с указанием вида животных, наименования патологического материала и его количества, консерванта, времени отбора и адреса отправителя. Флаконы с пробами помещают в небьющийся контейнер со льдом или хладоносителем и доставляют на исследование в возможно короткий срок, но не позднее 48 ч с момента отбора. Если пробы могут быть доставлены в течение 6—12 ч с момента отбора, замораживание и консервация проб не обязательны.

1.5. Поступившие на исследование стенки афт освобождают от консервирующей жидкости отмыванием в 2—3 сменах стерильного 0,15 М раствора хлористого натрия или среды для культивирования клеток, взвешивают, измельчают сначала ножницами, а затем в ступке с песком или с помощью гомогенизатора и смешивают в соотношении 1 : 1 или 1 : 2 с 0,15 М раствором хлористого натрия. Полученные 50 или 33% суспензии выдерживают в течение 20 мин при температуре 4°С, а затем очищают 20% (по объему) хлороформа или флюорокарбона в течение 5—7 мин и осветляют центрифугированием с частотой вращения 3000 об/мин в течение 15 мин.

1.6. Содержимое афт (лимфа) разбавляют равным количеством 0,15 М раствора хлористого натрия и подвергают очистке и осветлению в соответствии с п. 1.5.

1.7. Пробы лимфоузлов, мышцы сердца, поджелудочной железы и свернувшейся крови сначала обрабатывают в соответствии с п. 1.5, а затем разбавляют средой для культивирования клеток.

Полученные суспензии при невозможности немедленно использовать для постановки биопробы замораживают и хранят при температуре минус 20°С.

1.8. Суспензии, полученные в соответствии с пп. 1.5 и 1.6, делят на три неравные части. Меньшую из них (около 1 см³), предназначенную для вирусологических исследований (постановки биопробы), консервируют антибиотиками и хранят при температуре минус 20°С. Другую часть (2—3 см³), предназначенную для исследования в РСК, прогревают при температуре 56°С в течение 40 мин, а оставшуюся (1,5—2 см³)—хранят без прогревания. Перед постановкой РСК обе эти пробы центрифугируют в течение 20 мин с частотой вращения 3500—4000 об/мин.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Серологический метод

Сущность метода заключается в обнаружении специфического антигена того или иного типа и варианта вируса ящура непосредственно в материале, полученном от животных с клиническими признаками заболевания, с помощью реакции связывания комплемента (РСК).

2.1.1. Аппаратура, материалы и реактивы

2.1.1.1. Для проведения исследования применяют:

центрифугу настольную с угловым ротором и частотой вращения до 5000 об/мин;

центрифугу рефрижераторную;

холодильник с температурой минус 20°С;

холодильник с температурой от 0 до 8°С;

гомогенизатор;

баню водяную или термостат;

шкаф сушильный с регулируемой температурой в диапазоне от 100 до 200°С;

электрофотоколориметр или спектрофотометр;

пробирки стеклянные по ГОСТ 10515—75;

пластинки (панели) для микросерологических реакций типа Такачи;

наборы разбавителей и капельниц для микросерологических реакций типа Такачи;

пипетки вместимостью до 10 см³ с ценой деления 0,01 и 0,1 см³ по ГОСТ 20292—74;

колбы мерные вместимостью 50, 100 и 200 см³ по ГОСТ 1770—74;

комплемент морской свинки с титром не более 2,8% по ГОСТ 16446—78;

гемолизин кроличий к эритроцитам барана с титром 1 : 8000 по ГОСТ 16446—78;

эритроциты барана в виде дефибринированной крови, смешанной с равным объемом консерванта;

сыворотки морских свинок семи типов и актуальных для стран—членов СЭВ вариантов вируса ящура с титром в РСК не ниже 1 : 20;

антигены ящурные эталонные семи типов и актуальных для стран—членов СЭВ вариантов вируса с титром в РСК не ниже 1 : 4;

сыворотки и антигены для лабораторной диагностики везикулярных заболеваний свиней;

кислоту борную дважды перекристаллизованную;

веронал;

мединал;

глюкозу по ГОСТ 975—75;

натрий хлористый по ГОСТ 4233—77;

магний хлористый по ГОСТ 4209—77, х. ч.;

кальций хлористый по ГОСТ 4460—77, х. ч.;

среду питательную для культивирования клеток с 0,5% гидролизата лактальбумина (pH 7,4—7,6);

хлороформ по ГОСТ 20015—74 или флюорокарбон-113;

консервант для эритроцитов; приготовленный следующим образом: последовательно растворяют в 100 см³ дистиллированной воды 6 г глюкозы, 4,5 г борной кислоты, дважды перекристаллизованной, и 0,85 г хлористого натрия. Полученный раствор стерилизуют кипячением в течение 3 дней по 30 мин;

раствор буферный веронал-мединаловый концентрированный, приготовленный следующим образом: растворяют в 1000 см³ кипящей дистиллированной воды 83 г хлористого натрия, 18,4 г веронала, 1,15 г хлористого магния и 0,22 г хлористого кальция. Раствор охлаждают, затем растворяют 0,22 г мединала, стерилизуют автоклавированием и хранят при температуре 4°С. Рабочий раствор готовят непосредственно перед постановкой РСК разбавлением концентрированного раствора четырьмя объемами дистиллированной воды.

2.1.2. Подготовка к исследованию

2.1.2.1. Суспензии стенок и содержимого афт, полученные в соответствии с пп. 1.5, 1.6 и 1.8, разводят с 1 : 2 до 1 : 32 0,15 М раствором хлористого натрия, вероналовым буфером или средой для культивирования клеток и разливают в серологические пробирки по 0,1 см³ или в лунки панелей для микросерологических реакций по 0,025 см³. Число пробирок (лунок), заполняемых каждым разведением исследуемой суспензии, должно быть равно числу штаммоспецифических сывороток и контролей на антикомплементарность и гемолитические свойства.

2.1.2.2. Для приготовления гемолитической системы эритроциты барана трехкратно отмывают от консерванта 0,15 М раствором

хлористого натрия, каждый раз осаждая их центрифугированием с частотой вращения 600 об/мин в течение 5—7 мин и готовят рабочую суспензию смешиванием 2 см³ осадка с 98 см³ разбавителя. К полученной суспензии эритроцитов при постоянном перемешивании приливают постепенно равный объем гемолизина, разведенного 0,15 М раствором хлористого натрия с таким расчетом, чтобы его конечное разведение было в 4 раза концентрированнее предельного гемолитического титра, указанного на этикетке. Затем суспензию выдерживают в течение 15—20 мин в водяной бане при температуре 37°С или при комнатной температуре.

При постановке РСК на панелях для микрореакций концентрацию эритроцитов в гемсистеме увеличивают в 2 раза.

2.1.2.3. Для приготовления рабочего разведения комплемента содержимое нескольких ампул с сухим препаратом растворяют в первоначальном объеме дистиллированной воды, определяют предельный титр, обусловливающий гемолиз 50% эритроцитов гемсистемы, приготовленной согласно п. 2.1.2.2, и разводят 0,15 М раствором хлористого натрия или вероналовым буфером из расчета 5 CH_{50} в 0,1 см³ (если РСК ставят в пробирках) или в 0,025 см³ (при постановке РСК на панелях для микрореакций).

2.1.2.4. Рабочие разведения типоспецифических ящурных сывороток готовят на 0,15 М растворе хлористого натрия или вероналовом буфере из расчета получения раствора в 2 раза более концентрированного, чем их предельный титр, т. е. они должны содержать 2 сывороточных единицы (СЕ). Вариантноспецифические сыворотки разводят до предельного титра. Вместо типоспецифических сывороток могут быть использованы вариантноспецифические в предельном, двух- и четырехкратном титрах (1, 2 и 4 СЕ).

2.1.2.5. Рабочие разведения эталонных (контрольных) ящурных антигенов готовят на 0,15 М растворе хлористого натрия или вероналовом буфере. Они должны быть в 2 раза концентрированнее, чем их предельный титр, т. е. должны содержать 2 антигенных единицы (АЕ).

2.1.2.6. Рабочие разведения сывороток и антигенов для лабораторной диагностики везикулярных заболеваний сельскохозяйственных животных готовят по пп. 2.1.2.4 и 2.1.2.5.

2.1.3. Проведение исследования

2.1.3.1. В пробирки (лунки), заполненные в соответствии с п. 2.1.2.1, вносят равные объемы штаммоспецифических сывороток, взятых в рабочем титре, и рабочего разведения комплемента, содержащие 5 CH_{50}. В контролях исследуемого патологического материала на антикомплементарность заменяют сыворотки равным объемом разбавителя, а в контроле на гемолитические свойства — разбавителем заменяют и комплемент. Все полученные смеси тщательно встряхивают и помещают в водяную баню или тер-

мостат при 37°С на 30 мин, после чего к ним добавляют суспензию эритроцитов, сенсибилизированных гемолизином, в объеме 0,2 см³ (пробирки) или 0,05 см³ (лунки), энергично встряхивают и выдерживают при 37°С в течение 20 мин.

Пробирки или панели извлекают из термостата или водяной бани и осаждают эритроциты центрифугированием в течение 5 мин с частотой вращения 600 об/мин или отстаиванием в течение 2—3 ч при комнатной температуре.

При исследовании недоброкачественных афтозных материалов, а также при исследовании сердечной мышцы объем исследуемых суспензий увеличивают в 4 раза при сохранении объема и концентрации остальных компонентов реакции в обычных пределах.

Для повышения чувствительности РСК применяют реакцию длительного связывания комплемента (РДСК), при которой первая фаза протекает при 4°С в течение 16—20 ч.

2.1.4. Обработка результатов

Оценку результатов проводят визуально.

Реакцию считают положительной, если в ряду пробирок (лунок) с какой-либо штаммоспецифической сывороткой отмечается задержка гемолиза не менее 50% эритроцитов при полном гемолизе в параллельных рядах с другими штаммоспецифическими сыворотками и в контроле с пробами патологического материала на антикомплементарность. Возбудитель относится к тому варианту вирусов ящура, с сывороткой которого титр исследуемой суспензии окажется выше.

Отрицательная реакция не исключает ящура или иного сходного с ним заболевания, поскольку концентрация вирусоспецифического антигена в исследуемом материале может оказаться слишком низкой для обнаружения в РСК.

2.2. Методы выявления вируса

Сущность методов заключается в выявлении биологического действия вируса на восприимчивые и чувствительные биологические системы и его последующей идентификации серологическим методом.

2.2.1. Аппаратура, материалы и растворы

2.2.1.1. Для проведения исследования применяют:

термостат с температурой нагрева 37°С;

пипетки вместимостью до 10 см³ с ценой деления 0,01 см³ по ГОСТ 20292—74;

культуры монослойные первичных клеток почки свиней (СП), телят, взрослого крупного рогатого скота (ВП) и ягнят (ПЯ) и перевиваемых линий ВНК-21 и IB-RS-2 в пробирках и флаконах вместимостью 50, 100, 500 и 1000 см³;

среду питательную для культивирования клеток с 0,5% гидролизата лактабумина (pH 7,4—7,6);

среду питательную Игла для культивирования клеток перевиваемых линий;

раствор Хенкса солевой, pH 7,2—7,4.

2.2.2. Подготовка к исследованию

2.2.2.1. Суспензии стенок и содержимого афт, полученные в соответствии с пп. 1.5, 1.6 и 1.8, и оказавшиеся неактивными в РСК, а также суспензии лимфатических узлов, сердечной мышцы, поджелудочной железы, свернувшейся крови и пищеводноглоточную слизь, полученные в соответствии с пп. 1.7 и 1.9, используют для заражения монослойных культур первичнотрипсинизированных клеток (СП, ВП, ПЯ, щитовидной железы крупного рогатого скота), перевиваемых линий (ВНК-21 и IB-RS-2), десять мышат 3—6-дневного возраста и пять морских свинок. Допускается заражение двух голов крупного рогатого скота в 18-месячном возрасте и четырех поросят 3-месячного возраста, не содержащих в крови специфических антител.

2.2.3. Проведение исследования

2.2.3.1. *Проведение биопробы на культурах клеток*

Отбирают пробирки (флаконы) с хорошо сформированным монослоем без признаков старения и неспецифической дегенерации. На каждую пробу исследуемого материала берут по 10 пробирок или по 2—3 флакона с перечисленными клеточными культурами. Непосредственно перед инокуляцией культуры дважды отмывают от ростовой питательной среды раствором Хенкса. Затем в пробирочные культуры вносят по 0,1—0,2 $см^3$, а во флаконы от 0,5 до 10 $см^3$ (в зависимости от площади монослоя) исследуемых суспензий. Инокулированные культуры выдерживают в термостате при температуре 37°С в течение 60 мин, затем освобождают от исследуемой суспензии и заливают поддерживающей питательной средой. Одновременно ставят контроль на цитотоксичность раствора Хенкса. Инокулированные контрольные культуры помещают в термостат при температуре 37°С и в течение 7 дней проводят микроскопию для выявления дегенерации клеток. В случае обнаружения дегенерации только в инокулированных культурах проводят дополнительный пассаж культуральной суспензии, полученной после однократного промораживания культур с дегенерацией монослоя при температуре минус 20°С. Полученную при этом суспензию осветляют центрифугированием в течение 15 мин с частотой вращения 3000 об/мин и затем заражают исходные культуры в том же порядке, который предусмотрен для исследуемых суспензий проб патологического материала.

Специфичность дегенерации клеток проверяют в РСК.

2.2.3.2. *Постановка биопробы на животных*

Биопробу ставят на морских свинках, мышатах 3—6-суточного возраста и естественно-восприимчивых к ящуру животных.

Используют клинически здоровых особей, в анамнезе которых полностью исключены предварительные контакты с вирусом ящура. Мышатам исследуемую суспензию инокулируют подкожно в дозе 0,1 см³, морским свинкам — в кожу подушечек обеих задних конечностей методом тунелирования в дозе 0,2—0,5 см³. Крупному рогатому скоту материал вводят в толщу эпителия языка и в мякиши всех конечностей в дозе 2—3 см³. За инокулированными животными наблюдают в течение 7 дней. В случае гибели подопытных мышат проводят дополнительный пассаж материала, приготовленного из тушек павших мышат, и исследование в РСК в соответствии с п. 2.1.

При появлении у остальных видов животных везикулярных поражений кожи в местах инокуляции исследуемого материала отбирают пробы содержимого афт в соответствии с п. 1.2, готовят из них суспензии в соответствии с пп. 1.5 и 1.6 и исследуют в РСК в соответствии с п. 2.1.

2.2.4. Обработка результатов

2.2.4.1. Пробу исследуемого патологического материала считают отрицательной, если во втором и последующем пассажах не будет отмечено дегенерации клеток и падежа белых мышат, а при исследовании полученных из них суспензий в РСК не будет обнаружен антиген вируса ящура.

gost.e-ecolog.ru