УДК 636 : 576.8.07 : 006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ

Методы лабораторной диагностики инфекционного ларинготрахеита

Agricultural poultry.
Methods of laboratory diagnostics
of infectious laringotracheitis

ГОСТ 25582—83

(СТ СЭВ 1743—79)

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 6 января 1982 г. № 17 срок действия установлен

с 01.07.83
до 01.07.88

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

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

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

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 1743—79.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для вирусологического исследования берут пробы патологического материала — часть слизистой оболочки гортани, трахеи, конъюктивы, носовых ходов (включая экссудаты) и легких от только что павших или убитых с диагностической целью птиц в начальной фазе их заболевания — на 2—7 сут.

Отобранные пробы замораживают и до проведения исследований сохраняют при температуре минус 20°С и ниже.

1.2. Для серологического исследования берут на 14 и 28 сут от начала болезни кровь по 5 см³ не менее чем от пяти голов птицы. Отделяют сыворотку крови и до начала исследований сохраняют ее (не добавляя консервантов) в замороженном состоянии при температуре минус 20°С и ниже.

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

gost.e-ecolog.ru

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Метод выделения вируса

Сущность метода заключается в выделении возбудителя заболевания на куриных эмбрионах или на культуре клеток.

2.1.1. *Аппаратура и материалы*

Для проведения исследования применяют:

термостат или инкубатор вакуумный с температурой нагрева 37—38°С;

ступки фарфоровые;

центрифугу лабораторную с частотой вращения 3000—5000 об/мин;

измельчитель ткани;

пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82;

флаконы;

термометр;

шприцы с иглами;

пенициллин;

стрептомицин;

эмбрионы куриные 9—12-суточного возраста;

культуру клеток почек куриных эмбрионов и цыплят;

гидролизат лактальбумина 0,5% в растворе Хенкса.

2.1.2. *Подготовка к исследованию*

Пробы патологического материала, взятые для выделения вируса, гомогенизируют в изотоническом буферном растворе в концентрации 1 : 5 с помощью измельчителя ткани или в ступке с кварцевым стеклом. Смесь центрифугируют с частотой вращения 1500—2000 об/мин в течение 10—15 мин. Надосадочную жидкость сливают, добавляют по 1000 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 $см^3$ суспензии и выдерживают в течение 3—12 ч при 2—4°С.

2.1.3. *Проведение исследования*

При выделении вируса на куриных эмбрионах для каждой пробы используют по 10 куриных эмбрионов. Полученную после обработки пробы суспензию инокулируют на хориоаллантоисную оболочку или в хориоаллантоисную полость в количестве 0,1—0,2 $см^3$. Зараженные эмбрионы одновременно с контрольными инкубируют при температуре 37°С в течение 8 сут. Эмбрионы овоскопируют не реже чем один раз в сутки. Эмбрионы, погибшие в первые 24 ч, отбрасывают, а эмбрионы, погибшие позже, удаляют и сохраняют в холодильнике при температуре 4°С. Оставшиеся живые эмбрионы убивают на 6—8 сут после инокулирования охлаждением в течение 2—3 ч при 4°С.

2.1.4. *Обработка результатов*

2.1.4.1. Гибель эмбрионов в течение 4—6 сут свидетельствует о наличии вирулентного штамма вируса инфекционного ларинготрахеита. Гибель эмбрионов позднее указанных сроков или отставание эмбрионов в развитии по размерам и массе свидетельствует о заражении более мягкими штаммами вируса.

2.1.4.2. Для выявления специфических поражений куриного эмбриона проводят дополнительно 2—3 пассажа.

Для последующего пассажа вируса используют для заражения хориоаллантоисную оболочку, суспензированную в аллантоисной жидкости, и весь эмбрион.

Специфические поражения куриных эмбрионов, погибших через 3—5 сут после заражения, характеризуются: помутнением и утолщением хориоаллантоисной оболочки, наличием мелких (мелкозернистые, величиной 1—4 мм) или крупных (диаметром 5—7 мм) бляшек от серого до желто-белесого цвета различной морфологии — круглые, плоские или неправильной формы.

2.1.4.3. Выделение вируса подтверждают установлением внутриклеточных включений (телец Зейфрида), реакцией нейтрализации, реакцией диффузионной преципитации в агаровом геле или биопробой. Идентификацию вируса проводят также методом иммунофлуоресценции и электронной микроскопии.

2.1.4.4. При заражении вирусом инфекционного ларинготрахеита культуры клеток почек куриных эмбрионов и цыплят цитопатический эффект появляется на 4—6 сут после инокулирования. Наблюдают множество многоядерных поликариоцитов. Под микроскопом обнаруживают внутриядерные включения. Специфичность этих изменений доказывают иммунофлуоресценцией или с помощью специфических сывороток в реакции нейтрализации.

2.2. Метод постановки биопробы

Сущность метода заключается в воспроизведении инфекционного ларинготрахеита на цыплятах. Метод позволяет определить вирулентность штамма, а также провести дифференциацию его от вирусов, вызывающих сходное поражение хориоаллантоисной оболочки у инфицированных куриных эмбрионов.

2.2.1. *Аппаратура и материалы*

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

пипетки пастеровские.

2.2.2. *Проведение исследования*

Биопробу ставят на цыплятах 1—2,5-месячного возраста путем внутритрахеальной аппликации вируссодержащего материала и втирания его в слизистую оболочку клоаки.

За выжившими цыплятами наблюдают в течение 10—14 сут.

Для исключения вируса оспы кур, вызывающего на хорио-аллантоисной оболочке поражения, сходные с вирусом инфекционного ларинготрахеита, заражают цыплят 30—60-суточного возраста методом аппликации вируссодержащего материала в скарифицированные перьевые фолликулы голени, гребешок и гортань.

2.2.3. *Обработка результатов*

Инфекционный ларинготрахеит диагносцируют при появлении у зараженных цыплят на 3—7 сут, но не позднее 12 сут клинических признаков: кашля, хрипов, поражений гортани, ринита.

У птиц, зараженных клоачно, наблюдается воспаление слизистой оболочки. Некоторые более мягкие штаммы, даже и в больших дозах, вызывают только хрипы и истечения из носа. Оспенная реакция у зараженной птицы проявляется на 6—8 сут в форме припухания и покраснения фолликул и образования ложных дифтеритических наложений в ротовой полости. При вирусоскопии по Морозову в мазках из развившихся фолликул обычно обнаруживают оспенные элементарные тельца.

2.3. Серологический метод

Сущность метода заключается в выявлении у птиц специфических антител в реакции нейтрализации (РН).

2.3.1. *Аппаратура, материалы, реактивы и питательные среды*

Для проведения исследования применяют:
баню водяную;
термостат с температурой нагрева 37—38°С;
холодильник с морозильной камерой;
штативы;
горелки газовые или спиртовые;
пробирки бактериологические;
пробки резиновые;
пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 и 100 $см^3$ по ГОСТ 20292—74;
измельчитель ткани;
потенциометр;
чашки Петри по ГОСТ 25336—82;
стекла предметные по ГОСТ 9284—75;
натрий хлористый по ГОСТ 4233—77;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72;
пенициллин;
стрептомицин;
эмбрионы куриные 9—12-суточного возраста;
культуру клеток почек куриных эмбрионов и цыплят;
среды питательные для культуры клеток.

2.3.2. *Подготовка к исследованию*

2.3.2.1. Антиген для проведения реакции нейтрализации готовят из хориоаллантоисной оболочки куриных эмбрионов с характерными для данного вируса изменениями. Хориоаллантоисную оболочку гомогенизируют с равным количеством буферного изотонического раствора с pH от 7,2 до 7,4, к которому добавлены антибиотики из расчета по 100 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 см³ раствора.

Суспензию центрифугируют в течение 10 мин с частотой вращения 1500—2000 об/мин.

Надосадочную жидкость сливают и используют в качестве антигена, если она содержит вируса не менее 10^5 ЕІД 50/см³. До употребления антиген сохраняют в запаянных ампулах в замороженном состоянии.

2.3.2.2. Сыворотки (больных и переболевших птиц, контрольные положительные и отрицательные сыворотки птиц) инактивируют в водяной бане при температуре 56°С в течение 30 мин и до начала исследования сохраняют также в замороженном состоянии.

2.3.3. *Проведение исследования*

Реакцию нейтрализации проводят на куриных эмбрионах или на культурах клеток, используя постоянные количества сыворотки и прогрессивно нарастающие 10-кратные разведения вируса-антигена.

Реакция нейтрализации проводится в соответствии с таблицей.

Номер ряда	Номер пробирки	Нормальная сыворотка, см³	Иммунная сыворотка, см³	Разведение вируса				
				1:5	1:50	1:500	1:5000	1:50000
1	1	0,5	—	0,5	—	—	—	—
	2	0,5	—	—	0,5	—	—	—
	3	0,5	—	—	—	0,5	—	—
	4	0,5	—	—	—	—	0,5	—
	5	0,5	—	—	—	—	—	0,5
2	1	—	0,5	0,5	—	—	—	—
	2	—	0,5	—	0,5	—	—	—
	3	—	0,5	—	—	0,5	—	—
	4	—	0,5	—	—	—	0,5	—
	5	—	0,5	—	—	—	—	0,5

В штатив ставят несколько рядов стерильных пробирок. Число рядов соответствует числу испытуемых сывороток, а число пробирок в ряду — числу разведений вирусного антигена. Во все пробирки из ряда вносят по 0,5 см³ соответствующей сыворотки. Параллельно с этим ставят контрольный опыт с нормальной (известной отрицательной) и иммунной (известной положительной) сы-

воротками против инфекционного ларинготрахеита в этой же дозе. Затем во все пробирки с испытуемыми и контрольными сыворотками добавляют одинаковое количество (0,5 см^3) соответствующих 10-кратных разведений вирусного антигена. Антиген можно разливать одной и той же пипеткой, если начать с самого большого разведения. Пробирки встряхивают энергично и оставляют при комнатной температуре в течение суток.

Каждым разведением инокулируют по 4—5 эмбрионов (или 4—5 пробирок культуры клеток) путем инокуляции на хориоаллантоисной оболочке или в хориоаллантоисную полость в количестве 0,2 см^3.

Эмбрионы инкубируют при температуре 37°С на протяжении суток, проводя овоскопию ежедневно не менее одного раза. Погибшие в первые 24 ч эмбрионы отбрасывают, а остальные вскрывают на 6 сут для выявления специфических изменений на поверхности хориоаллантоисной оболочки.

В реакции нейтрализации используются неразведенные сыворотки, так как могут возникнуть некоторые нежелательные различия между нейтрализационными индексами одной и той же сыворотки, использованной в разведенном и неразведенном состоянии. При недостаточном количестве сыворотки ее разводят до необходимого минимума (1 : 2, 1 : 3 и т. д.). В этом случае полученный индекс нейтрализации умножают на соответствующий фактор разведения (1 : 2, 1 : 3 и т. д.).

2.3.4. *Обработка результатов*

2.3.4.1. Эмбриональную инфекционную дозу 50% (или инфекционную дозу 50% в культурах тканей) вычисляют отдельно для каждой сыворотки на основании полученных результатов реакции нейтрализации. Индекс нейтрализации представляет разность между логарифмическими показателями титров вируса в присутствии нормальной (отрицательной) и иммунной (положительной) сывороток, подсчитанную по Риду и Менчу. Найденное по таблице антилогарифмов число будет являться индексом нейтрализации.

2.3.4.2. Вирусный изолят, который нейтрализуется положительной сывороткой против инфекционного ларинготрахеита с индексом выше 50, индентифицируют как вирус инфекционного ларинготрахента.

Сыворотку с индексом нейтрализации 10 или меньше в реакции нейтрализации с известным штаммом вируса инфекционного ларинготрахеита считают отрицательной, сыворотку с индексом 11—49 — сомнительной, с индексом 50 и выше — положительной.

2.4. Метод флуоресцирующих антител

Сущность метода заключается в обнаружении вирусного антигена при помощи специфической иммунофлуоресцентной сыворот-

ки, в мазках из слизистой оболочки трахеи или конъюктивы птиц в ранней острой фазе болезни, в хориоаллантоисной оболочке и инфицированных культурах клеток.

2.4.1. *Аппаратура, реактивы и материалы*

Для проведения исследования применяют:

микроскоп люминесцентный;

термостат;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

кюветы металлические;

натрий хлористый по ГОСТ 4233—77, 0,85%-ный раствор;

ацетон по ГОСТ 2603—79;

раствор фосфатно-буферный 0,01 М концентрации pH 7,2—7,4, содержащий 0,85% хлористого натрия;

масло иммерсионное нелюминесцирующее;

сыворотку флуоресцирующую.

2.4.2. *Проведение исследования*

Мазки-отпечатки, приготовленные на предметном стекле из пораженной хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона, слизистой трахеи, конъюктивы больной птицы, а также культуры клеток, выращенной на стекле, подсушивают на воздухе, споласкивают физиологическим раствором и выдерживают в ацетоне при 4°С в течение 10 мин. Препараты укладывают на увлажненное дно кюветы и наносят на каждый препарат по 0,5 $см^3$ рабочего разведения флуоресцирующей сыворотки.

В качестве контрольной используют для окрашивания препаратов нормальную флуоресцирующую сыворотку. Кювету закрывают крышкой и выдерживают 30 мин в термостате при 37°С. Окрашенные препараты промывают в течение 2 ч в проточной водопроводной воде.

Подсушенные препараты просматривают под люминесцентным микроскопом с иммерсионным объективом.

Результат оценивают в зависимости от степени свечения и числа флуоресцирующих клеток.

2.4.3. *Обработка результатов*

У больной птицы в период острого течения болезни в мазках наблюдается свечение антител.

Изменение № 1 ГОСТ 25582—83 Птица сельскохозяйственная. Методы лабораторной диагностики инфекционного ларинготрахеита

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 2.1.2. Заменить слова и значения: «изотоническом буферном» на «физиологическом», 3—12 ч на 1—2 ч;

дополнить словами: «Проводят контроль надосадочной жидкости на стерильность с использованием питательных сред мясопептонного бульона (МПБ), мясопептонного агара (МПА), мясопептонного печеночного бульона под вазелиновым маслом (МППБ), агара Сабуро».

(Продолжение см. с. 350)

(Продолжение изменения к ГОСТ 25582—83)

Пункт 2.1.3. Заменить значение: 8 сут на 6 сут.

Пункт 2.1.4.1. Исключить слова: «Гибель эмбрионов позднее указанных сроков или отставание эмбрионов в развитии по размерам и массе свидетельствует о поражении более мягкими штаммами вируса»

Пункт 2.1.4.3 изложить в новой редакции: «2.1.4.3. Выделение вируса подтверждают реакцией нейтрализации и биопробой».

Пункт 2.3.2.1. Заменить слова: «буферного изотонического» на «физиологического».

Пункт 2.3.3. Пятый абзац. Заменить слово: «суток» на 6 сут.

Пункты 2.4—2.4.3 исключить.

(ИУС № 6 1988 г.)

gost.e-ecolog.ru