ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 55763— 2013

ЖИВОТНЫЕ НЕПРОДУКТИВНЫЕ

Метод ретроспективной диагностики инфекционного ринотрахеита кошек в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 ноября 2013 г. № 1523-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (gost.ru)

© Стандартинформ, 2014

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЖИВОТНЫЕ НЕПРОДУКТИВНЫЕ

Метод ретроспективной диагностики инфекционного ринотрахеита кошек в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)

Unproductive animals.
Method of retrospective diagnostics of feline viral rhinotracheitis via red cell-linked-antigen test (RNGA)

Дата введения — 2015—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на непродуктивных животных и устанавливает метод ретроспективной диагностики инфекционного ринотрахеита кошек в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

Примечание — РНГА можно использовать для оценки качества (активности) иммунобиологических препаратов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.0.004—90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.008—76 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.4.011—89 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация

ГОСТ ISO 7218—2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO 7864—2011 Иглы инъекционные однократного применения стерильные

ГОСТ ISO 7886-1—2011 Шприцы инъекционные однократного применения стерильные. Часть 1. Шприцы для ручного использования

ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если изменен ссылочный стандарт, на который дата датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

Издание официальное

3 Термины и определения

3.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **инфекционный ринотрахеит кошек;** ИРТ: Остро протекающая контагиозная болезнь, вызываемая вирусом инфекционного ринотрахеита кошек (герпесвирусом типа 1) семейства герпесвирусов, характеризующаяся воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей и поражением глаз.

3.1.2 **реакция непрямой гемагглютинации;** РНГА: Метод выявления антигенов или антител, основанный на способности эритроцитов, на поверхности которых предварительно адсорбированы антигены или антитела, агглютинировать в присутствии гомологичных сывороток или соответствующих антигенов.

3.1.3 **агглютинация:** Склеивание и выпадение в осадок эритроцитов с адсорбированными на них антигенами или антителами.

3.1.4 **агглютинация неспецифическая:** Образование ложных скоплений эритроцитов при проведении серологической реакции из-за нарушения условий ее проведения (изменение температуры или pH растворов).

3.1.5 **антигены:** Вещества белковой природы, несущие признаки генетически чужеродной информации, способные вызывать в организме формирование антител.

3.1.6 **антигенная активность:** Способность антигенов вызывать специфический иммунный ответ, обусловленная особенностями макромолекулярной организации этих веществ и генетическими особенностями организма.

3.1.7 **антитела:** Вещества белковой природы, образующиеся в организме в ответ на введение антигенов.

3.1.8 **гемагглютинация:** Склеивание и выпадение в осадок эритроцитов под действием сыворотки, содержащей антитела к определенному антигену.

3.1.9 **ретроспективная диагностика:** Исследование парных сывороток крови подозреваемых в заболевании (или больных) животных для выявления прироста антител в сыворотке, взятой через 21 день от начала заболевания, по сравнению с сывороткой, взятой в начале заболевания.

3.1.10 **самоагглютинация:** Спонтанное склеивание и выпадение в осадок эритроцитов.

3.1.11 **специфический антигенный эритроцитарный диагностикум:** Компонент РНГА, представляющий собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами.

3.1.12 **специфичность антигенов:** Свойство антигенов вступать во взаимодействие только с определенными типами антител, определяемое структурными особенностями их молекул.

3.1.13 **сыворотка крови:** Жидкая фаза крови, формирующаяся после ретракции кровяного сгустка.

3.1.14 **титр сыворотки крови (титр антител в сыворотке):** Предельное разведение сыворотки, при котором обнаруживается способность антител агглютинировать эритроцитарный антигенный диагностикум.

4 Условия выполнения исследования и требования безопасности

4.1 Условия выполнения исследования

4.1.1 Общие требования проведения микробиологических исследований и работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности — по ГОСТ ISO 7218 и [1].

4.1.2 Общие требования к помещениям — по ГОСТ ISO 7218.

4.1.3 Требования к персоналу — по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ ИСО/МЭК 17025 и [1].

К проведению исследований допускаются квалифицированные сотрудники, имеющие опыт работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности, изучившие методики микробиологических работ.

4.2 Требования безопасности

4.2.1 Общие требования безопасности при проведении работ согласно ГОСТ 12.1.008.

4.2.2 Средства защиты работающих должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.4.011.

4.2.3 Воздух рабочей зоны должен соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.005.

4.2.4 Обучение персонала безопасности труда в соответствии с ГОСТ 12.0.004.

4.2.5 Утилизацию оставшегося после исследования материала, а также использованных индивидуальных средств защиты, инструментов и т. д. проводят путем кипячения в течение 30 мин или автоклавирования в течение 15 мин при давлении (0,11 ± 0,20) МПа.

5 Сущность метода

Сущность метода ретроспективной диагностики ИРТ кошек в реакции непрямой агглютинации (РНГА) заключается в способности антител исследуемой сыворотки вызывать агглютинацию эритроцитов с адсорбированным на их поверхности специфическим антигеном.

6 Отбор проб

6.1 Оборудование и посуда

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая скорость вращения не менее 1500 об/мин.

Холодильник, обеспечивающий поддержание температуры от минус 10 °С до минус 50 °С.

Пробирки полимерные одноразовые вместимостью 3—5 см^3.

Шприцы однократного применения по ГОСТ ISO 7864.

Иглы инъекционные однократного применения стерильные по ГОСТ ISO 7864.

Допускается применять другое оборудование и посуду с техническими характеристиками не хуже вышеуказанных.

6.2 Шприцем отбирают не менее 1 см^3 крови исследуемых натощак кошек из яремной вены с интервалом в 18—21 день (парные пробы) и медленно переносят отобранные пробы в пробирку вместимостью 5 см^3, предотвращая вспенивание, с соблюдением правил асептики и антисептики.

Из отобранных проб крови методом отстоя или центрифугирования при малых оборотах (1500—2000 об/мин) получают сыворотку, которую замораживают при температуре от минус 10 °С до минус 30 °С и хранят до получения второй пробы крови.

Срок хранения проб крови при комнатной температуре — не более 6—8 ч, в холодильнике — не более 24 ч. Сыворотки крови, замороженные при температуре минус 20 °С и ниже, хранят не более 3 мес.

6.3 Полученные сыворотки исследуют одновременно, не позднее трех суток после последнего взятия пробы крови.

7 Проведение исследования

7.1 Оборудование и материалы

Набор для выявления антител к вирусу ИРТ кошек в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), в состав которого входят:

- диагностикум специфический эритроцитарный антигенный;
- сыворотка специфическая положительная с определенным титром антител к ИРТ (не ниже 1:64);
- сыворотка специфическая отрицательная, не содержащая антител к ИРТ;
- растворитель [фосфатно-буферный физиологический раствор (ФБР) с pH 7,2].

Микропипетки многоканальные автоматические вместимостью 0,02—0,2 см^3.

Наконечники одноразовые к многоканальным пипеткам.

Микропанель.

Баня водяная лабораторная, обеспечивающая поддержание температуры (100 ± 1) °С.

Допускается применять другое оборудование и материалы с техническими характеристиками не хуже вышеуказанных.

7.2 Проведение исследования

7.2.1 Сыворотки крови кошек, отобранные по 6.2, прогревают на водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин для освобождения от неспецифических ингибиторов.

7.2.2 Во все лунки микропанели вносят по 0,05 см^3 ФБР с pH 7,2.

Первый ряд лунок панели используют для постановки контроля эритроцитарного диагностикума на самоагглютинацию. Для этого в каждую лунку этого ряда вносят по 0,05 см^3 суспензии эритроцитарного диагностикума.

Второй ряд лунок используют для контроля специфической активности положительной сыворотки. Для этого в первую лунку второго ряда с помощью автоматической пипетки вносят 0,05 см^3 специфической положительной сыворотки. Путем пипетирования и последовательного переноса получают двукратные разведения специфической положительной сыворотки в соотношении от 1:2 до 1:256. Затем во все лунки второго ряда вносят по 0,025 см^3 специфического эритроцитарного антигенного диагностикума.

Третий ряд лунок используют для постановки контроля неспецифической агглютинации эритроцитарного антигенного диагностикума со специфической отрицательной сывороткой. В первую лунку третьего ряда вносят 0,05 см^3 специфической отрицательной сыворотки. Путем пипетирования и последовательного переноса получают двукратные разведения отрицательной специфической сыворотки в соотношении от 1:2 до 1:256. Затем во все лунки третьего ряда также вносят по 0,025 см^3 специфического эритроцитарного антигенного диагностикума.

Четвертый и последующие ряды лунок микропанели используют для титрования исследуемых парных сывороток кошек. Для этого в первую лунку ряда с помощью автоматической пипетки вносят 0,05 см^3 испытуемой сыворотки. Путем пипетирования и последовательного переноса получают ее двукратные разведения в соотношении от 1:2 до 1:256. Затем во все лунки ряда вносят по 0,025 см^3 специфического эритроцитарного антигенного диагностикума.

7.3 Оценка результатов

7.3.1 Результаты исследования оценивают через 2—3 ч после постановки реакции. Оценку реакции проводят по четырехбалльной системе в крестах.

Сначала оценивают реакцию в контроле на самоагглютинацию в первом ряду лунок. Эритроциты должны осесть во всех лунках в виде точек (пуговок) или плотных колец.

Затем оценивают реакцию во втором ряду лунок (положительный контроль). Положительная реакция характеризуется осаждением эритроцитов в виде «зонтика» с ровными или зубчатыми краями и оценивается, как полная агглютинация (++++); если зонтик покрывает 2/3 части дна лунки или занимает половину ее, агллютинация оценивается, как частичная, а реакция — как сомнительная (+++); если зонтик занимает половину лунки, а остальные эритроциты осели в виде рыхлого колечка, реакцию оценивают на (++). Отрицательная реакция (отрицательный контроль) в третьем ряду лунок характеризуется осаждением эритроцитов так же, как в контроле на самоагглютинацию в первом ряду лунок в виде точек (пуговок) или плотных колец.

По результатам титрования парных сывороток в четвертом и последующих рядах делают вывод о наличии ИРТ у подозреваемых в заболевании животных. Увеличение титров антител в сыворотке, взятой через 21 день после первого крововзятия, в три и более раз свидетельствует о наличии заболевания кошки ИРТ.

Библиография

[1] СП 1.3.2322—2008 Безопасность работы с микроорганизмами III и IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней

УДК 619.636.8:006.034 ОКС 11.220
65.020.30

Ключевые слова: непродуктивные животные, инфекционный ринотрахеит кошек, метод ретроспективной диагностики, реакция непрямой гемагглютинации, термины и определения, условия выполнения испытания и требования безопасности, сущность метода, отбор проб, выявление антител

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *Е.В. Беспрозванная*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 16.10.2014. Подписано в печать 24.10.2014. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,63. Тираж 35 экз. Зак. 4380.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru)@gostinfo.ru

gost.e-ecolog.ru