ГОСТ 28573—90

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

СВИНЬИ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ

Издание официальное

БЗ 9—2004

Москва
Стандартинформ
2005

gost.e-ecolog.ru

УДК 636.4.001.4:006.354 Группа С79

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

СВИНЬИ

Методы лабораторной диагностики африканской чумы

Pigs. Methods of laboratory diagnostics of african plague

ГОСТ 28573—90

МКС 65.020.30
ОКСТУ 9809

Дата введения 01.01.91

Настоящий стандарт распространяется на свиней и устанавливает методы лабораторной диагностики африканской чумы.

Стандарт предназначен для диагностирования заболевания свиней в ветеринарных лабораториях и ветеринарных научно-исследовательских учреждениях.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для проведения исследований от вынужденно убитых больных и павших свиней берут пробы органов и тканей — лимфатических узлов (подчелюстной, протальный и мезентериальный), селезенки, легкого, крови и костного мозга.

Пробы берут не позднее чем через 10 ч после убоя или гибели животных.

1.2. Пробы органов и крови хранят и транспортируют в термосе при 4 °С—8 °С не более 24 ч после отбора. При более длительном хранении пробы замораживают.

2. МЕТОД ПРЯМОЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Сущность метода заключается в соединении специфических иммуноглобулинов африканской чумы свиней (АЧС), меченных флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), со специфическим антигеном вируса АЧС в зараженных клетках и обнаружении комплекса «антиген-антитело» люминесцентной микроскопией.

2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Микроскоп люминесцентный.

Криостат.

Термостат.

Автоклав.

Холодильник бытовой.

Центрифуга лабораторная любого типа, обеспечивающая частоту вращения 5000 мин$^{-1}$.

Шприцы по МРТУ 46—23.

Банка цилиндрическая по ГОСТ 25336.

Стекла покровные по ГОСТ 6672.

Стекла предметные по ГОСТ 9284.

Пипетка пастеровская.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 11773.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1990
© Стандартинформ, 2005

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300.
Ацетон по ГОСТ 2603.
Эфир этиловый по ГОСТ 22300.
Парафин по ГОСТ 23683.
Глицерин для микроскопии по ГОСТ 6824.
Гепарин.
Раствор фосфатный буферный pH 7,2—7,4.
ФИТЦ-иммуноглобулины АЧС.
ФИТЦ-иммуноглобулины классической чумы свиней (КЧС).
Вида дистиллированная.

2.2. Подготовка к анализу

2.2.1. Приготовление фосфатного буферного раствора pH 7,2—7,4

Раствор А. В 1 $дм^3$ дистиллированной воды растворяют 1,78 г двузамещенного фосфорнокислого натрия.

Раствор Б. В 1 $дм^3$ дистиллированной воды растворяют 1,36 г однозамещенного фосфорнокислого калия.

К 850 $см^3$ раствора А добавляют 250 $см^3$ раствора Б. В 1 $дм^3$ полученной смеси растворяют 8,5 г хлористого натрия. Полученный раствор стерилизуют в автоклаве в течение 2,5 ч при 2 атм.

2.2.2. Приготовление буферного раствора глицерина

9 $см^3$ глицерина смешивают с 1 $см^3$ фосфатного буферного раствора.

2.2.3. Приготовление тест-препаратов (срезов, мазков-отпечатков)

2.2.3.1. От лимфатических узлов (подчелюстного, портального и мезентериального), селезенки и легких двух-трех свиней при помощи криостата берут пробы массой 5—10 г. Из проб готовят срезы толщиной 5 мк и помещают их на покровные стекла, предварительно обезжиренные смесью спирт-эфира в соотношении 1:1. Из каждого органа готовят четыре тест-препарата.

2.2.3.2. Из лейкоцитов крови больных и интактных свиней готовят мазки-отпечатки. Для этого из краниальной полой вены берут 10—15 $см^3$ крови в пробирку, содержащую гепарин 10—20 ЕД/$см^3$. Кровь в пробирке осторожно перемешивают и выдерживают 30 мин при температуре 37 °С. Пастеровской пипеткой отбирают плазму с лейкоцитами, переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 10 мин с частотой вращения 1000 $мин^{-1}$. Надосадочную жидкость удаляют, а лейкоциты осадка наносят на покровные стекла и готовят по четыре мазка-отпечатка на одну пробу крови.

2.2.3.3. Тест-препараты высушивают при комнатной температуре в течение 15—20 мин, помещают в сосуд с ацетоном, выдерживают 10—15 мин при температуре минус 10 °С и подсушивают на воздухе при комнатной температуре до полного испарения ацетона.

2.3. Проведение анализа

Подготовленные тест-препараты обрабатывают ФИТЦ-иммуноглобулинами АЧС и КЧС. Для этого на предметные стекла, помещенные во влажную камеру, наносят капли ФИТЦ-иммуноглобулинов и на них помещают тест-препараты срезом или мазком-отпечатком вниз. Камеру помещают в термостат и выдерживают 30 мин при температуре 37 °С. Затем тест-препараты промывают в фосфатном буферном растворе в течение 10 мин дважды со сменой раствора, ополаскивают в дистиллированной воде, подсушивают при комнатной температуре и помещают на капли раствора глицерина, нанесенные на предметные стекла. Края предметных стекол окантовывают расплавленным парафином. Тест-препараты просматривают под люминесцентным микроскопом.

2.4. Оценка результатов

В клетках тест-препаратов органов и крови свиней, зараженных вирусом АЧС и обработанных ФИТЦ-иммуноглобулином АЧС, специфический антиген обнаруживают по свечению зеленого или желто-зеленого цвета в форме отдельных гранул (включений) в перинуклеарной зоне на фоне диффузного свечения зеленого или желто-зеленого цвета цитоплазмы клеток лимфоидного ряда или макрофагов.

В клетках тест-препаратов органов и крови свиней, не зараженных вирусом АЧС, обнаруживают тусклое свечение клеток серо-зеленого цвета.

При обработке ФИТЦ-иммуноглобулином КЧС тест-препаратов, приготовленных из проб органов и крови свиней, больных КЧС, обнаруживают ярко-зеленое свечение цитоплазмы клеток, часто расположенных группами.

3. МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Сущность метода заключается в инокуляции культуры лейкоцитов или костного мозга свиньи исследуемого материала и обнаружении реакции гемадсорбции или вирусоспецифического антигена в клетках прямой иммунофлуоресценцией.

3.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Термостат, обеспечивающий температуру нагрева 37 °С.

Центрифуга лабораторная любого типа, обеспечивающая частоту вращения 5000 $мин^{-1}$.

Шкаф сушильный.

Микроскоп биологический.

Микроскоп люминесцентный.

Холодильник бытовой.

Мешалка магнитная.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$ по ГОСТ 29227.

Пробирки бактериологические.

Камера Горяева.

Стекла покровные по ГОСТ 6672.

Стекла предметные по ГОСТ 9284.

Цилиндры мерные вместимостью 50 и 100 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Банка цилиндрическая по ГОСТ 25336.

Ступка фарфоровая с пестиком.

Чашки Карреля.

Трубка силиконовая.

Иглы типа «Рекорд» 1А1-16-90-115.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300.

Трепановый синий, раствор с массовой долей 0,5 %.

Монохлорамин Б технический по ГОСТ 14193, раствор с массовой долей 5 %.

Гидролизат лактальбумина на растворе Эрла, раствор с массовой долей 0,1 % (ростовая среда): готовят в соответствии с указаниями изготовителя.

Пенициллин.

Стрептомицин.

Гепарин.

Раствор фосфатный буферный pH 7,2—7,4; готовят по п. 2.2.1.

Ацетон по ГОСТ 2603.

ФИТЦ-иммуноглобулины АЧС.

Вода дистиллированная.

3.2. Подготовка к анализу

3.2.1. Приготовление культуры лейкоцитов крови

Культуру лейкоцитов готовят из крови здоровых поросят крупной белой породы живой массой 25—30 кг. Кровь берут в количестве 10—15 $см^3$ из краниальной полой вены в стерильный цилиндр вместимостью 50—100 $см^3$, содержащий гепарин 10—20 ЕД/$см^3$, выдерживают 40—60 мин при температуре 37 °С и отделяют верхний слой, состоящий из плазмы и лейкоцитов. Плазму с лейкоцитами тщательно перемешивают и определяют концентрацию клеток.

Подсчет клеток проводят в камере Горяева. Для этого к пробе клеточной суспензии добавляют равный объем раствора трепанового синего с массовой долей 0,5 %. Количество клеток определяют по всему полю камеры, имеющей 25 больших и 100 малых квадратов. Число клеток умножают на 2200. Полученный результат соответствует количеству клеток в 1 $см^3$ суспензии.

Для посева используют суспензию, содержащую 4—6 млн лейкоцитов в 1 $см^3$. Для получения средней посевной концентрации 5 млн/$см^3$ к плазме с лейкоцитами добавляют необходимое количество питательной среды pH 7,2—7,4 следующего состава: 0,1 % гидролизата лактальбумина на растворе Эрла, пенициллин 100—200 ЕД/$см^3$, стрептомицин 100—200 мг/$см^3$, гепарин 10—20 ЕД/$см^3$.

Приготовленную суспензию клеток разливают по 9—10 $см^3$ в чашки Карреля или по 2—3 $см^3$ в пробирки с пластинками из покровных стекол, помещают в термостат при температуре 37 °С и выдерживают в течение 2—3 сут.

Для исследования используют культуру клеток с плотностью не менее 400—500 клеток в поле зрения микроскопа (увеличение 10×10) с отчетливой ростовой активностью. Клетки должны быть прозрачными, без зернистости, различной величины, без признаков дегенерации.

3.2.2. Приготовление культуры клеток костного мозга

Поросят обескровливают через сонную артерию или сердце с помощью полого ножа. Кровь собирают в стерильный сосуд и выдерживают при температуре 37 °С в течение 1—3 ч. Затем сыворотку отсасывают в стерильный флакон и осветляют центрифугированием при 2000—2500 $^{-1}$ в течение 30 мин. Сыворотку инактивируют при 56 °С в течение 30 мин.

После обескровливания у поросят удаляют кожный покров вместе с мышечной тканью в области бедренной кости, предварительно продезинфицировав этот участок йодированным спиртом, и отделенную бедренную кость разрезают на расстоянии 2 см от суставов. Извлекают костный мозг, помещают в колбу с магнитом, содержащую 0,1 % гидролизата лактальбумина на растворе Эрла. Содержимое колбы перемешивают на магнитной мешалке в течение 15 мин и центрифугируют при 2000—2500 мин$^{-1}$ в течение 10 мин. Осадок ресуспензируют ростовой средой и определяют количество клеток, как указано в п. 3.2.1. Суспензию клеток разбавляют ростовой средой до концентрации 4—6 млн/см^3 и разливают в чашки Карреля и в пробирки с пластинками из покровных стекол. К питательной среде, приготовленной по п. 3.2.1, добавляют сыворотку свиньи до концентрации 10 %.

3.2.3. Приготовление суспензии органов

Пробы селезенки, легкого, лимфатических узлов (подчелюстного, мезентериального) в стерильных условиях очищают от соединительной и жировой тканей, делают навески массой 2—3 г, тщательно растирают каждую в отдельности в ступке со стерильным стеклянным песком и добавляют стерильный фосфатный буферный раствор до соотношения 1:10. Приготовленные суспензии подвергают 1—2-кратному замораживанию и оттаиванию и центрифугируют при 3000 мин$^{-1}$ в течение 15—20 мин. Надосадочную жидкость отсасывают, добавляют пенициллин 500 ЕД/см^3, стрептомицин 500 мг/см^3, выдерживают 1 ч при температуре 37 °С и используют для инокуляции культуры клеток лейкоцитов или костного мозга.

Оставшийся после приготовления суспензий материал обезвреживают в растворе монохлорамина Б с массовой долей 5 % с последующей утилизацией после термической обработки.

3.3. Проведение анализа

Культуру лейкоцитов или костного мозга, выращенных в чашках Карреля и в пробирках, инокулируют приготовленными суспензиями органов без удаления питательной среды. На каждую пробу берут по четыре чашки Карреля и 8—10 пробирок. В первые две чашки вносят по 1,0 см^3, в две другие чашки и в пробирки — по 0,1 см^3 суспензии и инкубируют при температуре 37 °С в течение 5—7 сут.

Культуру клеток просматривают на наличие реакции гемадсорбции при малом увеличении микроскопа (10 × 10). Первый просмотр проводят через 15—18 ч после инокуляции. Перед просмотром чашки слегка встряхивают.

При отсутствии реакции гемадсорбции в течение 5—7 сут проводят два пассажа на аналогичной культуре клеток. Параллельно культуру клеток, инокулированную в пробирках, обрабатывают методом прямой иммунофлуоресценции. Для этого пластинки извлекают из пробирок, высушивают, помещают в ацетон на 10 мин и обрабатывают ФИТЦ-иммуноглобулином АЧС, как указано в п. 2.3.

3.4. Оценка результатов

При наличии в исследуемом материале вируса АЧС наблюдают реакцию гемадсорбции, проявляющуюся в виде «розетки» эритроцитов на поверхности отдельных клеток. При легком встряхивании эритроциты остаются на клетках.

Результат выделения вируса АЧС считается положительным при наличии реакции гемадсорбции в инокулированной культуре клеток и при положительной реакции методом прямой иммунофлуоресценции.

Результат выделения вируса АЧС считается отрицательным при отсутствии реакции гемадсорбции в инокулированной культуре клеток в течение трех пассажей и отрицательной реакции методом прямой иммунофлуоресценции.

4. МЕТОД ПОСТАНОВКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЫ

Сущность метода заключается в воспроизведении заболевания африканской чумой при введении восприимчивым и иммунным к вирусу классической чумы свиньям суспензии органов и крови, взятых от вынужденно убитых больных и павших свиней.

4.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Термостат, обеспечивающий температуру нагрева 37 °С.

Центрифуга лабораторная любого типа, обеспечивающая частоту вращения 5000 мин$^{-1}$.

Автоклав.

Термометры ветеринарные.

Пипетки градуированные вместимостью 5 и 10 см^3 по ГОСТ 29227.

Ступка фарфоровая с пестиком.

Поросята живой массой 25—30 кг, непривитые против КЧС, 6 гол.

Раствор фосфатный буферный pH 7,2—7,4 стерильный; готовят по п. 2.2.1.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300.

Пенициллин.

Стрептомицин.

Вирус классической чумы свиней (КЧС), эпизоотический вирулентный с активностью $10^{6,0}$ $ЛД_{50}$/см^3.

Вирусвакцина культуральная из штамма «К» ЛК-ВНИИВВиМ или ВГНКИ с активностью $10^{5,0}$ $ИмД_{50}$/см^3.

4.2. Подготовка к анализу

4.2.1. Приготовление суспензии органов — по п. 3.2.3.

4.2.2. Подготовка животных

Четырем поросятам вводят культуральную вирусвакцину из штамма «К» ЛК-ВНИИВВиМ или ВГНКИ в разведении 1:100 внутримышечно. У вакцинированных и невакцинированных поросят ежедневно измеряют температуру. Через 15—20 сут после вакцинации при отсутствии клинических признаков болезни поросят используют для постановки биопробы.

4.3. Проведение анализа

Двум вакцинированным и двум невакцинированным поросятам, содержащимся в одном боксе, вводят внутримышечно (в области внутренней поверхности бедра) по 2 см^3 смеси суспензий органов вынужденно убитых больных и павших свиней. Двум вакцинированным поросятам, содержащимся в другом боксе, вводят эпизоотический вирулентный вирус КЧС в дозе $10^{4,0}$ $ЛД_{50}$/см^3. За животными ведут наблюдение в течение 15 сут с ежедневным измерением температуры тела. В конце контрольного периода животных забивают и сравнивают результаты патолого-анатомических и гистологических исследований павших и убитых животных с клиническими признаками АЧС. Параллельно пробы органов исследуют методами прямой иммунофлуоресценции, выделения и идентификации вируса.

4.4. Оценка результатов

Биопробу считают положительной, если у свиней, инокулированных суспензией органов больных африканской чумой свиней, установлены признаки болезни или наблюдается гибель.

При обнаружении клинических признаков болезни или гибели только невакцинированных свиней, проводят исследование на подтверждение классической чумы свиней методом прямой иммунофлуоресценции с применением ФИТЦ-иммуноглобулинов КЧС.

5. МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСА АЧС В РЕАКЦИИ АУТОГЕМАДСОРБЦИИ

Сущность метода заключается в выявлении гемадсорбирующих клеток, сформированных в организме больного АЧС животного.

5.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Термостат.

Микроскоп световой инвертированный или обычный.

Шприцы вместимостью 10—20 см^3 по МРТУ 46—23.

Иглы инъекционные типа «Рекорд» 1А1 16-20-115 или 15150.

Стекла предметные по ГОСТ 9284.

Стекла покровные по ГОСТ 6672.

Пипетки мерные по ГОСТ 29227.

Флаконы пенициллиновые.

Панели пластиковые 96-луночные по ТУ 92-2-428.

Раствор фосфатный буферный pH 7,2—7,4; готовят по п. 2.2.1.

Гепарин.

Пенициллин.

Стрептомицин.

5.2. Подготовка к анализу

Из краниальной полой, ушной или хвостовой вены свиней берут 10—15 $см^3$ крови в пробирки, содержащие гепарин в количестве 10—20 ЕД/$см^3$.

5.3. Проведение анализа

Пробирки с отобранными пробами крови помещают в вертикальном положении в термостат при температуре 37 °С. Пипеткой отбирают верхний слой плазмы, содержащей лейкоциты с эритроцитами. Отобранную плазму крови вносят по 50—100 $мм^3$ в 2—4 лунки панели, по 1—3 $см^3$ в 2—4 пробирки и готовят двукратные разведения суспензии клеток с 1:2 до 1:128. Для разведения используют стерильный физиологический раствор, содержащий пенициллин 100—200 ЕД/$см^3$, стрептомицин 100—200 мг/$см^3$ и гепарин 10—15 ЕД/$см^3$.

Панели с приготовленными разведениями лейкоцитарной фракции крови просматривают под инвертированным, пробирки — под обычным микроскопом.

5.4. Оценка результатов

При положительной реакции обнаруживают гемадсорбцию, проявляющуюся в виде «розетки» эритроцитов на поверхности отдельных клеток. При отсутствии «розеток» плазму с клетками рассматривают как культуру лейкоцитов. Для этого панели с культурой клеток продолжают инкубировать при температуре 37 °С и результаты оценивают по п. 3.4.

При отсутствии реакции гемадсорбции препараты высушивают, обрабатывают ацетоном и ставят реакцию прямой иммунофлуоресценции.

6. МЕТОД НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Сущность метода заключается в соединении иммуноглобулинов АЧС исследуемой сыворотки свиней с вирусоспецифическим антигеном тест-препаратов АЧС и обнаружении комплекса «антиген-антитело» обработкой антисвиными ФИТЦ-иммуноглобулинами и люминесцентной микроскопией.

6.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Микроскоп люминесцентный.

Термостат.

Центрифуга лабораторная любого типа, обеспечивающая частоту вращения 5000 $мин^{-1}$.

Холодильник бытовой.

Стекла предметные по ГОСТ 9284.

Стекла покровные по ГОСТ 6672.

Раствор фосфатный буферный pH 7,2—7,4; готовят по п. 2.2.1.

Раствор глицерина буферный; готовят по п. 2.2.2.

Парафин по ГОСТ 23683.

Тест-препараты специфические АЧС и отрицательные; готовят следующим образом: специфические АЧС тест-препараты готовят заражением перевиваемой культуры клеток почки поросенка (РК-15), выращенной на покровных стеклах в пробирках, вирусом АЧС, высушиванием и обработкой ацетоном. Отрицательные тест-препараты готовят аналогично, но не заражая вирусом АЧС. Хранят в герметической емкости при температуре минус 20 °С.

ФИТЦ-иммуноглобулины антисвиные, представляющие собой иммуноглобулины кролика или осла, иммунизированных иммуноглобулинами сыворотки свиньи, и меченные ФИТЦ.

Сыворотки свиньи отрицательные и положительные к вирусу АЧС.

6.2. Подготовка к анализу

6.2.1. Пробы крови — по п. 5.2.

6.2.2. Суспензии органов — по п. 3.2.3.

6.3. Проведение анализа

Капли положительных и отрицательных к вирусу АЧС сывороток и суспензий органов, разведенные в фосфатном буферном растворе 1:20, наносят на предметные стекла и добавляют специфические АЧС и отрицательные тест-препараты. Предметные стекла помещают в термостат и выдерживают 30 мин при температуре 37 °С. Затем тест-препараты промывают в фосфатном буферном растворе в течение 10 мин дважды со сменой раствора, ополаскивают дистиллированной водой и подсушивают при комнатной температуре. Далее тест-препараты обрабатывают антисвиными ФИТЦ-иммуноглобулинами, как указано в п. 2.3, и просматривают под люминесцентным микроскопом.

6.4. Оценка результатов

При положительной реакции в клетках специфических тест-препаратов АЧС, обработанных исследуемыми сыворотками и суспензиями органов, обнаруживают специфический антиген вируса АЧС.

При отрицательной реакции в указанных тест-препаратах обнаруживают тусклое свечение клеток серо-зеленого цвета.

7. МЕТОД ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Сущность метода заключается во взаимодействии специфического антигена АЧС, фиксированного на твердой фазе с сыворотками АЧС и пероксидазным антисвиным конъюгатом, и регистрации комплекса по остаточной ферментативной активности с помощью субстрата.

7.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Термостат.

Холодильник бытовой.

Спектрофотометр.

Панели пластиковые 96-луночные по ТУ 92-2-428.

Микропипетка многоканальная регулируемая вместимостью 50—200 мм^3.

Микропипетка одноканальная регулируемая вместимостью 50—200 мм^3.

Натрия карбонат по ГОСТ 83.

Перекись водорода по ГОСТ 10929, раствор с массовой долей 3 %; готовят следующим образом: к 10 см^3 дистиллированной воды добавляют 1 см^3 раствора перекиси водорода с массовой долей 33 %.

Натрия бикарбонат по ГОСТ 4201.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный, 12-водный по ГОСТ 4172, раствор концентрации $c(Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O) = 0{,}2$ моль/дм^3, готовят следующим образом: 2,84 г двузамещенного форсфорнокислого натрия 12-водного растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Натрий азид.

Калий хлористый по ГОСТ 4234.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198.

Кислота лимонная по ГОСТ 3652, раствор концентрации 0,1 моль/дм^3; готовят следующим образом: 1,92 г лимонной кислоты растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды.

Кислота серная по ГОСТ 4204, раствор концентрации с $c(^1/_2H_2SO_4) = 2{,}5$ моль/дм^3.

Твин-20.

Раствор буферный карбонатно-бикарбонатный pH 9,5 для сенсибилизации пластин концентрации 0,05 моль/дм^3; готовят следующим образом: 0,795 г карбоната натрия, 0,100 г азида натрия и 1,465 г бикарбоната натрия растворяют в 500 см^3 бидистиллированной воды.

Раствор фосфатно-буферный (отмывочный); готовят следующим образом: 16,0 г хлористого натрия, 0,400 г однозамещенного фосфорнокислого калия, 5,8 г двузамещенного фосфорнокислого 12-водного натрия, 0,2 г хлористого калия и 1,6 см^3 твин-20 растворяют в 2 дм^3 бидистиллированной воды.

Раствор ортофенилендиамина (субстрат); готовят следующим образом: 40 мг ортофенилендиамина растворяют в 100 см^3 буферного фосфатно-цитратного раствора pH 4,9. Перед использованием к раствору добавляют 1,4 см^3 раствора перекиси водорода с массовой долей 3 %.

Альбумин яичный лиофилизированный по ТУ 6-09-4477, раствор с массовой долей 1 %; готовят следующим образом: 1 г яичного альбумина растворяют в 100 см^3 фосфатно-буферного раствора.

Альбумин бычий сывороточный лиофилизированный по ТУ 09-10-342.

Конъюгат иммунопероксидазный антисвиной.

Антиген специфический АЧС.

Антиген отрицательный.

Сыворотка специфическая АЧС.

Сыворотка отрицательная свиная.

Вода дистиллированная.

Вода бидистиллированная.

7.2. Подготовка к анализу

Специфический АЧС и отрицательный антигены разводят в буферном карбонатно-бикарбо-

натном растворе концентрации 0,05 моль/дм^3 в соответствии с дозой, указанной на препарате, и вносят в лунки панелей по 200 мм^3 в лунку. Панели выдерживают 18—20 ч при температуре 18 °С—20 °С (сенсибилизация). После сенсибилизации панели промывают фосфатно-буферным раствором трижды, удаляют отмывочный раствор, в лунки вносят по 200 мм^3 раствора яичного альбумина с массовой долей 1 % и выдерживают 15 мин при температуре 18 °С—20 °С. Панели промывают фосфатно-буферным раствором трижды и используют для постановки реакции.

7.3. Проведение анализа

В лунки панелей со специфическими АЧС и отрицательными антигенами вносят по 200 мм^3 исследуемых сывороток больных и подозреваемых в заболевании свиней, взятых в пятикратном разведении. Разведения сывороток готовят на фосфатно-буферном растворе.

После 2 ч инкубации при температуре 37 °С панели промывают и в лунки вносят по 200 мм^3 пероксидазного антисвиного конъюгата, разведенного на фосфатно-буферном растворе с яичным альбумином с массовой долей 1 %, в рабочем разведении, указанном на ампуле препарата. В лунку 1А конъюгат не вносят (контрольная лунка). После 1 ч инкубации конъюгат удаляют: панели промывают, как указано в п. 7.2, и в каждую лунку вносят по 200 мм^3 раствора субстрата. Когда раствор субстрата в лунках начинает окрашиваться (примерно через 20 мин), его фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 495 нм. Для визуальной оценки реакцию останавливают при помощи раствора серной кислоты концентрации $c(^1/_2H_2SO_4) = 0{,}2$ моль/дм^3, внося в каждую лунку по 250 мм^3.

7.4. Оценка результатов

При визуальной оценке результаты реакции учитывают по интенсивности окрашивания субстрата. В лунках со специфической сывороткой и специфическим антигеном должно быть интенсивное желтое или желто-коричневой окрашивание субстрата.

В лунках со специфической сывороткой и нормальным антигеном, отрицательной сыворотки со специфическим и отрицательным антигенами окрашивания не должно быть.

При оценке результатов на спектрофотометре реакция считается положительной, если отношение положительных и отрицательных контролей составляет 2,1 и более раза. Исследуемые сыворотки считаются положительными с разведениями 1:125 и выше. Сыворотки, показывающие положительную реакцию в разведениях 1:5 и 1:25, считаются сомнительными.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Всесоюзным научно-исследовательским институтом ветеринарной вирусологии и микробиологии**

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по управлению качеством продукции и стандартам от 12.06.90 № 1511**

3. **В стандарт введен СТ СЭВ 6539—88**

4. **ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

5. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 83—79	7.1
ГОСТ 1770—74	3.1
ГОСТ 2603—79	2.1; 3.1
ГОСТ 3652—69	7.1
ГОСТ 4172—76	7.1
ГОСТ 4198—75	2.1; 7.1
ГОСТ 4201—79	7.1
ГОСТ 4204—77	7.1
ГОСТ 4233—77	2.1; 7.1
ГОСТ 4234—77	7.1
ГОСТ 6672—75	2.1; 3.1; 5.1; 6.1
ГОСТ 6824—96	2.1
ГОСТ 9284—75	2.1; 3.1; 5.1; 6.1
ГОСТ 10929—76	7.1
ГОСТ 11773—76	2.1
ГОСТ 14193—78	3.1
ГОСТ 18300—87	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 22300—76	2.1
ГОСТ 23683—89	2.1; 6.1
ГОСТ 25336—82	2.1; 3.1
ГОСТ 29227—91	3.1; 4.1; 5.1
ТУ 6-09-4477—77	7.1
ТУ 09-10-342—75	7.1
ТУ 92-2-428—83	5.1; 7.1
МРТУ 46-23—61	2.1; 5.1

6. **Ограничение срока действия снято по протоколу № 5—94 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 11-12—94)**

7. **ПЕРЕИЗДАНИЕ. Июнь 2005 г.**

Редактор *О.В. Гелемеева*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 30.06.2005. Подписано в печать 25.07.2005. Формат 60×84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,03. Тираж 50 экз. Зак. 474. С 1554.

ФГУП «Стандартинформ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «Стандартинформ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «Стандартинформ» — тип. "Московский печатник", 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru