ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

ГОСТ 25754—83 (СТ СЭВ 3453—81)

Издание официальное

Цена 3 коп.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

РАЗРАБОТАН Министерством сельского хозяйства СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

Э. В. Ивановский, Н. К. Мищенко, Н. Д. Насокина

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. № 2017

УДК 636:576.8.07:006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

Методы лабораторной диагностики классической чумы свиней

Agricultural animals. Methods of laboratory diagnostics of classical pig-plague

ГОСТ 25754—83

(СТ СЭВ 3453—81)

ОКСТУ 9809

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 22 апреля 1983 г. № 2017 срок действия установлен

с 01.07.84
до 01.07.89

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт устанавливает методы лабораторной диагностики классической чумы свиней.

Стандарт применяют при диагностике заболеваний животных в лабораториях ветеринарных научно-исследовательских учреждений.

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 3453—81.

1. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Сущность метода заключается в обнаружении специфических патолого-гистологических изменений нервных тканей в специально подготовленных срезах.

1.1. Метод отбора проб

1.1.1. Для проведения исследования от павших или убитых свиней берут полушария большого мозга с частями коры, мозжечок, аммоновые рога, спинной мозг в различных участках ствола.

1.2. Аппаратура, материалы и реактивы

1.2.1. Для проведения исследования применяют:

термостат с температурой нагрева 58 °С;

микротом для приготовления срезов в парафине;

гистокриотом;

микроскоп биологический по ГОСТ 8284—78;

пластинку нагревающую на 40 °С;

Издание официальное Перепечатка воспрещена

© Издательство стандартов, 1983

парафин с точкой плавления от 56 до 58 °С по ГОСТ 23683—79;
воск пчелиный по ГОСТ 21179—75;
формалин по ГОСТ 1625—75;
кальций хлористый по ГОСТ 4460—77;
кадмий хлористый по ГОСТ 4330—76;
спирт этиловый абсолютный;
спирт этиловый 96 %-ный по ГОСТ 5962—67;
бензол по ГОСТ 5955—75 или ксилол, или толуол по ГОСТ 5789—78;
гематоксилин кристаллический;
эозин;
кислоту фосформолибденовую;
бальзам канадский;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

1.3. Подготовка к исследованию

1.3.1. Отобранные пробы фиксируют по Бейкеру. Для этого готовят раствор следующего состава:
хлористый кальций — 1 г;
хлористый кадмий — 1 г;
10 %-ный формальдегид или формалин — 10 см^3;
дистиллированная вода — 100 см^3.

1.3.2. Фиксированные пробы обрабатывают путем подготовки срезов, включенных в парафин (см. обязательное приложение 1) или путем подготовки срезов при помощи гистокриотома.

1.3.3. Для окрашивания гистологических препаратов используют метод окрашивания гематоксилином (см. обязательное приложение 2).

1.4. Проведение исследования

1.4.1. Подготовленные и окрашенные срезы просматривают под микроскопом.

1.5. Обработка результатов

1.5.1. Гистологические изменения, выражающиеся в наличии воспаления, диапедизиальных кровоизлияний, васкулярного эндотелита, мукоидного фирбиозного и гиалинового перерождения стенок сосудов, а также лимфогистиоцитарного энцефаломиэлита в первичной ткани, характерны при заболевании чумой.

2. МЕТОД ПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

Сущность метода заключается в соединении меченых антител (коньюгат) со специфическим антигеном и образовании комплекса «антитело-антиген», наблюдаемого в поле зрения люминисцентного микроскопа.

2.1. Метод отбора проб

2.1.1. Для проведения исследования берут миндалины, селезенку, почки, легкие, лимфатические узлы (мезентериальные и подчелюстные), красный костный мозг и кровь.

Пробы органов и тканей берут от павших животных не позднее 8 ч после гибели, от больных и подозреваемых в заболевании животных — сразу после убоя. Кровь берут от больных и подозреваевых в заболевании животных.

2.2. Аппаратура и реактивы

2.2.1. Для проведения исследования применяют:

микроскоп люминисцентный;

криотом;

термостат;

центрифугу с частотой вращения 5000 об/мин;

шприцы;

рефрижератор на минус 20 °С;

нож термоэлектрический;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

стекла покровные по ГОСТ 6672—75;

ацетон по ГОСТ 2603—79;

глицерин по ГОСТ 6824—76;

раствор фосфатный буферный с pH 7,2; готовят следующим образом:

раствор А — в 1 $дм^3$ дистиллированной воды разводят 11,871 г двузамещенного фосфата натрия;

раствор Б — в 1 $дм^3$ дистиллированной воды растворяют 9,076 г однозамещенного фосфата калия. Смешивают 800 $см^3$ раствора А и 250 $см^3$ раствора Б;

раствор фосфатный буферный с pH 8,0; готовят следующим образом:

смешивают приготовленные растворы А — 930 $см^3$ и Б — 70 $см^3$. При приготовлении буферных растворов в каждом случае pH растворов проверяют потенциометром;

коньюгат флюоресцентный специфический;

коньюгат флюоресцентный нормальный;

краситель Эванса, 0,25 %-ный раствор в буферном растворе.

2.3. Подготовка к исследованию

2.3.1. Из проб органов при помощи криотома, микротома или термоэлектрического ножа (при сильном замораживании) готовят срезы толщиной 5 мк, которые помещают на обезжиренные предметные стекла и высушивают в течение 30 мин при 4 °С.

Из проб костного мозга и лейкоцитарного концентрата готовят мазки (см. обязательное приложение 3).

2.3.2. Препараты (срезы и мазки) фиксируют ацетоном в течение 10 мин при минус 20 °С или в течение 5—10 мин при комнат-

ной температуре. После фиксации препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре до полного испарения ацетона.

Фиксированные препараты допускается хранить в морозильнике при температуре не менее минус 20 °С в течение 6 мес.

2.3.3. Фиксированные препараты двукратно промывают фосфатным буферным раствором (pH 7,2), после чего оставляют их в растворе на 10 мин.

Увлажненные препараты допускается хранить до использования во влажной камере при 4 °С в течение 3 дней.

2.3.4. Подготовленные препараты окрашивают методом контрастной иммунофлюоресценции.

Для этого приготовляют на фосфатном буферном растворе (pH 7,2) рабочие разведения специфического и нормального флюоресцентного коньюгата в соответствии с указаниями, нанесенными на этикетках препаратов. К полученным разведениям коньюгатов добавляют краситель Эванса в соотношении: 3 части коньюгата и 1 часть красителя.

Окрашивают следующие препараты:

три препарата, приготовленных из исследуемых проб; из них два препарата покрывают специфическим коньюгатом с красителем Эванса, а третий — нормальным коньюгатом с красителем Эванса (контроль);

два препарата, приготовленных из органов свиней, не инфицированных вирусом чумы, покрывают специфическим коньюгатом с красителем Эванса (контроль).

Окрашенные препараты выдерживают в термостате в течение 30 мин при 37 °С или в течение 12—18 ч при комнатной температуре.

Препараты двукратно промывают в фосфатном буферном растворе, после чего оставляют на 10 мин в свежей дистиллированной воде.

После частичного высушивания на воздухе препараты покрывают буферным глицерином (9 частей нефлюоресцирующего глицерина и 1 часть фосфатного буферного раствора с pH 8,0) и закрывают покровными стеклами.

При необходимости покровные стекла фиксируют парафином. Окрашенные препараты хранят при 4 °С в течение 3—4 недель без потери специфической флюоресценции.

2.4. Проведение исследования

2.4.1. Препараты просматривают под люминисцентным микроскопом.

2.5. Обработка результатов

2.5.1. Специфическая флюоресценция характеризуется желтовато-зеленоватым и зеленоватым оттенками свечения цитоплазмы разных клеток (в зависимости от оптики и системы освещения).

Ядра клеток выглядят темными и не флюоресцируют. Фон препаратов имеет флюоресценцию красно-оранжевого цвета.

В срезах из селезенки и лимфатических узлов флюоресцирующие клетки рассеяны или сконцентрированы вокруг сосудов и синуса.

В препаратах из миндалин флюоресценция более ясная и выявляется в базальных клетках поверхностного эпителия и эпителия крипт.

В срезах почек специфическая флюоресценция устанавливается главным образом в различных клетках почечных и интерасциальных поперечных срезов канальцев.

В мазках из красного костного мозга специфическая флюоресценция отличается большей яркостью, размером и количеством флюоресцирующих клеток.

Аналогичная флюоресценция выявляется в мазках из лейкоцитарного концентрата.

Специфическая флюоресценция в цитоплазме даже в отдельных клетках препаратов, полученных от животных, подозреваемых в заболевании, указывает на наличие вируса классической чумы свиней.

Все контрольные срезы и мазки не должны иметь желтовато-зеленоватой флюоресценции цитоплазмы.

3. МЕТОД ПОСТАНОВКИ БИОПРОБЫ

Сущность метода заключается в выявлении наличия вируса чумы свиней путем введения восприимчивому животному (свинье) суспензии, полученной из органов, взятых от больных или подозреваемых в заболевании животных.

3.1. Метод отбора проб

3.1.1. Для постановки биопробы от больных, павших или убитых животных берут кровь, селезенку, лимфатические узлы, трубчатую длинную кость.

Кровь от животных для проведения биопробы берут с соблюдением правил асептики.

Если органы начали портиться, то проводят сечение трубчатой длинной кости и извлекают мозг, который используют для проведения исследования.

3.2. Аппаратура, материалы и реактивы

3.2.1. Для проведения исследования применяют:

центрифугу с частотой вращения 5000 об/мин;

ножницы;

скальпель;

ступку или измельчитель ткани;

шприц;

термометры ветеринарные;

антибиотики (пенициллин, стрептомицин или другие антибиотики с широким спектром действия);

мертиолат натрия (тиомерсал).

3.3. Подготовка к исследованию

3.3.1. Кусочки селезенки и лимфатические узлы измельчают при помощи ножниц. Измельченные пробы селезенки и лимфатических узлов или костного мозга растирают в ступке с малым количеством физиологического раствора, добавляют физиологический раствор до получения 10 %-ной суспензии. К полученной суспензии добавляют пенициллин и стрептомицин по 300—1000 ЕД/см^3, тиомерсал в конечной концентрации 1 : 5000 — 1 : 10000 и выдерживают не менее 4 ч при 4 °С.

суспензию центрифугируют в течение 10 мин с частотой вращения 4000—5000 об/мин.

Надосадочную жидкость используют для проведения биопробы. Перед использованием из надосадочной жидкости делают посевы на питательные среды.

3.4. Проведение исследования

3.4.1. Берут пять поросят в возрасте 2—3 мес, массой 20—30 кг, восприимчивых к чуме свиней. Трем животным вводят подкожно по 1 см^3 крови или по 2 см^3 суспензии органов. Двух поросят, не инокулированных исследуемым материалом, содержат отдельно для контроля.

Двум поросятам, иммунным к чуме свиней, вводят исследуемый материал в тех же дозах с целью дифференциальной диагностики в отношении африканской чумы свиней.

За подопытными животными ведут клиническое наблюдение в течение 21 сут с ежедневным измерением температуры тела.

3.5. Обработка результатов

3.5.1. Диагноз на классическую чуму свиней считают положительным:

если два из трех неиммунных поросят, которым был введен исследуемый материал, заболевают, проявляя клинические признаки болезни, и погибают;

если два иммунных поросенка, которым введен исследуемый материал, в период наблюдения остаются здоровыми или проявляют незначительные и кратковременные (1—4 дня) клинические признаки болезни слабой интенсивности (повышение температуры тела не выше 41 °С).

3.5.2. Заболевание иммунных животных указывает на то, что исследуемый материал содержит возбудителя другой инфекции.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
Обязательное

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БЛОКОВ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ПАРАФИН

Фиксированные и обработанные пробы выдерживают в 96%-ном этиловом спирте (три ванны), абсолютном спирте (три ванны) и амиловом спирте (три ванны). В каждой ванне кусочки выдерживают в течение 2 ч. Затем пробы выдерживают в трех парафино-восковых банях при 58°С по 2 ч в каждой.

Пробы вынимают из последней бани и включают в парафин в виде блоков специальной формы.

Сечение микротомом делают в виде ленты толщиной 5—7 мк.

При помощи игл фиксируют срезы в центре предметного стекла, предварительно смазанного слоем альбумина по Мейеру на нагревающей пластинке при 40°С. Альбумин по Мейеру готовят следующим образом: смешивают яичный белок и глицерин в соотношении 1 : 1.

Предметные стекла со срезами выдерживают в термостате при 37°С в течение 6—12 ч, после чего удаляют парафин, выдерживая в трех ваннах с растворителем в течение 10 мин в каждой.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2
Обязательное

ОКРАШИВАНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ

Стекла со срезами проводят через следующие ванны:
три ванны с 96%-ным этиловым спиртом — 5 мин;
две ванны с дистиллированной водой — 1—2 мин;
одна ванна с гематоксилином — 5—10 мин;
две ванны с водопроводной водой — 1—2 мин;
одна ванна с эцином — 3—5 мин;
две ванны с дистиллированной водой — 1—2 мин;
одна ванна с 1%-ной формолмолибденовой кислотой — 3—5 мин;
одна-две ванны с дистиллированной водой для промывания;
две ванны с 96%-ным этиловым спиртом (дифференциация);
две ванны с растворителем (прояснение — 10—30 мин).

Стекло со срезами накрывают покровным стеклом, которое фиксируют канадским бальзамом.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
Обязательное

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ

1. Приготовление мазков из красного костного мозга

Берут грудную кость, делают продольный разрез и вынимают красный костный мозг, из которого делают несколько мазков.

2. Приготовление мазков лейкоцитарного концентрата

От больных или подозреваемых в заболевании свиней собирают 15 см^3 крови в пробирку, содержащую антикоагулят. Кровь в пробирке энергично встряхивают для отделения плазмы и выдерживают пробирку в течение 1 ч при комнатной температуре.

Пастеровской пипеткой отбирают плазму с лейкоцитами и переносят в центрифужную пробирку. Плазму центрифугируют в течение 10 мин с частотой вращения 1000 об/мин, сливают надосадочную жидкость, а из осадка беломолочного цвета делают 2—3 мазка.

Редактор *Н Е. Шестакова*
Технический редактор *О Н. Никитина*
Корректор *В. И. Варенцова*

Сдано в наб 13 05 83 Подп к печ 15 06 83 0,625 п л 0,51 уч-изд л Тир 6000 Цена 3 коп.

Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, Новопресненский пер, 3
Тип «Московский печатник» Москва, Лялин пер, 6 Зак. 545

gost.e-ecolog.ru