ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОНТАГИОЗНОГО ПУСТУЛЕЗНОГО ДЕРМАТИТА

ГОСТ 25723—83
(СТ СЭВ 3455—81)

Издание официальное

Цена 3 коп.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

РАЗРАБОТАН Министерством сельского хозяйства СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

В. В. Гуненков, Е. И. Скалинский, Б. Г. Степанян, 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 14 апреля 1983 г. № 1840

УДК 636:576.8.07:006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

Методы лабораторной диагностики контагиозного пустулезного дерматита

Agricultural animals. Methods of laboratory diagnostics for contagions pustulosious dermatitis

ГОСТ 25723—83

(СТ СЭВ 3455—81)

ОКСТУ 9809

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 14 апреля 1983 г. № 1840 срок действия установлен

с 01.07.84

до 01.07.89

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на овец и коз и устанавливает методы лабораторной диагностики контагиозного пустулезного дерматита, вызванного вирусом из группы оспы (семейства Poxviridae), который по структуре вирионов, антигенным и иммуногенным свойствам отличается от вирусов оспы овец и коз.

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

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 3455—81.

1. МЕТОД ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Сущность метода заключается в идентификации вируса контагиозного пустулезного дерматита овец и коз в электронном микроскопе по ультраструктуре вирионов, выявляемой при негативном контрастировании диагностических препаратов.

1.1. Метод отбора проб

1.1.1. Для электронномикроскопических исследований берут в стерильные пробирки от 3—4 больных овец или коз корочки с оспоподобных поражений уголков губ, вымени, паха.

Издание официальное *Перепечатка воспрещена*

© Издательство стандартов, 1983

У убитых на 6—9-й день болезни животных срезают острым лезвием участки кожи размером 2×2 см со свежими оспоподобными поражениями и консервируют в 50%-ном растворе стерильного глицерина.

Взятый материал отправляют в лабораторию электронной микроскопии, вирусологии, патологической анатомии.

1.2. Аппаратура, материалы и реактивы

1.2.1. Для проведения исследования применяют:

микроскоп электронный с разрешающей способностью (5±1) Å;

устройство напыляющее;

сеточки электронно-микроскопические, покрытые нитроцеллюлозной пленкой, укрепленной углеродом;

пинцет глазной с заостренными концами;

пенал для сеточек

скальпели и ножи медицинские по ГОСТ 21240—77;

ножницы изогнутые;

пинцеты медицинские по ГОСТ 21241—77;

пробирки бактериологические стеклянные вместимостью 20 см³ по ГОСТ 10515—75;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72;

натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77;

кислоту фосфорно-вольфрамовую по ГОСТ 18290—72, 2%-ный раствор, нейтрализованный раствором гидроокиси натрия до pH 7,2;

глицерин по ГОСТ 6259—75, 50%-ный стерильный раствор.

1.3. Подготовка к исследованию

1.3.1. Кусочки корочек и участков пораженной кожи помещают на предметное стекло в 2—3 капли дистиллированной воды и размельчают в течение 3—20 мин острым, затем тупым концом глазного скальпеля. На поверхность мениска опалесцирующей суспензии накладывают пленкой на 2 мин пять сеточек, которые промывают 2—3 каплями дистиллированной воды.

1.3.2. Для негативного контрастирования на свежеприготовленные препараты наносят несколько капель 2%-ного раствора фосфорно-вольфрамового натрия, который затем осторожно отсасывают фильтровальной бумагой.

1.4. Проведение исследования

1.4.1. Подготовленные по п. 1.3 сеточки с препаратом просматривают в электронном микроскопе.

1.5. Обработка результатов

1.5.1. Диагноз на контагиозный пустулезный дерматит овец и коз считается положительным при наличии в препаратах характерных вирионов кокоповидной формы размером 150×200—

224×380 нм, белковая оболочка которых образована непрерывными, идущими наискось трубчатыми филаментами диаметром 90 Å, укладывающимися по длине вирионов 10—14 раз.

1.5.2. При отсутствии в препаратах вирионов ставят биопробу на восприимчивых животных по п. 4.3, используя оставшийся патологический материал, и проводят повторные электронно-микроскопические исследования.

2. МЕТОД ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Сущность метода заключается в обнаружении под микроскопом изменений ткани кожи и слизистых оболочек, характерных для контагиозного пустулезного дерматита.

2.1. Метод отбора проб

2.1.1. Для гистологических исследований берут корочки и пораженные участки кожи и слизистых оболочек. Пробы, фиксированные в 10%-ном растворе формалина, доставляют в лабораторию патологической анатомии.

2.2. Аппаратура, материалы и реактивы

2.2.1. Для проведения исследования применяют:

микротом санный;

микроскоп биологический;

термостат;

ванну стеклянную для окрашивания срезов;

ступку;

иглу препаровальную металлическую или стеклянную;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

стекла покровные по ГОСТ 6672—75;

чашки Петри по ГОСТ 25336—82;

спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 6259—75, абсолютный, 96%-ный и 70%-ный;

белок яичный;

эозин водорастворимый;

эозин спирторастворимый;

калий йодистый по ГОСТ 4232—74 или натрий йодистый по ГОСТ 8422—76;

квасцы калийные по ГОСТ 15028—77, х. ч.;

хлоралгидрат;

кислоту лимонную кристаллическую по ГОСТ 3652—69;

гематоксилин кристаллический;

бальзам канадский или другие заливочные смеси;

парафин по ГОСТ 23683—79, точка плавления 58 °С;

раствор гематоксилина красящий (кислый гематеин по прописи Майера); готовят следующим образом: 1 г кристаллического гематоксилина растворяют в 1 дм^3 дистиллированной воды, прибавляют 0,2 г йодистого калия или йодистого натрия, 50 г ка-

лийных квасцов, 50 г хлоралгидрата и 1 г кристаллической лимонной кислоты, раствор фильтруют;

эозин, водно-спиртовой раствор, готовят следующим образом: 1 г водорастворимого эозина растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Затем 1 г спирторастворимого эозина растворяют в 100 см³ 96%-ного этилового спирта; красящий раствор составляют, смешивая 3 части водного раствора эозина с 1 частью спиртового раствора эозина;

карбол-ксилол; готовят из расчета: одна часть химически чистой кристаллической карболовой кислоты на 4—5 частей ксилола. Карболовую кислоту предварительно расплавляют в термостате (для парафиновой заливки) при температуре 42 °С и смешивают с ксилолом в теплой посуде;

смесь спирто-эфирная (1:1);

формалин по ГОСТ 1625—75, 10%-ный раствор;

глицерин по ГОСТ 6259—75.

2.3. Подготовка к исследованию

2.3.1. Отобранные пробы пораженных тканей размером 1×1 см фиксируют в 10-кратном количестве 10%-ного раствора формалина при комнатной температуре в течение 18—20 ч.

Для сокращения времени исследования выдерживают пробы в термостате при температуре 56 °С.

2.3.2 Приготовляют на микротоме из фиксированных кусочков пробы срезы толщиной примерно 5—10 мк, которые помещают в чашки Петри с дистиллированной водой. Затем срезы из дистиллированной воды переносят препаровальной иглой в 70%-ный этиловый спирт на 2—5 мин, далее на предметные стекла, покрытые смесью глицерина и яичного белка (1:2), и высушивают. Для окраски срезов высушенные предметные стекла со срезами помещают последовательно на 3 мин в 96%-ный этиловый спирт, на 3 мин в 70%-ный спирт, на 3 мин в дистиллированную воду, на 10 мин в красящий раствор гематоксилина, на 3—5 мин в водопроводную воду, на 1 мин в дистиллированную воду, на 4 мин в красящий раствор эозина, на 1 мин в 70%-ный этиловый спирт, на 1 мин в 96%-ный спирт, на 1 мин в абсолютный спирт, осветляют карбол-ксилолом, затем ксилолом, наносят каплю канадского бальзама, разведенного ацетоном до вязкости меда, и покрывают покровным стеклом. Покровное стекло опускают осторожно, придерживая правое его ребро препаровальной иглой, так как при быстром накладывании под стекло могут попасть пузырьки воздуха.

2.4. Проведение исследования

2.4.1. Подготовленные срезы просматривают под микроскопом, определяя общую структуру исследуемых проб ткани, характер и интенсивность (выраженность) патогистологических изменений.

2.5. Обработка результатов

2.5.1. При острой форме заболевания в измененных участках кожи и эпителия отмечают ретикулярную и баллонирующую дистрофию клеток; позже в межклеточных пространствах развиваются небольшие полости. В субэпителиальной соединительной ткани обнаруживают дилатацию сосудов и лимфогистиоцитарную клеточную инфильтрацию. Иногда в этой стадии заболевания в клетках измененных участков эпителия обнаруживают цитоплазматические ацидофильные включения.

При подострых и хронических формах заболевания пораженные кожные покровы или участки слизистых оболочек слущиваются. Во внутриэпителиальных пузырьках, а позже и в субэпителиальной ткани накапливается серозно-клеточный экссудат, который на поверхности эпителия образует корочки.

В случае вторичной инфекции некротизирующими бактериями развивается картина глубоко распространенного некроза, а при попадании гноеродной микрофлоры развиваются гнойные процессы.

3. МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСА

Сущность метода заключается в выделении вируса в однослойных тканевых культурах и последующей его идентификации методом вируснейтрализации. Метод применяют при копытной и генитальной формах заболевания.

3.1. Метод отбора проб

3.1.1. Для вирусологических исследований берут корочки и пораженные участки кожи и слизистых оболочек.

Пробы помещают в стерильные пробирки (флаконы) без консервирующего раствора и доставляют в лабораторию вирусологии.

3.2. Аппаратура, материалы и реактивы

3.2.1. Для проведения исследования применяют:

термостат на 37 °С;

центрифугу рефрижераторную с частотой вращения 5000 об/мин;

цилиндры мерные вместимостью 100 и 1000 см^3 по ГОСТ 1770—74;

карандаш восковой;

антибиотики (пенициллин, стрептомицин, нистатин);

сыворотку крови крупного рогатого скота;

среду питательную для культивирования клеток: 0,5% лактальбумина на растворе Хэнкса и 10% сыворотки крови крупного рогатого скота;

среду поддерживающую: 0,5% лактальбумина на растворе Эрла с 3%-ной сывороткой крупного рогатого скота;

раствор фосфатно-буферный.

3.3. Подготовка к исследованию

3.3.1. Из взятых проб (корочек) готовят 10%-ную суспензию в фосфатно-буферном растворе, содержащем 500 ЕД пенициллина, 250 мкг стрептомицина и 50 ЕД нистатина на 1 $см^3$.

Полученную суспензию центрифугируют в течение 30 мин с частотой вращения 2000—3000 об/мин. Для проведения исследования берут надосадочную жидкость.

3.4. Проведение исследования

3.4.1. Порциями надосадочной жидкости по 0,2 $см^3$ из каждой пробы инфицируют по 4—5 пробирок с культурой клеток, полученной из почек, семенников или щитовидной железы ягнят. Адсорбция длится 60 мин при температуре 37 °С, жидкость удаляется и заменяется поддерживающей средой.

3.4.2. Проводят инкубацию культуры тканей в термостате при температуре 37 °С. В культуре ткани, в отличие от контрольных незараженных проб, вирус вызывает цитопатический эффект в период между 4 и 14 сут.

Вирус сначала размножается только в клетках тканей ягнят, но после его изоляции может размножаться и в тканевых культурах почек и семенников телят.

3.4.3. Идентификацию вируса проводят методом вируснейтрализации с применением специфической сыворотки. Реакцию нейтрализации ставят в культуре клеток путем заражения их смесями испытуемого вируса, взятого в дозе 100 $ТЦД_{50}$ с двукратными разведениями специфической сыворотки по методу, утвержденному в установленном порядке.

3.5. Обработка результатов

3.5.1. Вирус контагиозного пустулезного дерматита считают идентифицированным, если он нейтрализуется специфической сывороткой в разведении, равном ее титру.

4. МЕТОД ПОСТАНОВКИ БИОПРОБЫ

Сущность метода заключается в воспроизведении заболевания у здоровых ягнят, козлят в возрасте 3—6 мес или котят.

4.1. Метод отбора проб

4.1.1. Отбор проб — по п. 3.1.

4.2. Подготовка к исследованию

4.2.1. Суспензию для проведения исследования готовят в соответствии с п. 3.3.

4.3. Проведение исследования

4.3.1. Заражение животных испытуемой суспензией проводят методом скарификации кожи в области губ, внутренней поверхности бедра.

4.4. Обработка результатов

4.4.1. Биопробу считают положительной, если у подопытных животных через 2—5 сут на месте заражения появились характерные изменения в виде быстро подсыхающих с образованием корочек оспоподобных поражений кожи (пустул, папул).

Редактор *Н Е Шестакова*
Технический редактор *Л Я Митрофанова*
Корректор *О Я Чернецова*

Сдано в наб 22 04 83 Подп в печ 27 06 83 0,625 п л 0,42 уч изд л Тир 6000 Цена 3 коп

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, Новопресненский пер , 3
Калужская типография стандартов, ул Московская, 256 Зак 1269

gost.e-ecolog.ru