УДК 636 : 576.8.07 : 006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ

Методы лабораторной диагностики болезни Марека

Agricultural poultry.
Methods of laboratory diagnostics
of Marek disease

ГОСТ 25586—83

(СТ СЭВ 2700—80)

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 12 января 1983 г. № 96 срок действия установлен

с 01.07.83
до 01.07.88

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на кур и устанавливает методы лабораторной диагностики болезни Марека.

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

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 2700—80.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для патологоанатомических исследований отбирают тушки павшей или убитой птицы.

1.2. Для гистологических исследований от каждой павшей и убитой птицы отбирают пробы нервов Plexus brachialis и Truncus ischiadicus; пробы из органов с выраженными опухолевыми изменениями (печени, почек, яичника, железистого желудка, сердца, легких, поджелудочной железы).

Пробы должны быть не более 1×2×2 см. Отобранные пробы фиксируют в 10%-ном нейтральном растворе формалина и консервируют в герметически закрытых стеклянных или пластмассовых бутылках или упаковывают в фиксированном влажном виде без жидкости в запаянных пластмассовых пакетах.

1.3. Для выделения вируса отбирают почки, селезенку и кровь от подозреваемых в заболевании и больных кур.

1.4. Для проведения серологических исследований пробы крови птиц в количестве 7—10 $см^3$ берут стерильно из подкрыльцовой вены в пробирки, увлажненные физиологическим раствором. Кровь

gost.e-ecolog.ru

выдерживают при комнатной температуре до образования сгустка, затем осторожно обводят иглой или пастеровской пипеткой и оставляют на 2—3 ч, образовавшуюся сыворотку отсасывают пипеткой в стерильные пробирки.

1.5. Пробы упаковывают в коробку, запечатывают и доставляют в лабораторию.

В сопроводительном документе указывают время гибели или убоя птицы, ее возраст, а также эпизоотическую обстановку в хозяйстве.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Патологоанатомический метод

Сущность метода заключается в обнаружении специфических для болезни Марека (БМ) патологоанатомических изменений и их дифференциации от лимфоидного лейкоза (ЛЛ).

2.1.1. *Проведение исследования*

После подготовки проводят наружный осмотр тушки, отмечая поражения кожи. Затем кожу снимают и оценивают состояние скелетной мускулатуры (шеи, грудной мышцы, брюшка, поверхностей бедра). После этого птицу вскрывают и проводят оценку органов брюшной полости, включая фабрициеву бурсу, а также оценку основных стволов нервов в следующем порядке:

в области шеи — N. vagus и N. cervicalis, блуждающего нерва, проходящего в брыжейке между печенью и железистым желудком; Pl. coeliacus, расположенного в области A. coeliaca каудальной ветви N. intestinalis, а также Pl. ischiadicus, Pl. brachialis и Pl. lumbales.

2.1.2. *Обработка результатов*

Болезнь Марека диагносцируют при обнаружении:

изменений нервов в виде утолщений, утраты поперечной полосатости или узлового опухолевидного увеличения в объеме;

изменений глаз в виде деформации зрачка с изменением цвета радужной оболочки или без изменения ее (чаще всего при классической форме);

изменений кожи в виде множественных до величины с горошину опухолевидно утолщенных фолликулов перьев, а также диффузно опухолевидных утолщений кожи, частично с некрозами;

опухолей в органах в виде мелких множественных очажков, диффузного набухания или опухолевых узлов у птиц в возрасте 5—6 месяцев;

опухолей в сочетании с изменениями нервов, глаз или опухолевидными изменениями кожи.

При наличии опухолей в органах птиц старше 5—6-месячного возраста, не имеющих изменений нервов, глаз или кожи, болезнь Марека дифференцируют от лимфоидного лейкоза на основании:

различий в средней частоте появления опухолей в разных органах при заболевании болезнью Марека и лимфоидным лейкозом в соответствии с табл. 1;

Таблица 1

Наименование органа	Болезнь Марека*	Лимфоидный лейкоз
Фабрициева бурса	+	++++
Печень	++++	++++
Селезенка	+++	+++
Почки	+++	+++
Яичник	+++	+++
Сердце	+++	+
Легкие	+++	+
Железистый желудок	+++	+
Поджелудочная железа	++	++
Брыжейка	++	++
Зобная железа	+	++
Скелетная мускулатура	++	+
Кожа	+(+++)**	

Примечание. Принятые обозначения:
++++ опухоли обнаруживаются у 50% птиц и более;
+++ опухоли обнаруживаются у 15 до 50% птиц;
++ опухоли обнаруживаются у 5 до 15% птиц;
+ опухоли обнаруживаются менее чем у 5% птиц.

* Частота поражения органов может изменяться в зависимости от тяжести патологического процесса и проявления ассоциированной формы болезни Марека.

** Для бройлеров.

различий в патологоанатомической картине изменений органов при болезни Марека и лимфоидном лейкозе и наличия опухолей в фабрициевой бурсе при лимфоидном лейкозе в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Наименование органа	Болезнь Марека	Лимфоидный лейкоз
Печень	Очень незначительное до среднего увеличения с мелкими очагово-диссеминированными опухолями, часто нечетко ограниченными, размером от булавочной головки до размера чечевицы (равномерная гра-	Очень часто сильное до чрезвычайно выраженного увеличение с мелко-очагово-диссеминированными изменениями в виде чаще всего четко ограниченных и густо рассеянных опухолевых узелков, размером

Продолжение табл. 2

Наименование органа	Болезнь Марека	Лимфоидный лейкоз
	нитоподобная крапчатость) или неравномерные диффузно-инфильтрующие изменения в виде рисунка географической карты или (очень редко) увеличенных опухолевых узлов	преимущественно с булавочную головку до размера перчинки (равномерно и густо мелкозернистая поверхность разреза) или равномерно диффузно-инфильтрующие изменения в виде равномерного чрезвычайно сильного набухания и осветления или опухолевых узлов
Селезенка	Чаще всего диффузное набухание с нечеткой структурой поверхности разреза и (или) опухолевые узелки	Набухание или множественные однообразные мелкие опухолевые узелки (сходные с узелками в печени)
Яичник	Относительно крепкие плотные опухоли	Относительно мягкие изрезанные опухоли
Брыжейка	Неравномерные диффузные до толстокожих изменения (в виде спайки) или опухолевые узелки различной величины	Множественные мелкие опухолевые узелки (сходные с узелками в печени) или мягкие мелкоузелковые до диффузных изменений
Железистый желудок	Часто изменения в виде опухолевого набухания фолликулов, желез, а также узелковые или диффузные опухолевидные изменения слизистой оболочки или по всей стенке, часто с изъязвлениями	Очень редко изменения в виде незначительных до умеренно сильных опухолевидных набуханий, прежде всего у перехода слизистой оболочки пищевода к слизистой оболочке железистого желудка
Фабрициева бурса	Очень часто атрофия. Редко умеренное утолщение складок. Очень редко большая опухоль	У птиц в стадии развитой фабрициевой бурсы очень часто: опухолевые узелки в складках и (или) в стенке; неравномерное диффузное опухолевидное утолщение складок; превращение фабрициевой бурсы в солидную опухоль. У птиц в стадии обратного развития фабрициевой бурсы очень часто вместо фабрициевой бурсы опухоль величиной с чечевицу до размера гусиного яйца

При лимфоидном лейкозе в отличие от болезни Марека в среднем до 60% случаев фабрициева бурса преимущественно поражается опухолевидными изменениями. Поэтому в практике диагностики при наличии опухолей фабрициевой бурсы у птиц, начиная

с 6-месячного возраста, можно предварительно ставить диагноз — лимфоидный лейкоз.

Дифференциальную диагностику болезни Марека и лимфоидного лейкоза на основании данных патологоанатомических исследований с учетом возраста проводят в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Патологоанатомические изменения	Диагноз
Изменение нервов или глаз	Болезнь Марека
Изменения кожи (узелковидно, опухолевидно утолщенные фолликулы перьев)	Болезнь Марека
Опухоли в органах в сочетании с изменениями нервов, глаз или кожи	Болезнь Марека
Опухоли фабрициевой бурсы с опухолями или без опухолей в других органах:	
начиная с 5—6-месячного возраста	Лимфоидный лейкоз
в возрасте до 5—6 месяцев жизни	Болезнь Марека
Опухоли в органах без опухолей фабрициевой бурсы:	
в возрасте до 5—6 месяцев жизни	Болезнь Марека
начиная с 5—6-месячного возраста с изменениями согласно табл. 1 и 2, графа «Болезнь Марека»	Болезнь Марека
изменения согласно табл. 1 и 2, графа «Лимфоидный лейкоз»	Лимфоидный лейкоз

2.2. Гистологический метод

Сущность метода заключается в обнаружении специфических для болезни Марека патологогистологических изменений и их дифференциации от изменений при лимфоидном лейкозе.

2.2.1. *Аппаратура, материалы, реактивы и растворы*

Для проведения исследования применяют:

микротом замораживающий или парафиновый;

микроскоп;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

стекла покровные по ГОСТ 6672—75;

парафин с точкой плавления 58°С по ГОСТ 23683—79;

спирт этиловый или абсолютный по ГОСТ 5962—67;

метилбензоат;

бензол по ГОСТ 5955—75;

гематоксилин;

эозин;

спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67 или опал, 70%-ный раствор с 1%-ной соляной кислотой по ГОСТ 857—78;

ксилол по ГОСТ 9949—76;
ацетон по ГОСТ 2603—79;
карбол-ксилол;
бальзам для заливки по ГОСТ 2290—76.

2.2.2. *Подготовка к исследованию*

Из проб органов, фиксированных в формалине, готовят замороженные или парафиновые срезы, которые окрашивают гематоксилин-эозином или другими красителями и просматривают под микроскопом.

2.2.3. *Обработка результатов*

Результаты гистологических исследований оценивают в соответствии с табл. 4.

Таблица 4

Сравнительные гистологические данные	Болезнь Марека	Лимфоидный лейкоз
Гистоцитологические данные в результате опухолевидных изменений	Преобладающие гетероморфные инфильтраты и пролифераты из лимфоцитов, пролимфоцитов, лимфобластов и ретикулярных клеток, иногда с примесью фибробластов, гистиоцитов, плазматических клеток. Редко мономорфные пролифераты, состоящие из клеток типа лимфоидного ряда	Мономорфные пролифераты из лимфобластов
Гистологические данные ранних изменений:		
нервов	Отеки, околососудистые диффузные лимфоидные пролифераты	Нет изменений
фабрициевой бурсы	Межфолликулярные пролифераты и (или) дегенерация фолликулов с образованием кист	Внутрифолликулярные пролифераты из лимфобластов со стертой внутренней структурой фолликулов
селезенки	Неравномерные, часто околоартериальные очаги пролиферации	Внутрифолликулярные пролифераты из лимфобластов
печени, почек и других органов	Чаще всего неравномерные очаги пролиферации, образующиеся сначала вокруг сосудов	Фолликулоподобные очаги пролиферации из лимфобластов

2.3. Метод выделения вируса

Сущность метода заключается в выделении вируса из ткани почек больной или подозреваемой в заражении птицы и последующей идентификации его серологическим методом.

2.3.1. *Аппаратура и материалы*

Для проведения исследования применяют:

термостат с температурой нагрева 37—38°С;

мешалку магнитную;

пробирки стеклянные вместимостью 10, 15 и 20 $см^3$ по ГОСТ 25336—82;

пипетки пастеровские или пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$ по ГОСТ 20292—74;

колбы конические стеклянные вместимостью 50 и 100 $см^3$ по ГОСТ 1770—74;

флаконы для культуры клеток вместимостью 50, 100, 200 и 500 $см^3$ из нейтрального стекла;

раствор Хенкса;

трипсин, 0,25%-ный раствор;

среду № 199;

сыворотку телячью эмбриональную.

2.3.2. *Проведение исследования*

Из ткани почек только что убитой больной птицы вырезают кусочки размером 2—3 $см^3$, которые отмывают раствором Хенкса и добавляют 0,25%-ный раствор трипсина в соотношении 1 : 10. Суспензию перемешивают на магнитной мешалке в течение 20—30 мин при комнатной температуре.

Клеточную суспензию затем фильтруют через два слоя марли и центрифугируют в течение 10—15 мин с частотой вращения 1000 об/мин, готовят суспензию клеток в среде роста, содержащей в 1 $см^3$ 800 тыс. клеток, высевают ее во флаконы и инкубируют при температуре 37°С.

2.3.3. *Обработка результатов*

При наличии вируса проявляется цитопатическое действие (ЦПД) в виде образования очагов (фокусов), состоящих из скопления округленных рефрактильных клеток (спустя 48—72 ч), синцития и микроскопически видимых бляшек — негативных пятен (спустя 90—120 ч). Сроки появления ЦПД зависят от дозы вируса и количества проводимых пассажей. При первичном культивировании возбудителя специфические морфологические изменения клеток проявляются часто лишь во втором и третьем пассажах вируссодержащего материала спустя 48—96 ч. Специфичность ЦПД подтверждают исследованием отдельных проб материала в реакции преципитации в агаровом геле с иммунной сывороткой.

2.4. Серологический метод

Сущность метода заключается в обнаружении антител к вирусу болезни Марека или антигена этого вируса в реакции преципитации в агаровом геле.

2.4.1. *Аппаратура, реактивы и материалы*

Для проведения исследования применяют:
термостат с температурой нагрева 37—38°С;
чашки Петри по ГОСТ 25336—82;
стекла предметные по ГОСТ 9284—75;
натрия хлорид по ГОСТ 4233—77, 0,87%-ный раствор (физиологический раствор) с pH 7,2—7,4;
гель 1%-ного агара; готовят следующим образом: берут 10 г высококачественного очищенного агара, 80 г хлорида натрия и доводят дистиллированной водой до 1000 см^3. Смесь автоклавируют при 1 атм в течение 30 мин, фильтруют через два слоя марли и доводят pH смеси при помощи 10%-ного раствора гидроокиси натрия до 7,2—7,4. Среду консервируют мертиолатом (0,01% к общему объему), разливают в колбы или стеклянные бутылки по 50 или 100 см^3, охлаждают и хранят при температуре 2—4°С. В этих условиях среду хранят до 14 суток;
специфический тест-антиген вируса болезни Марека с титром от 1 : 8 до 1 : 16;
специфическую преципитирующую тест-сыворотку к вирусу болезни Марека (например, от спонтанно заболевшей птицы) с титром от 1 : 8 до 1 : 16;
контрольный антиген отрицательный;
контрольную сыворотку отрицательную;
среду для выращивания клеток;
среду поддерживающую.

2.4.2. *Подготовка к исследованию*

Для исследования в реакции преципитации в агаровом геле из эпителей фолликулов перьев готовят суспензию следующим образом: с наружной поверхности бедра и крыльев убитой птицы выщипывают по 10—15 перьев. Образовательная ткань внутри фолликулов перьев обязательно должна быть сохранена. Фолликулы перьев с эпителиальными клетками используют для получения суспензии и из них готовят экстракт для серологического исследования (индикация антигена). Очины перьев измельчают на кусочки, которые затем растирают в гомогенизаторе или в ступке со стерильным песком или замораживают в жидком азоте. Затем их заливают физиологическим раствором в соотношении 1 : 10 и экстрагируют в течение 24 ч при 4°С. Надосадочную жидкость экстракта исследуют в реакции преципитации.

2.4.3. *Проведение исследования*

Для постановки реакции преципитации агаровую среду расплавляют при температуре 60—65°С, разливают в чашки Петри или наносят на предметные стекла, чтобы толщина слоя агара была не менее 2 мм.

В агаровой пластинке делают шесть лунок в виде шестиугольника и одну лунку в центре. Шесть лунок диаметром 4 мм должны располагаться по окружности на расстоянии 2 мм друг от друга и от края центральной лунки.

Во избежание подтекания антигена и сыворотки под агар дно лунок осторожно расплавляют или в каждую лунку вносят небольшое количество расплавленного агара. В двухслойном агаре лунки пробивают только в верхнем слое.

Для выявления специфических антител в сыворотке крови в центральную лунку вносят специфический вирусный антиген, а в периферические лунки — испытуемые сыворотки. Специфический антиген готовят из перьевых фолликулов птиц, экспериментально инфицированных вирусом болезни Марека.

Контролями служат:

специфический вирусный антиген + специфическая сыворотка;

специфический вирусный антиген + контрольная сыворотка (отрицательная);

специфический вирусный антиген + физиологический раствор.

Для выявления вирусного антигена в центральную лунку вносят специфическую сыворотку, а в периферические лунки испытуемый материал. При этом необходимо использовать экстракт из перьев фолликулов спонтанно заболевшей птицы или клеточную культуру, зараженную вирусом.

Контролями служат:

специфическая сыворотка + специфический вирусный антиген;

специфическая сыворотка + контрольный антиген (отрицательный).

После заполнения лунок компонентами закрытые чашки или предметные стекла помещают во влажную камеру или термостат при температуре 37°С.

Результаты учитывают через 24 и 48 ч. Конечный учет проводят через 72 ч.

2.4.4. *Обработка результатов*

Реакцию на чашках Петри и предметных стеклах учитывают в косонаправленном пучке света на темном фоне. Сначала регистрируют контрольные линии преципитации, которые должны появляться между лунками со специфическим антигеном и специфической сывороткой. Пробы с линиями преципитации считают положительными.

Реакцию считают положительной при образовании линий преципитации между лунками с испытуемым материалом и специфическим антигеном или сывороткой при условии отсутствия линий преципитации с отрицательными антигенами и сывороткой.

Изменение № 1 ГОСТ 25586—83 Птица сельскохозяйственная. Методы лабораторной диагностики болезни Марека

Утверждено и введено в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 17.03.88 № 597

Дата введения 01.07.88

Под наименованием стандарта проставить код: ОКСТУ 9809.

По всему тексту стандарта заменить единицу: об/мин на $мин^{-1}$.

Пункты 1.3, 2.3—2.3.3 исключить.

(ИУС № 6 1988 г.)

gost.e-ecolog.ru