



**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР**

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ

**ГОСТ 25753–83
(СТ СЭВ 3454–81)**

Издание официальное

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва**

Цена 3 коп.

РАЗРАБОТАН Министерством сельского хозяйства СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

А. В. Селиванов, Э. М. Прохорова, Т. И. Малахова

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.
№ 2016

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ**Методы лабораторной диагностики болезни Ауески**Agricultural animals. Methods of laboratory
diagnostics for Morbus Aujeszki

ОКСТУ 9809

**ГОСТ
25753—83****[СТ СЭВ 3454—81]**

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 22 апреля 1983 г. № 2016 срок действия установлен

с 01.07.84до 01.07.89**Несоблюдение стандарта преследуется по закону**

Настоящий стандарт распространяется на крупный рогатый скот, овец, свиней и других животных (пушных зверей, собак и кошек), невакцинированных живыми вакцинами, и устанавливает методы лабораторной диагностики болезни Ауески.

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

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 3454—81.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для проведения биологической пробы и выделения вируса патологический материал берут от животных в период максимального проявления клинических признаков болезни (температурная реакция, угнетение, нервная клиника, зуд, расчесы). От вынужденно убитых и павших животных патологический материал должен быть взят и исследован в летнее время в течение 6 ч, а при условии хранения его в охлажденном состоянии в течение 10—12 ч.

1.2. В лабораторию доставляют больных животных, трупы животных или кусочки тканей и органов (головного и спинного мозга, легких, печени, селезенки, лимфатических узлов, миндалин), от абортировавших животных — плоды и плаценту.

1.3. Для серологического исследования пробы крови от исследуемых животных берут в стерильные пробирки в количестве не менее 5 см³.

Сыворотку получают методом отстаивания и хранят ее до 10 сут при температуре плюс 4 °С. Допускается более длительное хранение сыворотки при температуре минус 20 °С. Сыворотка должна быть прозрачной без признаков гемолиза.

1.4. Патологический материал доставляют в лабораторию с сопроводительным документом, в котором указывают наименование хозяйства, вид и возраст животного, эпизоотические данные, клиническую и патолого-анатомическую картину, сведения о проведении иммунизации животных и применяемой вакцине.

2. МЕТОД БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЫ

Сущность метода заключается в воспроизведении заболевания у здоровых кроликов путем инокуляции патологического материала.

2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Для проведения испытания применяют:

центрифугу с частотой вращения не менее 3000 об/мин;

термостат с температурой нагрева 37 °С;

пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82;

пипетки мерные по ГОСТ 20292—74;

шприцы вместимостью 1 или 2 см³;

чашки Петри по ГОСТ 25336—82;

раствор физиологический стерильный, рН=7,2;

раствор солевой буферный стерильный, рН=7,2;

антибиотики широкого спектра действия.

2.2. Подготовка к исследованию

Из стерильно отобранных кусочков органов и тканей готовят 10%-ную суспензию на физиологическом или солевом буферном растворе. Суспензию центрифугируют с частотой вращения 2000—3000 об/мин в течение 20—30 мин. Надосадочную жидкость пипеткой переносят в стерильные пробирки, добавляют антибиотики по 100 Ед/см³ и выдерживают в течение 1 ч в термостате при температуре 37 °С или 2—3 ч при комнатной температуре, а затем используют для проведения биологической пробы или выделения вируса в культуре клеток.

2.3. Проведение исследования

Для проведения биологической пробы используют кроликов массой 2—2,5 кг. Надосадочную жидкость, приготовленную по п. 2.2, вводят двум кроликам внутримышечно в дозе 1—2 см³.

2.4. Обработка результатов

Биопробу считают положительной, если животные погибают с клиническими признаками болезни Ауески (нервная клиника, зуд, расчесы) через 2—10 сут после инокулирования суспензии патологического материала. Если животные погибают без призна-

ков болезни Ауески, биопробу повторяют, используя патологический материал первого пассажа.

Гибель кроликов после введения суспензии патологического материала от свиней без признаков зуда и расчесов может свидетельствовать о выделении вакцинных штаммов вируса болезни Ауески.

Гибель кроликов после введения суспензии патологического материала от пушных зверей без признаков зуда и расчесов может свидетельствовать о выделении вакцинных штаммов вируса болезни Ауески, патогенных для пушных зверей.

Для идентификации вируса проводят выделение вируса в культуре клеток с последующей постановкой реакции нейтрализации.

3. МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Сущность метода заключается в выявлении цитопатического действия (ЦПД) вируса в культуре клеток и его последующей идентификации.

3.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Для проведения исследования применяют:

- термостат с температурой нагрева 37 °С;
- центрифугу с частотой вращения не менее 3000 об/мин;
- весы лабораторные с погрешностью взвешивания не более 0,01 г;
- шкаф сушильный;
- микроскоп любой марки;
- холодильники;
- баню водяную;
- аппарат для трипсинизации тканей;
- пипетки мерные по ГОСТ 20292—74;
- пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82;
- чашки Петри по ГОСТ 25336—82;
- фильтры стерилизующие разных размеров;
- раствор солевой буферный стерильный, рН=7,2;
- среды ростовую питательную и поддерживающую;
- раствор трипсина;
- соду двууглекислую по ГОСТ 4201—79;
- сыворотку крупного рогатого скота для культуры клеток;
- антибиотики и препараты микостатические;
- феноловый красный по ГОСТ 4599—73;
- раствор трипана голубого;
- культуру клеток первично-трипсинизированных почек и щитовидной железы свиньи, семенников телят, эмбрионов кур, клеточные линии РК₁₅, ВНК₂₁ (любую из перечисленных);

вирус болезни Ауески с титром не ниже 10^4 ТЦД_{50/см³}; сыворотку животных, не содержащую антител к вирусу болезни Ауески (отрицательную);

сыворотку специфическую гипериммунную против болезни Ауески (положительную).

3.2. Подготовка к исследованию — по п. 2.2.

3.3. Проведение исследования

В пробирки с культурой клеток вносят по 0,2 см³ каждого испытуемого материала. Для каждой пробы используют 4—6 пробирок. Пробирки с зараженной культурой клеток выдерживают в термостате при 37 °С в течение 30 мин. Затем из пробирок с культурой клеток удаляют надосадочную жидкость и добавляют 1,8 см³ поддерживающей питательной среды, содержащей антибиотика.

В контроле используют 4—6 пробирок с незараженной культурой клеток, в которой проводят смену питательной среды. Пробирки с зараженной культурой клеток и контрольные инкубируют при температуре 37 °С в течение 2—5 сут и ежедневно микроскопируют для учета цитопатических изменений. При появлении цитопатических изменений культуральную жидкость из каждой пробирки объединяют и производят идентификацию выделенного вируса. Если испытуемый материал токсичен для клеток или невозможно определить специфичность ЦПД, проводят дополнительный пассаж.

3.4. Обработка результатов

Результат исследования испытуемого материала считают положительным, если в культуре клеток обнаруживается цитопатогенное действие вируса, которое проявляется в округлении клеток, появлении гигантских клеток и клеточном лизисе с отпадением пораженных клеток от стекла.

В контрольных культурах (незараженных) не должно быть цитопатических изменений.

По результатам вирусологического исследования болезнь Ауески диагностируют, если видовая принадлежность выделенного вируса в культуре клеток подтверждена в реакции нейтрализации (метод идентификации вируса).

4. МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА

Сущность метода заключается в обнаружении подавления цитопатического действия вируса в культуре клеток с помощью положительной сыворотки.

4.1. Аппаратура, материалы и реактивы — по п. 3.1.

4.2. Проведение исследования

Перед постановкой реакции нейтрализации положительную и отрицательную сыворотки разбавляют в соотношении 1:10 питательной средой для культуры клеток, содержащей антибиотиками, и прогревают в водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин. В два ряда пробирок (по 7 шт.) вносят по 2 см³ сыворотки в каждую пробирку: в первый ряд — положительную, во второй — отрицательную.

Готовят десятикратные разведения испытуемого вируса от 10⁻¹ до 10⁻⁷ на питательной среде для культуры клеток в объемах, достаточных для постановки реакции, и вносят в два ряда пробирок с сыворотками, начиная с разведения 10⁻⁷, в объеме по 2 см³ на пробирку. Пробирки со смесью разведений вируса и сыворотки встряхивают и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 1 ч. Затем каждую смесь сыворотки с разведениями вируса вносят по 1 см³ в 4 пробирки с культурой клеток. Пробирки инкубируют в термостате при температуре 37 °С.

4.3. Обработка результатов

Результаты реакции учитывают по цитопатическому действию вируса через 2—5 сут. Для этого определяют титр исследуемого вируса в присутствии положительной и отрицательной сывороток и выражают его в логарифмах ТЦД_{50/см³}. Титр вычисляют по методу Рида и Менча. Видовую принадлежность вируса устанавливают при наличии разности в титрах вируса с отрицательной и положительной сыворотками не менее чем на два логарифма.

5. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Сущность метода заключается в специфическом свойстве нейтрализующих антител сыворотки крови подавлять способность вируса вызывать цитопатическое действие в культуре клеток.

5.1. Аппаратура, материалы и реактивы—по п. 3.1.

5.2. Подготовка к исследованию

Для групповой диагностики исследуют пробы сывороток в разведениях 1:2 или 1:4 в культуре клеток против 1000 ТЦД_{50/0,1 см³} вируса. Для контроля благополучного стада допускается исследование смеси сывороток от пяти животных. Для подтверждения положительного диагноза сыворотки исследуют в разведениях от 1:2 до 1:16.

Испытуемые сыворотки выдерживают в водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин.

5.3. Проведение исследования

Готовят двукратные разведения испытуемых сывороток от 1:2 до 1:16 на питательной среде для культуры клеток с анти-

биотиками. Затем готовят необходимый объем вируса, содержащего 1000 ТЦД_{50/0,1 см³} и добавляют равный объем его в каждую пробирку с последовательными разведениями сывороток. Смесь сывороток и вируса встряхивают, выдерживают при температуре 37 °С в течение 1 ч, после чего в 4 пробирки с культурой клеток вносят по 0,2 см³ смеси сыворотки и вируса и выдерживают при температуре 37 °С в течение 30 мин. По истечении указанного срока в пробирки с культурой клеток вносят по 1,8 см³ поддерживающей питательной среды. Одновременно ставят следующие контроли:

контроль незараженных культур клеток в 3—4 пробирках, в которых проводят смену питательной среды;

контроль дозы вируса. Для контроля точности дозы вируса, взятой в реакцию, из рабочего разведения вируса (1000 ТЦД_{50/0,1 см³}) готовят разведения до 10⁻⁴. Для каждого разведения вируса используют 3—4 пробирки с культурой клеток. В пробирки с культурой клеток вносят рабочее разведение вируса и последовательные его разведения в объеме по 0,1 см³. После контакта при температуре 37 °С в течение 30 мин в пробирки с культурой клеток добавляют 1,9 см³ поддерживающей питательной среды;

контроль токсичности сыворотки. Для определения токсичности сыворотки в пробирочные культуры вносят по 0,1 см³ разведения сыворотки и по 1,9 см³ поддерживающей питательной среды (по 3—4 пробирки с культурой клеток на каждое разведение сыворотки);

контроль специфичности вируса. Пробирки с культурой клеток инфицируют смесью вируса в рабочей дозе с двукратным разведением специфической сыворотки до ее титра (по 3—4 пробирки с культурой клеток для смеси каждого разведения специфической сыворотки + вирус).

Все пробирки с культурами клеток, используемые в реакции, инкубируют при температуре 37 °С.

Проводят ежедневный микроскопический контроль клеточных культур. Учет реакции проводят при появлении цитопатического действия вируса в контроле дозы вируса, взятой для реакции нейтрализации.

5.4. Обработка результатов

Результат серологического исследования испытуемых сывороток считают положительным при отсутствии цитопатического действия в разведениях сыворотки 1:2 и выше при наличии следующих результатов в контролях:

в контроле культуры клеток не должно быть изменений моно-слоя клеток;

в контроле дозы вируса цитопатическое действие должно быть в рабочем разведении вируса и в разведениях 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4} (в последнем разведении не менее двух пробирок);

в контроле токсичности сывороток в случае положительной сыворотки (переболевшее животное) отсутствует цитопатический эффект, начиная с разведения сыворотки 1:2; при отрицательной сыворотке (отсутствуют специфические антитела) должен быть цитопатический эффект, как и в культурах с контролем дозы вируса (рабочее разведение);

в контроле специфичности вируса отсутствует цитопатический эффект в культурах, инокулированных смесью специфической сыворотки и вируса.

Наличие специфических антител в испытуемых сыворотках крови свидетельствует об инфицировании данной особи, группы животных возбудителем болезни Ауески или возможной вакцинации животных против болезни Ауески.

Положительный результат серологического метода исследования сывороток крови невакцинированных животных свидетельствует о подозрении на заболевание, которое подтверждают постановкой биологической пробы.

Редактор *Н. Е. Шестакова*
Технический редактор *Н. П. Замолодчикова.*
Корректор *Е. И. Евтеева*

Сдано в наб. 06.05.83 Подп. в печ. 07.06.83 0,625 п. л. 0,48 уч.-изд. л. Тир. 6000 Цена 3 коп.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, Новопресненский пер., 3
Тип. «Московский печатник». Москва, Лялин пер., 6. Зак. 527