

ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ

Методы лабораторной диагностики
инфекционного бронхитаAgricultural poultry.
Methods of laboratory diagnostics
of infectious bronchitisГОСТ
25583—83

[СТ СЭВ 1744—79]

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 6 января 1983 г. № 18 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 инфекционного бронхита.

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

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 1744—79.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для вирусологического исследования берут пробы тканей и органов — трахеи, слизистой оболочки носовой полости, почек и легких убитой или только что павшей птицы, а от взрослой птицы — почек и яйцеводов.

1.2. Для серологического исследования берут не менее чем от 10 голов птицы дважды с интервалом 14—21 сут пробы крови по 5 см³ от каждой птицы. Отстаивают сыворотку крови.

1.3. Пробы органов и тканей или их 10%-ную суспензию хранят при температуре минус 20°C. Пробы сыворотки крови хранят без добавления консервантов при температуре минус 20°C.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Вирусологический метод

Сущность метода заключается в изолировании и идентификации возбудителя заболевания на куриных эмбрионах или на культуре клеток.

2.1.1. Аппаратура и материалы

Для проведения исследования применяют:
термостат с температурой нагрева 37—38°C;
инкубатор;

ступки фарфоровые;

центрифугу с частотой вращения 3000 об/мин;

пробирки стеклянные вместимостью 10, 15 и 20 см³ по ГОСТ 10515—75;

овоскоп;

шприцы с иглами;

куриные эмбрионы 9-суточного возраста;

культуру клеток почек куриных эмбрионов или фибробласты;
раствор Хенкса;

стрептомицин, пенициллин.

2.1.2. Подготовка к исследованию

Пробы органов и тканей растирают в стерильной ступке в изотоническом буферном растворе в соотношении 1:10 и экстрагируют в течение 2 ч при 4°C. Суспензию центрифугируют с частотой вращения от 1500 до 2000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость обрабатывают 2000 ЕД/см³ пенициллина и 2 ЕД/см³ стрептомицина.

2.1.3. Проведение исследования

Обработанную антибиотиками надосадочную жидкость инокулируют в дозе 0,2 см³ через воздушную камеру в аллантоисную полость шести куриным эмбрионам 9-суточного возраста.

Зараженные эмбрионы инкубируют при 37,5°C и относительной влажности 60—70% и два раза в день овоскопируют. Эмбрионы, погибшие в течение 24 ч после заражения, не учитывают. Оставшихся в течение 72 ч трех живых эмбрионов убивают охлаждением при температуре 4°C, а остальных собирают и охлаждают через 7 сут после заражения. От первых трех эмбрионов собирают аллантоисную жидкость и хориоаллантоисную оболочку для следующего пассажа, а остальные эмбрионы исследуют на наличие микроскопических изменений.

Проводят четыре последовательных пассажа вируса на куриных эмбрионах, так как первый пассаж в большинстве случаев не вызывает гибели или изменения эмбрионов.

Идентификацию вируса проводят на 9-суточных куриных эмбрионах в реакции нейтрализации (РН), используя известные специфические антисыворотки как минимум к двум основным серотипам вируса (Massachusetts, Connecticut) с индексом нейтрализации антисывороток более 3 lg (см. п. 2.2.3.1), или в реакции нейтрализации в культуре клеток почек куриных эмбрионов или фибробластов (см. п. 2.2.3.2).

2.1.4. Обработка результатов

2.1.4.1. Вирус считают идентифицированным и результат положительным, если эмбрионы, инокулированные смесью испытываемого вируса со специфической антисывороткой, остаются живыми и развиваются нормально, а эмбрионы, инокулированные только испытываемым вирусом, погибают или отстают в развитии; у эмбрионов наблюдается перекручивание тела, сворачивание тела в шар, уменьшается количество амниотической жидкости, оболочки плотно прилегают к эмбриону.

В культуре клеток при положительной реакции специфическая антисыворотка ингибирует цитопатический эффект, вызванный вирусом инфекционного бронхита.

2.1.4.2. При получении отрицательного результата в реакции нейтрализации (это может быть связано с неспецифичностью используемой антисыворотки к присутствующему серотипу вируса—Massachusetts, Connecticut) проводят реакцию преципитации в агаровом геле (РПАГ) по п. 2.2.3.3.

2.2. Серологический метод

Сущность метода заключается в выявлении у переболевшей птицы специфических антител в реакции нейтрализации (РН) и реакции преципитации в агаровом геле (РПАГ).

2.2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Для проведения исследования применяют:

баню водяную;

термостат с температурой нагрева 37—38°C;

центрифугу с частотой вращения 3000 об/мин;

пробирки вместимостью 10, 15 и 20 см³ по ГОСТ 25336—82;

пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ по ГОСТ 20292—74;

чашки Петри по ГОСТ 25336—82;

штамп для изготовления лунок в агаре;

воронку по ГОСТ 25336—82;

пенициллин;

стрептомицин;

агар очищенный;

мединал;

куриные эмбрионы 9-суточного возраста;

культуры клеток почек куриных эмбрионов, выращенные на среде с 10%-ной телячьей сывороткой;

среды питательные для культуры клеток;

антисыворотки типоспецифические к инфекционному бронхиту, положительные;

штаммы эталонные вирусов инфекционного бронхита разных антигенных типов;

натрий хлористый по ГОСТ 4233—77, 0,87%-ный раствор;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

2.2.2. Подготовка к исследованию

Пробы сыворотки крови инактивируют прогреванием при температуре 56°C в течение 30 мин. Загрязненную сыворотку фильтруют через бактериальные фильтры или обрабатывают антибиотиками.

2.2.3. Проведение исследования в реакции нейтрализации на куриных эмбрионах

2.2.3.1. В реакции используют вирус с титром не ниже 10^7 ЭИД $50/1 \text{ см}^3$. Готовят серийные десятикратные разведения вируса от 10^{-3} до 10^{-8} . Равные количества разведенного вируса, специфических антисывороток и испытываемых сывороток крови смешивают и смесь оставляют на 1 ч при комнатной температуре.

Каждым разведением инокулируют по четыре куриных эмбриона 9-суточного возраста в аллантаисную полость в дозе $0,2 \text{ см}^3$. Инокулированные куриные эмбрионы овоскопируют ежедневно в течение 3—8 сут (в зависимости от используемого штамма); погибшие эмбрионы в течение первых 24 ч не учитывают.

2.2.3.2. Обработка результатов

По истечении 3—8 сут определяют инфекционный статус каждой группы инокулированных куриных эмбрионов и вычисляют ИД₅₀. Разница между логарифмами титра контрольного ряда вируса и титра смеси вируса с испытываемой сывороткой выражает индекс нейтрализации.

При значении индекса нейтрализации от 0,0 до 1,0 результат реакции считают отрицательным, от 1,1 до 2,0 — сомнительным, от 2,1 и выше — положительным.

Если для 20 и более процентов испытываемых сывороток крови получится сомнительный результат, исследование проводят в реакции преципитации в агаровом геле. При получении сомнительных результатов проводят исследование сывороток крови, полученных при повторном взятии крови от птицы на 14—21 сут. Вируснейтрализующие антитела образуются через 2—3 недели после вспышки заболевания и сохраняются пожизненно, а преципитирующие антитела — от 2 до 7 недель после начала заражения.

2.2.4. Проведение исследования в реакции нейтрализации на культурах клеток

2.2.4.1. Берут свежеполученную культуру клеток при образовании сплошного монослоя и адаптированный к культурам клеток вирус с титром 5—5,5 ед/ см^3 .

Готовят серийные 10-кратные разведения вируса до 10^{-6} . Каждое разведение вируса смешивают с равным количеством типоспецифической сыворотки. Если в реакции используются кроличьи контрольные сыворотки (положительная и отрицательная), их разводят до 10^{-1} , так как неразведенные сыворотки вызывают неспе-

цифическое гранулирование цитоплазмы клетки. Разведение сыворотки учитывают при вычислении индекса нейтрализации. Для каждого разведения вируса и смеси вируса с сывороткой берут по четыре пробирки. Разведения вируса и смеси вируса с сывороткой вносят в каждую пробирку в объеме 0,1 см³, адсорбируют в течение 30—40 мин при комнатной температуре, а затем добавляют поддерживающую среду в объеме 0,9 см³, содержащую 2,5% телячьей сыворотки, и инкубируют при 37,5°C в течение 6 сут.

2.2.4.2. *Обработка результатов*

Учет реакции ведут по цитопатическому действию вируса. Разница логарифмов титра вируса и смеси вируса с сывороткой считается индексом нейтрализации. Результат реакции определяют по п. 2.2.3.2.

2.2.5. *Проведение исследования в реакции преципитации в агаровом геле*

2.2.5.1. Очищенный агар от 1,1 до 1,5%, содержащий 8% хлористого натрия и имеющий рН 7,6—7,8, наливают в чашки Петри. Штампом делают лунки (углубления) диаметром 4 или 6 мм на расстоянии 4 мм друг от друга. На дно каждой лунки наносят каплю расплавленного агара; антиген получают из гомогенизированных хориоаллантоисных оболочек (ХАО) погибших куриных эмбрионов, инокулированных адаптированным к ним штаммом. Выбирают только те ХАО, которые показывают четкую и сильно выраженную реакцию с преципитирующей специфической антисывороткой; сыворотки — контрольные (положительная и отрицательная) и испытуемые должны быть в нативном состоянии и не инактивированными. Чашки Петри выдерживают во влажной камере при температуре 37°C или при комнатной температуре в течение 24—72 ч.

Кроме контрольной положительной и отрицательной сывороток, в РПАГ ставят и контроль на антиген, изготовленный из гомогената ХАО незараженных куриных эмбрионов того же самого возраста.

2.2.5.2. *Обработка результатов*

Появление линии преципитации между антигеном и сыворотками свидетельствует о положительном результате.

Небольшой процент положительных результатов в реакции преципитации в агаровом геле выявляют в том случае, если заражение птиц происходило за 2—7 недель до исследования.

Если устанавливают большой процент преципитирующих сывороток, стадо птицы считают неблагополучным по инфекционному бронхиту.

Изменение № 1 ГОСТ 25583—83 Птица сельскохозяйственная. Методы лабораторной диагностики инфекционного бронхита

Утверждено и введено в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 17.03.88 № 596

Дата введения 01.07.88

Под наименованием стандарта проставить код: ОКСТУ 9809.

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

Пункт 2.1.1. Заменить ссылку: ГОСТ 10515—75 на ГОСТ 25336—82.

Пункт 2.1.2. Заменить слова: «изотоническом буферном» на «физиологическом», «Надосадочную жидкость обрабатывают 2000 ЕД/см³ пенициллина и 2 ЕД/см³ стрептомицина» на «В надосадочную жидкость добавляют 2000 ЕД/см³ пенициллина и 2 мг/см³ стрептомицина, выдерживают при комнатной температуре 1 ч и делают высевы на питательные среды».

Пункт 2.1.3. Третий абзац. Заменить слово: «четыре» на «шесть».

(Продолжение см. с. 350)

(Продолжение изменения к ГОСТ 25583—83)

Пункт 2.1.4.2 исключить.

Пункт 2.2.1. Двенадцатый абзац дополнить словами: «или агар Дифко».

Пункт 2.2.5.1. Первый абзац после слов «Очищенный агар» дополнить словами: «или агар Дифко».

(ИУС № 6 1988 г.)