

ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ**Методы лабораторной диагностики
инфекционного ларинготрахеита**

Agricultural poultry.
Methods of laboratory diagnostics
of infectious laringotracheitis

**ГОСТ
25582—83****[СТ СЭВ 1743—79]**

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 6 января 1982 г. № 17 срок действия установлен

с 01.07.83
до 01.07.88

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на кур и фазанов и устанавливает методы лабораторной диагностики инфекционного ларинготрахеита.

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

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 1743—79.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для вирусологического исследования берут пробы патологического материала — часть слизистой оболочки гортани, трахеи, конъюнктивы, носовых ходов (включая экссудаты) и легких от только что павших или убитых с диагностической целью птиц в начальной фазе их заболевания — на 2—7 сут.

Отобранные пробы замораживают и до проведения исследований сохраняют при температуре минус 20°C и ниже.

1.2. Для серологического исследования берут на 14 и 28 сут от начала болезни кровь по 5 см³ не менее чем от пяти голов птицы. Отделяют сыворотку крови и до начала исследований сохраняют ее (не добавляя консервантов) в замороженном состоянии при температуре минус 20°C и ниже.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Метод выделения вируса

Сущность метода заключается в выделении возбудителя заболевания на куриных эмбрионах или на культуре клеток.

2.1.1. Аппаратура и материалы

Для проведения исследования применяют:

термостат или инкубатор вакуумный с температурой нагрева 37—38°C;

ступки фарфоровые;

центрифугу лабораторную с частотой вращения 3000—5000 об/мин;

измельчитель ткани;

пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82;

флаконы;

термометр;

шприцы с иглами;

пенициллин;

стрептомицин;

эмбрионы куриные 9—12-суточного возраста;

культуру клеток почек куриных эмбрионов и цыплят;

гидролизат лактальбумина 0,5% в растворе Хенкса.

2.1.2. Подготовка к исследованию

Пробы патологического материала, взятые для выделения вируса, гомогенизируют в изотоническом буферном растворе в концентрации 1:5 с помощью измельчителя ткани или в ступке с кварцевым стеклом. Смесь центрифугируют с частотой вращения 1500—2000 об/мин в течение 10—15 мин. Надосадочную жидкость сливают, добавляют по 1000 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 см³ суспензии и выдерживают в течение 3—12 ч при 2—4°C.

2.1.3. Проведение исследования

При выделении вируса на куриных эмбрионах для каждой пробы используют по 10 куриных эмбрионов. Полученную после обработки пробы суспензию инокулируют на хориоаллантоисную оболочку или в хориоаллантоисную полость в количестве 0,1—0,2 см³. Зараженные эмбрионы одновременно с контрольными инкубируют при температуре 37°C в течение 8 сут. Эмбрионы овоскопируют не реже чем один раз в сутки. Эмбрионы, погибшие в первые 24 ч, отбрасывают, а эмбрионы, погибшие позже, удаляют и сохраняют в холодильнике при температуре 4°C. Оставшиеся живые эмбрионы убивают на 6—8 сут после инокулирования охлаждением в течение 2—3 ч при 4°C.

2.1.4. *Обработка результатов*

2.1.4.1. Гибель эмбрионов в течение 4—6 сут свидетельствует о наличии вирулентного штамма вируса инфекционного ларинготрахеита. Гибель эмбрионов позднее указанных сроков или отставание эмбрионов в развитии по размерам и массе свидетельствует о заражении более мягкими штаммами вируса.

2.1.4.2. Для выявления специфических поражений куриного эмбриона проводят дополнительно 2—3 пассажа.

Для последующего пассажа вируса используют для заражения хориоаллантоисную оболочку, суспензированную в аллантоисной жидкости, и весь эмбрион.

Специфические поражения куриных эмбрионов, погибших через 3—5 сут после заражения, характеризуются: помутнением и утолщением хориоаллантоисной оболочки, наличием мелких (мелкозернистые, величиной 1—4 мм) или крупных (диаметром 5—7 мм) бляшек от серого до желто-белесого цвета различной морфологии — круглые, плоские или неправильной формы.

2.1.4.3. Выделение вируса подтверждают установлением внутриклеточных включений (телец Зейфрида), реакцией нейтрализации, реакцией диффузионной преципитации в агаровом геле или биопробой. Идентификацию вируса проводят также методом иммунофлуоресценции и электронной микроскопии.

2.1.4.4. При заражении вирусом инфекционного ларинготрахеита культуры клеток почек куриных эмбрионов и цыплят цитопатический эффект появляется на 4—6 сут после инокулирования. Наблюдают множество многоядерных поликариоцитов. Под микроскопом обнаруживают внутриядерные включения. Специфичность этих изменений доказывают иммунофлуоресценцией или с помощью специфических сывороток в реакции нейтрализации.

2.2. *Метод постановки биопробы*

Сущность метода заключается в воспроизведении инфекционного ларинготрахеита на цыплятах. Метод позволяет определить вирулентность штамма, а также провести дифференциацию его от вирусов, вызывающих сходное поражение хориоаллантоисной оболочки у инфицированных куриных эмбрионов.

2.2.1. *Аппаратура и материалы*

Для проведения исследования применяют аппаратуру и материалы, указанные в п. 2.1.1, и дополнительно: пипетки пастеровские.

2.2.2. *Проведение исследования*

Биопробу ставят на цыплятах 1—2,5-месячного возраста путем внутритрахеальной аппликации вирусосодержащего материала и втирания его в слизистую оболочку клоаки.

За выжившими цыплятами наблюдают в течение 10—14 сут.

Для исключения вируса оспы кур, вызывающего на хорио-аллантоисной оболочке поражения, сходные с вирусом инфекционного ларинготрахеита, заражают цыплят 30—60-суточного возраста методом аппликации вирусосодержащего материала в скарифицированные перьевые фолликулы голени, гребешок и гортань.

2.2.3. *Обработка результатов*

Инфекционный ларинготрахеит диагностируют при появлении у зараженных цыплят на 3—7 сут, но не позднее 12 сут клинических признаков: кашля, хрипов, поражений гортани, ринита.

У птиц, зараженных клоачно, наблюдается воспаление слизистой оболочки. Некоторые более мягкие штаммы, даже и в больших дозах, вызывают только хрипы и истечения из носа. Оспенная реакция у зараженной птицы проявляется на 6—8 сут в форме припухания и покраснения фолликул и образования ложных дифтеритических наложений в ротовой полости. При вирусоскопии по Морозову в мазках из развившихся фолликул обычно обнаруживают оспенные элементарные тельца.

2.3. Серологический метод

Сущность метода заключается в выявлении у птиц специфических антител в реакции нейтрализации (РН).

2.3.1. *Аппаратура, материалы, реактивы и питательные среды*

Для проведения исследования применяют:

- баню водяную;
- термостат с температурой нагрева 37—38°C;
- холодильник с морозильной камерой;
- штативы;
- горелки газовые или спиртовые;
- пробирки бактериологические;
- пробки резиновые;
- пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 и 100 см³ по ГОСТ 20292—74;
- измельчитель ткани;
- потенциометр;
- чашки Петри по ГОСТ 25336—82;
- стекла предметные по ГОСТ 9284—75;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233—77;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72;
- пенициллин;
- стрептомицин;
- эмбрионы куриные 9—12-суточного возраста;
- культуру клеток почек куриных эмбрионов и цыплят;
- среды питательные для культуры клеток.

2.3.2. Подготовка к исследованию

2.3.2.1. Антиген для проведения реакции нейтрализации готовят из хориоаллантоисной оболочки куриных эмбрионов с характерными для данного вируса изменениями. Хориоаллантоисную оболочку гомогенизируют с равным количеством буферного изотонического раствора с рН от 7,2 до 7,4, к которому добавлены антибиотики из расчета по 100 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 см³ раствора.

Суспензию центрифугируют в течение 10 мин с частотой вращения 1500—2000 об/мин.

Надосадочную жидкость сливают и используют в качестве антигена, если она содержит вируса не менее 10⁵ ЕИД 50/см³. До употребления антиген сохраняют в запаянных ампулах в замороженном состоянии.

2.3.2.2. Сыворотки (больных и переболевших птиц, контрольные положительные и отрицательные сыворотки птиц) инактивируют в водяной бане при температуре 56°C в течение 30 мин и до начала исследования сохраняют также в замороженном состоянии.

2.3.3. Проведение исследования

Реакцию нейтрализации проводят на куриных эмбрионах или на культурах клеток, используя постоянные количества сыворотки и прогрессивно нарастающие 10-кратные разведения вируса-антигена.

Реакция нейтрализации проводится в соответствии с таблицей.

Номер ряда	Номер пробирки	Нормальная сыворотка, см ³	Иммунная сыворотка, см ³	Разведение вируса				
				1:5	1:50	1:500	1:5000	1:50000
1	1	0,5	—	0,5	—	—	—	—
	2	0,5	—	—	0,5	—	—	—
	3	0,5	—	—	—	0,5	—	—
	4	0,5	—	—	—	—	0,5	—
	5	0,5	—	—	—	—	—	0,5
2	1	—	0,5	0,5	—	—	—	—
	2	—	0,5	—	0,5	—	—	—
	3	—	0,5	—	—	0,5	—	—
	4	—	0,5	—	—	—	0,5	—
	5	—	0,5	—	—	—	—	0,5

В штатив ставят несколько рядов стерильных пробирок. Число рядов соответствует числу испытуемых сывороток, а число пробирок в ряду — числу разведений вирусного антигена. Во все пробирки из ряда вносят по 0,5 см³ соответствующей сыворотки. Параллельно с этим ставят контрольный опыт с нормальной (известной отрицательной) и иммунной (известной положительной) сы-

воротками против инфекционного ларинготрахеита в этой же дозе. Затем во все пробирки с испытуемыми и контрольными сыворотками добавляют одинаковое количество ($0,5 \text{ см}^3$) соответствующих 10-кратных разведений вирусного антигена. Антиген можно разливать одной и той же пипеткой, если начать с самого большого разведения. Пробирки встряхивают энергично и оставляют при комнатной температуре в течение суток.

Каждым разведением инокулируют по 4—5 эмбрионов (или 4—5 пробирок культуры клеток) путем инокуляции на хориоаллантоисной оболочке или в хориоаллантоисную полость в количестве $0,2 \text{ см}^3$.

Эмбрионы инкубируют при температуре 37°C на протяжении суток, проводя овоскопию ежедневно не менее одного раза. Погибшие в первые 24 ч эмбрионы отбрасывают, а остальные вскрывают на 6 сут для выявления специфических изменений на поверхности хориоаллантоисной оболочки.

В реакции нейтрализации используются неразведенные сыворотки, так как могут возникнуть некоторые нежелательные различия между нейтрализационными индексами одной и той же сыворотки, использованной в разведенном и неразведенном состоянии. При недостаточном количестве сыворотки ее разводят до необходимого минимума (1:2, 1:3 и т. д.). В этом случае полученный индекс нейтрализации умножают на соответствующий фактор разведения (1:2, 1:3 и т. д.).

2.3.4. Обработка результатов

2.3.4.1. Эмбриональную инфекционную дозу 50% (или инфекционную дозу 50% в культурах тканей) вычисляют отдельно для каждой сыворотки на основании полученных результатов реакции нейтрализации. Индекс нейтрализации представляет разность между логарифмическими показателями титров вируса в присутствии нормальной (отрицательной) и иммунной (положительной) сывороток, подсчитанную по Риду и Менчу. Найденное по таблице антилогарифмов число будет являться индексом нейтрализации.

2.3.4.2. Вирусный изолят, который нейтрализуется положительной сывороткой против инфекционного ларинготрахеита с индексом выше 50, идентифицируют как вирус инфекционного ларинготрахеита.

Сыворотку с индексом нейтрализации 10 или меньше в реакции нейтрализации с известным штаммом вируса инфекционного ларинготрахеита считают отрицательной, сыворотку с индексом 11—49 — сомнительной, с индексом 50 и выше — положительной.

2.4. Метод флуоресцирующих антител

Сушность метода заключается в обнаружении вирусного антигена при помощи специфической иммунофлуоресцентной сыворот-

ки, в мазках из слизистой оболочки трахеи или конъюнктивы птиц в ранней острой фазе болезни, в хориоаллантоисной оболочке и инфицированных культурах клеток.

2.4.1. Аппаратура, реактивы и материалы

Для проведения исследования применяют:

микроскоп люминесцентный;

термостат;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

кюветы металлические;

натрий хлористый по ГОСТ 4233—77, 0,85%-ный раствор;

ацетон по ГОСТ 2603—79;

раствор фосфатно-буферный 0,01 М концентрации рН 7,2—7,4, содержащий 0,85% хлористого натрия;

масло иммерсионное нелюминесцирующее;

сыворотку флуоресцирующую.

2.4.2. Проведение исследования

Мазки-отпечатки, приготовленные на предметном стекле из пораженной хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона, слизистой трахеи, конъюнктивы больной птицы, а также культуры клеток, выращенной на стекле, подсушивают на воздухе, споласкивают физиологическим раствором и выдерживают в ацетоне при 4°C в течение 10 мин. Препараты укладывают на увлажненное дно кюветы и наносят на каждый препарат по 0,5 см³ рабочего разведения флуоресцирующей сыворотки.

В качестве контрольной используют для окрашивания препаратов нормальную флуоресцирующую сыворотку. Кювету закрывают крышкой и выдерживают 30 мин в термостате при 37°C. Окрашенные препараты промывают в течение 2 ч в проточной водопроводной воде.

Подсушенные препараты просматривают под люминесцентным микроскопом с иммерсионным объективом.

Результат оценивают в зависимости от степени свечения и числа флуоресцирующих клеток.

2.4.3. Обработка результатов

У больной птицы в период острого течения болезни в мазках наблюдается свечение антител.

Изменение № 1 ГОСТ 25582—83 Птица сельскохозяйственная. Методы лабораторной диагностики инфекционного ларинготрахеита

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 2.1.2. Заменить слова и значения: «изотоническом буферном» на «физиологическом», 3—12 ч на 1—2 ч;

дополнить словами: «Проводят контроль надосадочной жидкости на стерильность с использованием питательных сред мясопептонного бульона (МПБ), мясопептонного агара (МПА), мясопептонного печеночного бульона под вазелиновым маслом (МППБ), агара Сабуро».

(Продолжение см. с. 350)

(Продолжение изменения к ГОСТ 25582—83)

Пункт 2.1.3. Заменить значение: 8 сут на 6 сут.

Пункт 2.1.4.1. Исключить слова: «Гибель эмбрионов позднее указанных сроков или отставание эмбрионов в развитии по размерам и массе свидетельствует о заражении более мягкими штаммами вируса».

Пункт 2.1.4.3 изложить в новой редакции: «2.1.4.3. Выделение вируса подтверждают реакцией нейтрализации и биопробой».

Пункт 2.3.2.1. Заменить слова: «буферного изотонического» на «физиологического».

Пункт 2.3.3. Пятый абзац. Заменить слово: «суток» на 6 сут.

Пункты 2.4—2.4.3 исключить.

(ИУС № 6 1988 г.)
