



25754-83

+

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ  
С О Ю З А С С Р

# ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

ГОСТ 25754-83  
(СТ СЭВ 3453-81)

Издание официальное

Цена 3 коп.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ  
Москва



**GOST**  
СТ СЭВ

ГОСТ 25754-83, Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики классической чумы свиней  
Agricultural animals. Methods of laboratory diagnostics of classical pig-plague

**РАЗРАБОТАН** Министерством сельского хозяйства СССР

**ИСПОЛНИТЕЛИ**

Э. В. Ивановский, Н. К. Мищенко, 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 22 апреля 1983 г. № 2017

## ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

Методы лабораторной диагностики  
классической чумы свинейAgricultural animals, Methods of laboratory  
diagnostics of classical pig-plague

ОКСТУ 9809

ГОСТ  
25754—83

[СТ СЭВ 3453—81]

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 22 апреля  
1983 г. № 2017 срок действия установленс 01.07.84  
до 01.07.89

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт устанавливает методы лабораторной диагностики классической чумы свиней.

Стандарт применяют при диагностике заболеваний животных в лабораториях ветеринарных научно-исследовательских учреждений.

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 3453—81.

**1. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД**

Сущность метода заключается в обнаружении специфических патолого-гистологических изменений нервных тканей в специально подготовленных срезах.

**1.1. Метод отбора проб**

1.1.1. Для проведения исследования от павших или убитых свиней берут полушария большого мозга с частями коры, мозжечок, аммоновые рога, спинной мозг в различных участках ствола.

**1.2. Аппаратура, материалы и реактивы**

1.2.1. Для проведения исследования применяют:  
термостат с температурой нагрева 58 °С;  
микротом для приготовления срезов в парафине;  
гистокриотом;  
микроскоп биологический по ГОСТ 8284—78;  
пластинку нагревающую на 40 °С;

Издание официальное

Перепечатка воспрещена

© Издательство стандартов, 1983

парафин с точкой плавления от 56 до 58 °С по ГОСТ 23683—79;  
воск пчелиный по ГОСТ 21179—75;  
формалин по ГОСТ 1625—75;  
кальций хлористый по ГОСТ 4460—77;  
кадмий хлористый по ГОСТ 4330—76;  
спирт этиловый абсолютный;  
спирт этиловый 96 %-ный по ГОСТ 5962—67;  
бензол по ГОСТ 5955—75 или ксилол, или толуол по ГОСТ 5789—78;  
гематоксилин кристаллический;  
эозин;  
кислоту фосформолибденовую;  
бальзам канадский;  
воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

### 1.3. Подготовка к исследованию

1.3.1. Отобранные пробы фиксируют по Бейкеру. Для этого готовят раствор следующего состава:

хлористый кальций — 1 г;  
хлористый кадмий — 1 г;  
10 %-ный формальдегид или формалин — 10 см<sup>3</sup>;  
дистиллированная вода — 100 см<sup>3</sup>.

1.3.2. Фиксированные пробы обрабатывают путем подготовки срезов, включенных в парафин (см. обязательное приложение 1) или путем подготовки срезов при помощи гистокриотома.

1.3.3. Для окрашивания гистологических препаратов используют метод окрашивания гематоксилином (см. обязательное приложение 2).

### 1.4. Проведение исследования

1.4.1. Подготовленные и окрашенные срезы просматривают под микроскопом.

### 1.5. Обработка результатов

1.5.1. Гистологические изменения, выражающиеся в наличии воспаления, диапедезиальных кровоизлияний, васкулярного эндотелита, мукоидного фибриозного и гиалинового перерождения стенок сосудов, а также лимфоцитоплазматического энцефаломиелиита в первичной ткани, характерны при заболевании чумой.

## 2. МЕТОД ПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

Сущность метода заключается в соединении меченых антител (конъюгат) со специфическим антигеном и образовании комплекса «антитело-антиген», наблюдаемого в поле зрения люминисцентного микроскопа.

## 2.1. Метод отбора проб

2.1.1. Для проведения исследования берут миндалины, селезенку, почки, легкие, лимфатические узлы (мезентариальные и подчелюстные), красный костный мозг и кровь.

Пробы органов и тканей берут от павших животных не позднее 8 ч после гибели, от больных и подозреваемых в заболевании животных — сразу после убоя. Кровь берут от больных и подозреваемых в заболевании животных.

## 2.2. Аппаратура и реактивы

2.2.1. Для проведения исследования применяют:

микроскоп люминисцентный;

криотом;

термостат;

центрифугу с частотой вращения 5000 об/мин;

шприцы;

рефрижератор на минус 20 °С;

нож термозлектрический;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

стекла покровные по ГОСТ 6672—75;

ацетон по ГОСТ 2603—79;

глицерин по ГОСТ 6824—76;

раствор фосфатный буферный с рН 7,2; готовят следующим образом:

раствор А — в 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды разводят 11,871 г двузамещенного фосфата натрия;

раствор Б — в 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 9,076 г однозамещенного фосфата калия. Смешивают 800 см<sup>3</sup> раствора А и 250 см<sup>3</sup> раствора Б;

раствор фосфатный буферный с рН 8,0; готовят следующим образом:

смешивают приготовленные растворы А — 930 см<sup>3</sup> и Б — 70 см<sup>3</sup>. При приготовлении буферных растворов в каждом случае рН растворов проверяют потенциометром;

конъюгат флюоресцентный специфический;

конъюгат флюоресцентный нормальный;

краситель Эванса, 0,25 %-ный раствор в буферном растворе.

## 2.3. Подготовка к исследованию

2.3.1. Из проб органов при помощи криотома, микротома или термозлектрического ножа (при сильном замораживании) готовят срезы толщиной 5 мк, которые помещают на обезжиренные предметные стекла и высушивают в течение 30 мин при 4 °С.

Из проб костного мозга и лейкоцитарного концентрата готовят мазки (см. обязательное приложение 3).

2.3.2. Препараты (срезы и мазки) фиксируют ацетоном в течение 10 мин при минус 20 °С или в течение 5—10 мин при комнат-

ной температуре. После фиксации препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре до полного испарения ацетона.

Фиксированные препараты допускается хранить в морозильнике при температуре не менее минус 20 °С в течение 6 мес.

2.3.3. Фиксированные препараты двукратно промывают фосфатным буферным раствором (рН 7,2), после чего оставляют их в растворе на 10 мин.

Увлажненные препараты допускается хранить до использования во влажной камере при 4 °С в течение 3 дней.

2.3.4. Подготовленные препараты окрашивают методом контрастной иммунофлюоресценции.

Для этого готовят на фосфатном буферном растворе (рН 7,2) рабочие разведения специфического и нормального флюоресцентного конъюгата в соответствии с указаниями, нанесенными на этикетках препаратов. К полученным разведениям конъюгатов добавляют краситель Эванса в соотношении: 3 части конъюгата и 1 часть красителя.

Окрашивают следующие препараты:

три препарата, приготовленных из исследуемых проб; из них два препарата покрывают специфическим конъюгатом с красителем Эванса, а третий — нормальным конъюгатом с красителем Эванса (контроль);

два препарата, приготовленных из органов свиней, не инфицированных вирусом чумы, покрывают специфическим конъюгатом с красителем Эванса (контроль).

Окрашенные препараты выдерживают в термостате в течение 30 мин при 37 °С или в течение 12—18 ч при комнатной температуре.

Препараты двукратно промывают в фосфатном буферном растворе, после чего оставляют на 10 мин в свежей дистиллированной воде.

После частичного высушивания на воздухе препараты покрывают буферным глицерином (9 частей нефлюоресцирующего глицерина и 1 часть фосфатного буферного раствора с рН 8,0) и закрывают покровными стеклами.

При необходимости покровные стекла фиксируют парафином. Окрашенные препараты хранят при 4 °С в течение 3—4 недель без потери специфической флюоресценции.

## 2.4. Проведение исследования

2.4.1. Препараты просматривают под люминисцентным микроскопом.

## 2.5. Обработка результатов

2.5.1. Специфическая флюоресценция характеризуется желтовато-зеленоватым и зеленоватым оттенками свечения цитоплазмы разных клеток (в зависимости от оптики и системы освещения).

Ядра клеток выглядят темными и не флюоресцируют. Фон препаратов имеет флюоресценцию красно-оранжевого цвета.

В срезах из селезенки и лимфатических узлов флюоресцирующие клетки рассеяны или сконцентрированы вокруг сосудов и синуса.

В препаратах из миндалин флюоресценция более ясная и выявляется в базальных клетках поверхностного эпителия и эпителия крипт.

В срезах почек специфическая флюоресценция устанавливается главным образом в различных клетках почечных и интерасциальных поперечных срезов канальцев.

В мазках из красного костного мозга специфическая флюоресценция отличается большей яркостью, размером и количеством флюоресцирующих клеток.

Аналогичная флюоресценция выявляется в мазках из лейкоцитарного концентрата.

Специфическая флюоресценция в цитоплазме даже в отдельных клетках препаратов, полученных от животных, подозреваемых в заболевании, указывает на наличие вируса классической чумы свиней.

Все контрольные срезы и мазки не должны иметь желтовато-зеленоватой флюоресценции цитоплазмы.

### 3. МЕТОД ПОСТАНОВКИ БИОПРОБЫ

Сущность метода заключается в выявлении наличия вируса чумы свиней путем введения восприимчивому животному (свинье) суспензии, полученной из органов, взятых от больных или подозреваемых в заболевании животных.

#### 3.1. Метод отбора проб

3.1.1. Для постановки биопробы от больных, павших или убитых животных берут кровь, селезенку, лимфатические узлы, трубчатую длинную кость.

Кровь от животных для проведения биопробы берут с соблюдением правил асептики.

Если органы начали портиться, то проводят сечение трубчатой длинной кости и извлекают мозг, который используют для проведения исследования.

#### 3.2. Аппаратура, материалы и реактивы

3.2.1. Для проведения исследования применяют:

- центрифугу с частотой вращения 5000 об/мин;
- ножницы;
- скальпель;
- ступку или измельчитель ткани;
- шприц;

термометры ветеринарные;

антибиотики (пенициллин, стрептомицин или другие антибиотики с широким спектром действия);

мертиолат натрия (тиомерсал).

### 3.3. Подготовка к исследованию

3.3.1. Кусочки селезенки и лимфатические узлы измельчают при помощи ножниц. Измельченные пробы селезенки и лимфатических узлов или костного мозга растирают в ступке с малым количеством физиологического раствора, добавляют физиологический раствор до получения 10 %-ной суспензии. К полученной суспензии добавляют пенициллин и стрептомицин по 300—1000 ЕД/см<sup>3</sup>, тиомерсал в конечной концентрации 1:5000—1:10000 и выдерживают не менее 4 ч при 4 °С.

суспензию центрифугируют в течение 10 мин с частотой вращения 4000—5000 об/мин.

Надосадочную жидкость используют для проведения биопробы. Перед использованием из надосадочной жидкости делают посеvy на питательные среды.

### 3.4. Проведение исследования

3.4.1. Берут пять поросят в возрасте 2—3 мес, массой 20—30 кг, восприимчивых к чуме свиней. Трём животным вводят подкожно по 1 см<sup>3</sup> крови или по 2 см<sup>3</sup> суспензии органов. Двух поросят, не инокулированных исследуемым материалом, содержат отдельно для контроля.

Двум поросётам, иммунным к чуме свиней, вводят исследуемый материал в тех же дозах с целью дифференциальной диагностики в отношении африканской чумы свиней.

За подопытными животными ведут клиническое наблюдение в течение 21 сут с ежедневным измерением температуры тела.

### 3.5. Обработка результатов

3.5.1. Диагноз на классическую чуму свиней считают положительным:

если два из трех неиммунных поросят, которым был введен исследуемый материал, заболевают, проявляя клинические признаки болезни, и погибают;

если два иммунных поросенка, которым введен исследуемый материал, в период наблюдения остаются здоровыми или проявляют незначительные и кратковременные (1—4 дня) клинические признаки болезни слабой интенсивности (повышение температуры тела не выше 41 °С).

3.5.2. Заболевание иммунных животных указывает на то, что исследуемый материал содержит возбудителя другой инфекции.



## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Обязательное

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ БЛОКОВ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ,  
ВКЛЮЧЕННЫХ В ПАРАФИН**

Фиксированные и обработанные пробы выдерживают в 96%-ном этиловом спирте (три ванны), абсолютном спирте (три ванны) и амилловом спирте (три ванны). В каждой ванне кусочки выдерживают в течение 2 ч. Затем пробы выдерживают в трех парафино-восковых банях при 58°C по 2 ч в каждой.

Пробы вынимают из последней бани и включают в парафин в виде блоков специальной формы.

Сечения микротомом делают в виде ленты толщиной 5—7 мк.

При помощи игл фиксируют срезы в центре предметного стекла, предварительно смазанного слоем альбумина по Мейеру на нагревающей пластинке при 40°C. Альбумин по Мейеру готовят следующим образом: смешивают яичный белок и глицерин в соотношении 1:1.

Предметные стекла со срезами выдерживают в термостате при 37°C в течение 6—12 ч, после чего удаляют парафин, выдерживая в трех ваннах с растворителем в течение 10 мин в каждой.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Обязательное

**ОКРАШИВАНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ**

Стекла со срезами проводят через следующие ванны:

три ванны с 96%-ным этиловым спиртом — 5 мин;

две ванны с дистиллированной водой — 1—2 мин;

одна ванна с гематоксилином — 5—10 мин;

две ванны с водопроводной водой — 1—2 мин;

одна ванна с эином — 3—5 мин;

две ванны с дистиллированной водой — 1—2 мин;

одна ванна с 1%-ной формолмолибденовой кислотой — 3—5 мин;

одна-две ванны с дистиллированной водой для промывания;

две ванны с 96%-ным этиловым спиртом (дифференциация);

две ванны с растворителем (проявление — 10—30 мин).

Стекло со срезами накрывают покровным стеклом, которое фиксируют канадским бальзамом.

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ

1. Приготовление мазков из красного костного мозга  
Берут грудную кость, делают продольный разрез и вынимают красный костный мозг, из которого делают несколько мазков.

2. Приготовление мазков лейкоцитарного концентрата

От больных или подозреваемых в заболевании свиней собирают 15 см<sup>3</sup> крови в пробирку, содержащую антикоагулянт. Кровь в пробирке энергично встряхивают для отделения плазмы и выдерживают пробирку в течение 1 ч при комнатной температуре.

Пастеровской пипеткой отбирают плазму с лейкоцитами и переносят в центрифужную пробирку. Плазму центрифугируют в течение 10 мин с частотой вращения 1000 об/мин, сливают надосадочную жидкость, а из осадка беломолочного цвета делают 2—3 мазка.

---

Редактор *Н. Е. Шестакова*  
Технический редактор *О. Н. Никитина*  
Корректор *В. И. Варенцова*

Сдано в наб. 13.05.83 Подп. к печ. 15.06.83 0,625 в. л. 0,51 уч.-изд. л. Тир. 6000 Цена 3 коп.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, Новопресненский пер., 3  
Тиз. «Московский печатник», Москва, Ляля пер., 6. Зак. 545