



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ  
СОЮЗА ССР

**ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ,  
СИНАНТРОПНАЯ, ДИКАЯ  
И ЭКЗОТИЧЕСКАЯ**

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА**

**ГОСТ 25581—91**

**Издание официальное**

24 руб. БЗ 9—91/1009

**КОМИТЕТ СТАНДАРТИЗАЦИИ И МЕТРОЛОГИИ СССР**  
**Москва**

**ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ,  
СИНАНТРОПНАЯ, ДИКАЯ И ЭКЗОТИЧЕСКАЯ****Методы лабораторной диагностики гриппа**Birds, poultry, synanthropos, game and exotic.  
Methods of Avian Influenza laboratory diagnostics**ГОСТ  
25581—91**

ОКСТУ 9209

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на сельскохозяйственную, синантропную, дикую и экзотическую птицу и устанавливает методы лабораторной диагностики гриппа.

**1. ОТБОР ПРОБ**

1.1. Для проведения исследований отбирают пробы патологического материала:

головной мозг и селезенку или гортанные и клоакальные смывы от больной птицы в первые два дня заболевания или от птицы в агональном состоянии. Патологический материал помещают в термос со льдом или раствор глицерина с массовой долей 50 %, приготовленный на физиологическом растворе с рН 7,2—7,4;

сыворотку крови больной и переболевшей птицы в количестве 1—2 см<sup>3</sup> (не менее 20 проб).

1.2. Пробы крови для определения антител в сыворотке берут стерильно из подкрыльцовой вены в пробирки, увлажненные физиологическим раствором. Кровь выдерживают до образования сгустка при комнатной температуре или термостате при 37 °С в течение 1—2 ч, затем осторожно обводят иглой или пастеровской пипеткой по стенке пробирки и оставляют на 16—18 ч при температуре 2—4 °С. Образовавшуюся прозрачную без гемолиза сыворотку отсасывают пипеткой в стерильные пробирки.

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1992

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен без разрешения Госстандарта СССР

Для ретроспективной диагностики используют парные пробы сывороток крови, полученные от больных и подозреваемых в заболевании птиц в начале заболевания и через 4—10 сут.

1.3. Пробы патологического материала и сывороток крови доставляют в лабораторию в термосе со льдом. К пробам прилагают сопроводительный документ, содержащий сведения о клинике, эпизоотологии заболевания, а также данные о результатах вскрытия трупов.

1.4. До начала лабораторного исследования патологический материал хранят в холодильнике при температуре 2—4 °С не более 24 ч.

1.5. Сыворотку крови исследуют в течение 3 сут со дня взятия крови. В случае исследования сыворотки в более поздние сроки ее замораживают или консервируют путем добавления мертиолата натрия до концентрации 1 : 10000.

## 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИИ

### 2.1. Метод выделения вируса

Сущность метода заключается в выделении вируса на эмбрионах кур и последующей его идентификации.

#### 2.1.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Термостат с температурой нагрева 37—38 °С.

Центрифуга с частотой вращения 3000<sup>-1</sup>.

Центрифужные стаканы вместимостью 50—100 см<sup>3</sup>.

Весы лабораторные с погрешностью взвешивания не более 0,1 г.

Размельчитель тканей.

Овоскоп.

Колбы конические стеклянные вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770.

Пробирки стеклянные вместимостью 10, 15, 20 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336.

Пипетки пастеровские или пипетки стеклянные измерительные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 20292.

Ступка фарфоровая.

Шприцы с иглами.

Стекло кварцевое.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, раствор с массовой долей 0,8 % или другие дезинфицирующие средства.

Натрий лимонно-кислый 3-х замещенный по ГОСТ 22280, раствор с массовой долей 5 %.

Йод по ГОСТ 4159, раствор с массовой долей 5 % на физиологическом растворе.

Антибиотики — пенициллин и стрептомицин.

Среды питательные МПБ и МПА.

Парафин.

Развивающиеся эмбрионы кур 9—10-суточного возраста.

Эритроциты кур на физиологическом растворе, 0,7 и 1 %-ная взвесь, которую готовят следующим образом: кровь берут у пухов или кур в возрасте старше 6 мес из подкрыльцовой вены в колбу с физиологическим раствором в равных объемах с раствором лимонно-кислого натрия.

Полученную кровь трижды отмывают физиологическим раствором, осаждая эритроциты центрифугированием с частотой вращения  $1500^{-1}$  в течение 10 мин. Из осадка эритроцитов готовят 0,7 или 1 %-ную суспензию на физиологическом растворе и хранят не более 5 сут при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.1.2. Подготовка к исследованию.

##### 2.1.2.1. Обработка органов патологического материала

Патологический материал стерильно извлекают из глицеринового раствора, трехкратно ополаскивают стерильным физиологическим раствором и гомогенизируют с помощью измельчителя тканей или размельчают в ступке с кварцевым стеклом. Гомогенат разводят 1 : 10 стерильным физиологическим раствором и центрифугируют с частотой вращения  $1500\text{—}2000^{-1}$  в течение 15 мин. Надосадочную жидкость переносят в стерильные пробирки, добавляя 1000 ед/см<sup>3</sup> стрептомицина и выдерживают при комнатной температуре 60 мин.

#### 2.1.3. Проведение исследования

Для исследования одной пробы материала (надосадочная 10 %-ная суспензия) заражают не менее 10 эмбрионов. Перед заражением эмбрионы предварительно овоскопируют, отмечая границу пуги и участок между кровеносными сосудами для прокола скорлупы и инокуляции исследуемого материала. Скорлупу со стороны пуги и место прокола дезинфицируют раствором йода и фламбируют. В центре воздушного пространства и в месте введения исследуемого материала делают пробойником отверстие, затем через боковое отверстие вводят  $0,2\text{ см}^3$  исследуемого материала на глубину 2—3 мм в аллантаоисную полость. Одновременно делают его высевы по  $0,2\text{ см}^3$  на питательные среды МПБ и МПА, которые помещают в термостат при  $37\text{—}38^{\circ}\text{C}$ . Контролем служат 5 незараженных эмбрионов. После заражения эмбрионов отверстия в скорлупе заливают парафином. Зараженные и контрольные эмбрионы инкубируют в термостате в течение 24—96 ч при температуре  $37\text{—}38^{\circ}\text{C}$  и относительной влажности 60—70 %. В процессе инкубации эмбрионы овоскопируют два раза в сутки, погибшие — сохраняют в холодильнике при  $4^{\circ}\text{C}$ . Через 96 ч инкубации все эмбрионы вскрывают после предварительного охлаждения в холодильнике при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 10—12 ч.

Перед вскрытием эмбрионов скорлупу обрабатывают йодом и фламбируют и из каждого эмбриона отдельно собирают экстраэмбриональную жидкость в стерильные пробирки, которую высевают на МПБ и МПА и проверяют на гемагглютинирующую активность вируса в капельной реакции гемагглютинации (РГА). Реакцию ставят на стекле путем смешивания равных капель экстраэмбриональной жидкости с 1 %-ной взвесью эритроцитов кур. При отрицательной РГА образцы экстраэмбриональной жидкости в количестве 1—2 см<sup>3</sup> от каждого зараженного эмбриона (не менее 5 эмбрионов) объединяют и вновь заражают не менее 10 эмбрионов.

Выделение вируса проводят в течение 3-х пассажей на куриных эмбрионах, проверяя в каждом пассаже экстраэмбриональную жидкость на наличие гемагглютининов в капельной РГА. Если титры гемагглютининов низкие, проводят еще 2—3 дополнительных пассажа.

#### 2.1.4. Обработка результатов

Результат исследования пробы патологического материала считают отрицательным, если в трех дополнительных пассажах не будет обнаружено гемагглютинации эритроцитов.

При наличии гемагглютинации эритроцитов проводят идентификацию выделенного вируса.

### 2.2. Метод постановки реакции гемагглютинации

Сущность метода заключается в способности вируса гриппа птиц агглютинировать эритроциты кур.

#### 2.2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

2.2.1.1. Аппаратура, материалы и реактивы — по п. 2.1.1 и дополнительно:

микротитратор типа Такачи или аналогичный;

микропипетки;

панели из плексигласа.

#### 2.2.2. Проведение исследования

Готовят двукратные разведения вирусосодержащего материала (надосадочную жидкость, полученную после обработки патологического материала как указано в п. 2.1.2.1.) от 1 : 2 до 1 : 1024. Для этого в ряд лунок панелей из плексигласа наливают физиологический раствор в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. В первую лунку вносят 0,2 см<sup>3</sup> вируса, трехкратно пипетируют и переносят 0,2 см<sup>3</sup> во вторую лунку и т. д. до требуемого разведения. Из последней лунки 0,2 см<sup>3</sup> удаляют в дезинфицирующий раствор. В каждую лунку добавляют по 0,2 см<sup>3</sup> 1 %-ной суспензии куриных эритроцитов. Панели встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин.

Контролем служат две лунки с эритроцитами и физиологическим раствором в равных объемах по 0,2 см<sup>3</sup> каждого. Реакцию гемагглютинации и реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) ставят также с использованием микротитраторов или микропипе-

ток в объеме 0,025 см<sup>3</sup> в плексигласовых панелях с лунками с 0,7 %-ной суспензией эритроцитов.

### 2.2.3. Обработка результатов

Наличие на дне и стенках лунок осадка эритроцитов в виде опрокинутого «зонтика» свидетельствует о положительной РГА. При отрицательной реакции в опыте и контроле эритроциты образуют на дне лунки диск с ровными краями.

Титром вируса считают предельное разведение его, при котором наблюдается полная агглютинация эритроцитов, что соответствует одной агглютинирующей единице (1 АЕ).

### 2.3. Метод идентификации вируса

Сущность метода заключается в способности специфических антител нейтрализовать гемагглютинирующую активность вируса в реакции торможения гемагглютинации со специфическими гриппозными сыворотками.

#### 2.3.1. Аппаратура, материалы и реактивы

2.3.1.1. Аппаратура, материалы и реактивы — по п. 2.2.1 и дополнительно:

набор сухих инактивированных антигенов вируса гриппа тринадцати серологических вариантов и гипериммунных сывороток для диагностики гриппа птиц;

аппарат Киппа;

баня водяная;

мел или мрамор;

кислота соляная по ГОСТ 3118 с массовой долей 30 %.

#### 2.3.2. Проведение исследования

После определения титра исследуемого вируса в количественной РГА по п. 2.2.1 ставят РТГА. Вначале устанавливают рабочую дозу вируса (4 АЕ), для чего вирус разводят физиологическим раствором во столько раз, сколько получится от деления на 4 обратного значения гемагглютинирующего титра вируса. Например: если титр вируса 1 : 256, то рабочее разведение будет  $256 : 4 = 64$ , т. е. в 0,2 см<sup>3</sup> разведенного 1 : 64 вируса будет содержаться 4 АЕ. Для его приготовления в данном примере берут 63 см<sup>3</sup> физиологического раствора и 1 см<sup>3</sup> исходного вируса.

Перед постановкой основного опыта проверяют правильность выбора 4 АЕ. Для этого на панели в четыре лунки наливают по 0,2 см<sup>3</sup> физиологического раствора, затем в первую лунку добавляют 0,2 см<sup>3</sup> 4 АЕ вируса и после пипетирования 0,2 см<sup>3</sup> переносят во вторую лунку, затем в третью и т. д. Из четвертой лунки 0,2 см<sup>3</sup> разведенного вируса удаляют в дезинфицирующий раствор. Таким образом, в первой лунке должно быть 2 АЕ, во второй — 1 АЕ, в третьей — 0,5 АЕ, в четвертой — 0,25 АЕ. После этого в каждую лунку добавляют по 0,2 см<sup>3</sup> 1 %-ной суспензии эритроцитов. Панель встряхивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. При правильном определении рабочей дозы (4 АЕ) в пер-

вой и второй лунках должна быть полная агглютинация, в третьей — частичная агглютинация, в четвертой — четко выраженный диск («пуговица») осевших эритроцитов.

Если в третьей лунке оказывается полная агглютинация, то это означает, что выбранная доза вируса содержит не 4 АЕ, а больше. В этом случае доза должна быть уменьшена. И наоборот, отсутствие агглютинации во второй и частично в третьей лунках свидетельствует о недостаточности вируса. Увеличивают или уменьшают рабочую дозу, добавляя соответственно вирус или физиологический раствор и затем повторно проверяют правильность выбора 4 АЕ.

2.3.3. Для постановки основного опыта в ряд лунок, начиная со второй, наливают по 0,2 см<sup>3</sup> физиологического раствора. Затем в первую и вторую лунки добавляют по 0,2 см<sup>3</sup> специфической сыворотки. Во второй лунке смесь пипетируют и переносят 0,2 см<sup>3</sup> в третью лунку и т. д. до требуемого разведения. После этого во все лунки вносят по 0,2 см<sup>3</sup> рабочего разведения вируса (4 АЕ). Панели встряхивают и после 30-минутного контакта сыворотки с вирусом в каждую лунку добавляют по 0,4 см<sup>3</sup> 1 %-ной суспензии эритроцитов.

Для точности учета РТГА ставят контроль:

сыворотки (0,2 см<sup>3</sup> сыворотки + 0,2 см<sup>3</sup> физиологического раствора и 0,4 см<sup>3</sup> 1 %-ной суспензии эритроцитов);

эритроцитов на спонтанную агглютинацию (0,2 см<sup>3</sup> физиологического раствора ± 0,2 см<sup>3</sup> 1 %-ной суспензии эритроцитов).

#### 2.3.4. *Обработка результатов*

РТГА считают положительной, а идентификацию вируса завершённой, если специфическая сыворотка тормозит гемагглютинирующую активность вируса не менее 1/4—1/8 титра, указанного на этикетке ампулы (флакона).

#### 2.4. **Метод выявления специфических антител**

Сущность метода заключается в обнаружении специфической способности антител сыворотки крови больных и переболевших птиц подавлять гемагглютинирующую активность вируса в РТГА. С этой целью исследуют в РТГА с диагностическими антигенами вируса гриппа не менее 20 проб сыворотки крови от каждой исследуемой партии птиц.

##### 2.4.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Аппаратура, материалы и реактивы — по пп. 2.1.1, 2.3.1 и дополнительно:

глицерин,  
лед сухой.

##### 2.4.2. *Подготовка к исследованию*

Исследуемые сыворотки предварительно разводят в соотношении 1 : 5 дистиллированной водой. Для удаления термолабильных ингибиторов сыворотки прогревают в водяной бане при 60 °С в

течение 30 мин. В ампулы (флаконы) с антигенами добавляют физиологический раствор (рН 7,2—7,4) согласно «Наставлению по применению набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц».

#### 2.4.3. Проведение исследования

Вначале готовят двухкратное разведение сыворотки на физиологическом растворе, начиная с разведения 1:5. Далее ставят РТГА, как указано в п. 2.3.

При обнаружении в сыворотке крови титров антител 1:10 и выше, ее освобождают от неспецифических термостабильных ингибиторов с целью подтверждения наличия специфических антител к вирусу гриппа. Для удаления термостабильных ингибиторов через разведенную и прогретую сыворотку крови пропускают углекислый газ из аппарата Киппа или добавляют кусочки сухого льда. Обработку сыворотки ведут в течение 2—3 мин. Образовавшийся осадок удаляют центрифугированием в течение 10 мин с частотой вращения 1500<sup>-1</sup>. Надосадочную жидкость исследуют в РТГА.

#### 2.4.4. Обработка результатов

Титром антител в сыворотке считают ее последнее разведение, давшее полную задержку гемагглютинации с исследуемым антигеном.

Выявление титра антител 1:10 и выше, но не менее, чем в 30 % исследованной сыворотки является основанием для постановки диагноза, который должен быть подтвержден положительным результатом вирусологических исследований.

### 2.5. Метод ретроспективной диагностики

Сущность метода заключается в обнаружении достоверного прироста уровня специфических антител, обусловленного естественным развитием гриппозной инфекции в организме зараженных птиц.

#### 2.5.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы — по п. 2.2.1.1.

#### 2.5.2. Проведение исследований

Исследуют парные сыворотки, полученные в первые 1—2 сут в начале заболевания и через 4—10 сут после первого взятия крови. Сыворотку крови освобождают от ингибиторов как указано в п. 2.4 РТГА ставят с выделенным вирусом или с антигенами диагностического набора по пп. 2.3 и 2.4 с учетом эпизоотической обстановки по циркуляции того или иного серологического варианта вируса гриппа.

#### 2.5.3. Обработка результатов

Четырехкратное и более увеличение титров антител в парных сыворотках является основанием для установления положительного диагноза.



## ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

**1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** Московской ветеринарной академией им. К. И. Скрябина и Всесоюзным государственным научно-контрольным институтом ветеринарных препаратов

### РАЗРАБОТЧИКИ

**Н. Г. Осидзе**, д-р биол. наук; **В. И. Смоленский**, канд. вет. наук

**2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 30.09.91 № 1575

**3. Срок проверки — 1996 г., периодичность проверок — 5 лет**

**4. ВЗАМЕН ГОСТ 25581—83**

**5. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 1770—74	2.1.1
ГОСТ 3118—77	2.3.1.1
ГОСТ 4159—79	2.1.1
ГОСТ 4233—77	2.1.1
ГОСТ 20292—74	2.1.1
ГОСТ 22280—76	2.1.1
ГОСТ 25336—82	2.1.1

Редактор *В. М. Лысенкина*  
Технический редактор *Г. А. Теребинкина*  
Корректор *О. Я. Чернецова*

Сдано в наб. 16.10.91 Подп. в печ. 27.01.92 Усл. п. л. 0,625 Усл. кр.-отт. 0,63 Уч. изд. л. 0,54  
Тир. 383.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, ГСП,  
Новопресненский пер., 3

Калужская типография стандартов, ул. Московская, 256. Зяк. 1948