

ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ

Методы лабораторной диагностики
болезни МарекаAgricultural poultry.
Methods of laboratory diagnostics
of Marek diseaseГОСТ
25586—83

[СТ СЭВ 2700—80]

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 12 января 1983 г. № 96 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 болезни Марека.

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

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 2700—80.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для патологоанатомических исследований отбирают тушки павшей или убитой птицы.

1.2. Для гистологических исследований от каждой павшей и убитой птицы отбирают пробы нервов Plexus brachialis и Truncus ischiadicus; пробы из органов с выраженными опухолевыми изменениями (печени, почек, яичника, железистого желудка, сердца, легких, поджелудочной железы).

Пробы должны быть не более $1 \times 2 \times 2$ см. Отобранные пробы фиксируют в 10%-ном нейтральном растворе формалина и консервируют в герметически закрытых стеклянных или пластмассовых бутылках или упаковывают в фиксированном влажном виде без жидкости в запаянных пластмассовых пакетах.

1.3. Для выделения вируса отбирают почки, селезенку и кровь от подозреваемых в заболевании и больных кур.

1.4. Для проведения серологических исследований пробы крови птиц в количестве 7—10 см³ берут стерильно из подкрыльцовой вены в пробирки, увлажненные физиологическим раствором. Кровь

выдерживают при комнатной температуре до образования сгустка, затем осторожно обводят иглой или пастеровской пипеткой и оставляют на 2—3 ч, образовавшуюся сыворотку отсасывают пипеткой в стерильные пробирки.

1.5. Пробы упаковывают в коробку, запечатывают и доставляют в лабораторию.

В сопроводительном документе указывают время гибели или убоя птицы, ее возраст, а также эпизоотическую обстановку в хозяйстве.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Патологоанатомический метод

Сущность метода заключается в обнаружении специфических для болезни Марека (БМ) патологоанатомических изменений и их дифференциации от лимфоидного лейкоза (ЛЛ).

2.1.1. Проведение исследования

После подготовки проводят наружный осмотр тушки, отмечая поражения кожи. Затем кожу снимают и оценивают состояние скелетной мускулатуры (шеи, грудной мышцы, брюшка, поверхностей бедра). После этого птицу вскрывают и проводят оценку органов брюшной полости, включая фабрициеву бурсу, а также оценку основных стволов нервов в следующем порядке:

в области шеи — N. vagus и N. cervicalis, блуждающего нерва, проходящего в брыжейке между печенью и железистым желудком; Pl. coeliacus, расположенного в области A. coeliaca каудальной ветви N. intestinalis, а также Pl. ischiadicus, Pl. brachialis и Pl. lumbales.

2.1.2. Обработка результатов

Болезнь Марека диагностируют при обнаружении: изменений нервов в виде утолщений, утраты поперечной полосатости или узлового опухолевидного увеличения в объеме;

изменений глаз в виде деформации зрачка с изменением цвета радужной оболочки или без изменения ее (чаще всего при классической форме);

изменений кожи в виде множественных до величины с горошину опухолевидно утолщенных фолликулов перьев, а также диффузно опухолевидных утолщений кожи, частично с некрозами;

опухолей в органах в виде мелких множественных очажков, диффузного набухания или опухолевых узлов у птиц в возрасте 5—6 месяцев;

опухолей в сочетании с изменениями нервов, глаз или опухолевидными изменениями кожи.

При наличии опухолей в органах птиц старше 5—6-месячного возраста, не имеющих изменений нервов, глаз или кожи, болезнь Марека дифференцируют от лимфоидного лейкоза на основании:

различий в средней частоте появления опухолей в разных органах при заболевании болезнью Марека и лимфоидным лейкозом в соответствии с табл. 1;

Таблица 1

Наименование органа	Болезнь Марека*	Лимфоидный лейкоз
Фабрициева бурса	+	+++++
Печень	+++++	+++++
Селезенка	+++++	+++++
Почки	+++++	+++++
Яичник	+++++	+++++
Сердце	+++++	+
Легкие	+++++	+
Железистый желудок	+++++	+
Поджелудочная железа	++++	++
Брыжейка	++++	++
Зобная железа	++	++
Скелетная мускулатура	++	+
Кожа	+(+++)**	

Примечание. Принятые обозначения:

- ++++ опухоли обнаруживаются у 50% птиц и более;
 +++ опухоли обнаруживаются у 15 до 50% птиц;
 ++ опухоли обнаруживаются у 5 до 15% птиц;
 + опухоли обнаруживаются менее чем у 5% птиц.

* Частота поражения органов может изменяться в зависимости от тяжести патологического процесса и проявления ассоциированной формы болезни Марека.

** Для бройлеров.

различий в патологоанатомической картине изменений органов при болезни Марека и лимфоидном лейкозе и наличия опухолей в фабрициевой бурсе при лимфоидном лейкозе в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Наименование органа	Болезнь Марека	Лимфоидный лейкоз
Печень	Очень незначительное до среднего увеличения с мелкими очагово-диссеминированными опухолями, часто нечетко ограниченными, размером от булавочной головки до размера чечевицы (равномерная гра-	Очень часто сильное до чрезвычайно выраженного увеличение с мелко-очагово-диссеминированными изменениями в виде чаще всего четко ограниченных и густо рассеянных опухолевых узелков, размером

Наименование органа	Болезнь Марек	Лимфоидный лейкоз
	нитоподобная крапчатость) или неравномерные диффузно-инфильтрующие изменения в виде рисунка географической карты или (очень редко) увеличенных опухолевых узлов	преимущественно с булавочную головку до размера перчинки (равномерно и густо мелкозернистая поверхность разреза) или равномерно диффузно-инфильтрующие изменения в виде равномерного чрезвычайно сильного набухания и осветления или опухолевых узлов
Селезенка	Чаще всего диффузное набухание с нечеткой структурой поверхности разреза и (или) опухолевые узелки	Набухание или множественные однообразные мелкие опухолевые узелки (сходные с узелками в печени)
Яичник	Относительно крепкие плотные опухоли	Относительно мягкие изрезанные опухоли
Брыжейка	Неравномерные диффузные до толстокожих изменения (в виде спайки) или опухолевые узелки различной величины	Множественные мелкие опухолевые узелки (сходные с узелками в печени) или мягкие мелкоузелковые до диффузных изменений
Железистый желудок	Часто изменения в виде опухолевого набухания фолликулов, желез, а также узелковые или диффузные опухолевидные изменения слизистой оболочки или по всей стенке, часто с изъязвлениями	Очень редко изменения в виде незначительных до умеренно сильных опухолевидных набуханий, прежде всего у перехода слизистой оболочки пищевода к слизистой оболочке железистого желудка
Фабрициева бурса	Очень часто атрофия. Редко умеренное утолщение складок. Очень редко большая опухоль	У птиц в стадии развитой фабрициевой бursy очень часто: опухолевые узелки в складках и (или) в стенке; неравномерное диффузное опухолевидное утолщение складок; превращение фабрициевой бursy в солидную опухоль. У птиц в стадии обратного развития фабрициевой бursy очень часто вместо фабрициевой бursy опухоль величиной с чечевичку до размера гусиного яйца

При лимфоидном лейкозе в отличие от болезни Марек в среднем до 60% случаев фабрициева бурса преимущественно поражается опухолевидными изменениями. Поэтому в практике диагностики при наличии опухолей фабрициевой бursy у птиц, начиная

с 6-месячного возраста, можно предварительно ставить диагноз — лимфоидный лейкоз.

Дифференциальную диагностику болезни Марек и лимфоидного лейкоза на основании данных патологоанатомических исследований с учетом возраста проводят в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Патологоанатомические изменения	Диагноз
Изменение нервов или глаз	Болезнь Марек
Изменения кожи (узелковидно, опухолевидно утолщенные фолликулы перьев)	Болезнь Марек
Опухоли в органах в сочетании с изменениями нервов, глаз или кожи	Болезнь Марек
Опухоли фабрициевой бursы с опухолями или без опухолей в других органах:	
начиная с 5—6-месячного возраста	Лимфоидный лейкоз
в возрасте до 5—6 месяцев жизни	Болезнь Марек
Опухоли в органах без опухолей фабрициевой бursы:	
в возрасте до 5—6 месяцев жизни	Болезнь Марек
начиная с 5—6-месячного возраста с изменениями согласно табл. 1 и 2, графа «Болезнь Марек»	Болезнь Марек
изменения согласно табл. 1 и 2, графа «Лимфоидный лейкоз»	Лимфоидный лейкоз

2.2. Гистологический метод

Сущность метода заключается в обнаружении специфических для болезни Марек патологистологических изменений и их дифференциации от изменений при лимфоидном лейкозе.

2.2.1. Аппаратура, материалы, реактивы и растворы

Для проведения исследования применяют:

микротом замораживающий или парафиновый;
микроскоп;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

стекла покровные по ГОСТ 6672—75;

парафин с точкой плавления 58°C по ГОСТ 23683—79;

спирт этиловый или абсолютный по ГОСТ 5962—67;

метилбензоат;

бензол по ГОСТ 5955—75;

гематоксилин;

эозин;

спирт этиловый ректифицированный по ГОСТ 5962—67 или опал,

70%-ный раствор с 1%-ной соляной кислотой по ГОСТ 857—78;

ксилол по ГОСТ 9949—76;
ацетон по ГОСТ 2603—79;
карбол-ксилол;
бальзам для заливки по ГОСТ 2290—76.

2.2.2. Подготовка к исследованию

Из проб органов, фиксированных в формалине, готовят замороженные или парафиновые срезы, которые окрашивают гематоксилин-эозином или другими красителями и просматривают под микроскопом.

2.2.3. Обработка результатов

Результаты гистологических исследований оценивают в соответствии с табл. 4.

Таблица 4

Сравнительные гистологические данные	Болезнь Марка	Лимфоидный лейкоз
Гистоцитологические данные в результате опухолевидных изменений	Преобладающие гетероморфные инфильтраты и пролифераты из лимфоцитов, пролимфоцитов, лимфобластов и ретикулярных клеток, иногда с примесью фибробластов, гистиоцитов, плазматических клеток. Редко мономорфные пролифераты, состоящие из клеток типа лимфоидного ряда	Мономорфные пролифераты из лимфобластов
Гистологические данные ранних изменений:		
нервов	Отеки, околососудистые диффузные лимфоидные пролифераты	Нет изменений
фабрициевой бursы	Межфолликулярные пролифераты и (или) дегенерация фолликулов с образованием кист	Внутрифолликулярные пролифераты из лимфобластов со стертой внутренней структурой фолликулов
селезенки	Неравномерные, часто околоартериальные очаги пролиферации	Внутрифолликулярные пролифераты из лимфобластов
печени, почек и других органов	Чаще всего неравномерные очаги пролиферации, образующиеся сначала вокруг сосудов	Фолликулоподобные очаги пролиферации из лимфобластов

2.3. Метод выделения вируса

Сущность метода заключается в выделении вируса из ткани почек больной или подозреваемой в заражении птицы и последующей идентификации его серологическим методом.

2.3.1. Аппаратура и материалы

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

мешалку магнитную;

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

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

колбы конические стеклянные вместимостью 50 и 100 см³ по ГОСТ 1770—74;

флаконы для культуры клеток вместимостью 50, 100, 200 и 500 см³ из нейтрального стекла;

раствор Хенкса;

трипсин, 0,25%-ный раствор;

среду № 199;

сыворотку телячью эмбриональную.

2.3.2. Проведение исследования

Из ткани почек только что убитой больной птицы вырезают кусочки размером 2—3 см³, которые отмывают раствором Хенкса и добавляют 0,25%-ный раствор трипсина в соотношении 1:10. Суспензию перемешивают на магнитной мешалке в течение 20—30 мин при комнатной температуре.

Клеточную суспензию затем фильтруют через два слоя марли и центрифугируют в течение 10—15 мин с частотой вращения 1000 об/мин, готовят суспензию клеток в среде роста, содержащей в 1 см³ 800 тыс. клеток, высевают ее во флаконы и инкубируют при температуре 37°C.

2.3.3. Обработка результатов

При наличии вируса проявляется цитопатическое действие (ЦПД) в виде образования очагов (фокусов), состоящих из скопления округленных рефрактивных клеток (спустя 48—72 ч), синцития и микроскопически видимых бляшек — негативных пятен (спустя 90—120 ч). Сроки появления ЦПД зависят от дозы вируса и количества проводимых пассажей. При первичном культивировании возбудителя специфические морфологические изменения клеток проявляются часто лишь во втором и третьем пассажах вирусосодержащего материала спустя 48—96 ч. Специфичность ЦПД подтверждают исследованием отдельных проб материала в реакции преципитации в агаровом геле с иммунной сывороткой.

2.4. Серологический метод

Сущность метода заключается в обнаружении антител к вирусу болезни Марека или антигена этого вируса в реакции преципитации в агаровом геле.

2.4.1. Аппаратура, реактивы и материалы

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

чашки Петри по ГОСТ 25336—82;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

натрия хлорид по ГОСТ 4233—77, 0,87%-ный раствор (физиологический раствор) с pH 7,2—7,4;

гель 1%-ного агара; готовят следующим образом: берут 10 г высококачественного очищенного агара, 80 г хлорида натрия и доводят дистиллированной водой до 1000 см³. Смесь автоклавируют при 1 атм в течение 30 мин, фильтруют через два слоя марли и доводят pH смеси при помощи 10%-ного раствора гидроокиси натрия до 7,2—7,4. Среду консервируют мертиолатом (0,01% к общему объему), разливают в колбы или стеклянные бутылки по 50 или 100 см³, охлаждают и хранят при температуре 2—4°C. В этих условиях среду хранят до 14 суток;

специфический тест-антиген вируса болезни Марека с титром от 1:8 до 1:16;

специфическую преципитирующую тест-сыворотку к вирусу болезни Марека (например, от спонтанно заболевшей птицы) с титром от 1:8 до 1:16;

контрольный антиген отрицательный;

контрольную сыворотку отрицательную;

среду для выращивания клеток;

среду поддерживающую.

2.4.2. Подготовка к исследованию

Для исследования в реакции преципитации в агаровом геле из эпителий фолликулов перьев готовят суспензию следующим образом: с наружной поверхности бедра и крыльев убитой птицы выщипывают по 10—15 перьев. Образовательная ткань внутри фолликулов перьев обязательно должна быть сохранена. Фолликулы перьев с эпителиальными клетками используют для получения суспензии и из них готовят экстракт для серологического исследования (индикация антигена). Очины перьев измельчают на кусочки, которые затем растирают в гомогенизаторе или в ступке со стерильным песком или замораживают в жидком азоте. Затем их заливают физиологическим раствором в соотношении 1:10 и экстрагируют в течение 24 ч при 4°C. Надосадочную жидкость экстракта исследуют в реакции преципитации.

2.4.3. Проведение исследования

Для постановки реакции преципитации агаровую среду расплавляют при температуре 60—65°C, разливают в чашки Петри или наносят на предметные стекла, чтобы толщина слоя агара была не менее 2 мм.

В агаровой пластинке делают шесть лунок в виде шестиугольника и одну лунку в центре. Шесть лунок диаметром 4 мм должны располагаться по окружности на расстоянии 2 мм друг от друга и от края центральной лунки.

Во избежание подтекания антигена и сыворотки под агаром лунок осторожно расплавляют или в каждую лунку вносят небольшое количество расплавленного агара. В двухслойном агаре лунки пробивают только в верхнем слое.

Для выявления специфических антител в сыворотке крови в центральную лунку вносят специфический вирусный антиген, а в периферические лунки — испытуемые сыворотки. Специфический антиген готовят из перьевых фолликулов птиц, экспериментально инфицированных вирусом болезни Марека.

Контролями служат:

специфический вирусный антиген + специфическая сыворотка;

специфический вирусный антиген + контрольная сыворотка (отрицательная);

специфический вирусный антиген + физиологический раствор.

Для выявления вирусного антигена в центральную лунку вносят специфическую сыворотку, а в периферические лунки испытуемый материал. При этом необходимо использовать экстракт из перьев фолликулов спонтанно заболевшей птицы или клеточную культуру, зараженную вирусом.

Контролями служат:

специфическая сыворотка + специфический вирусный антиген;

специфическая сыворотка + контрольный антиген (отрицательный).

После заполнения лунок компонентами закрытые чашки или предметные стекла помещают во влажную камеру или термостат при температуре 37°C.

Результаты учитывают через 24 и 48 ч. Конечный учет проводят через 72 ч.

2.4.4. Обработка результатов

Реакцию на чашках Петри и предметных стеклах учитывают в косонаправленном пучке света на темном фоне. Сначала регистрируют контрольные линии преципитации, которые должны появляться между лунками со специфическим антигеном и специфической сывороткой. Пробы с линиями преципитации считают положительными.

Реакцию считают положительной при образовании линий преципитации между лунками с испытуемым материалом и специфическим антигеном или сывороткой при условии отсутствия линий преципитации с отрицательными антигенами и сывороткой.

Изменение № 1 ГОСТ 25586—83 Птица сельскохозяйственная. Методы лабораторной диагностики болезни Марекса

Утверждено и введено в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 17.03.88 № 597

Дата введения 01.07.88

Под наименованием стандарта проставить код: ОКСТУ 9809.
По всему тексту стандарта заменить единицу: об/мин на мин⁻¹.
Пункты 1.3, 2.3—2.3.3 исключить.

(ИУС № 6 1988 г.)
