14.01.97 г\_\_ № \_\_13-4-2/819\_\_\_\_
ИНСТРУКЦИЯ
О мероприятиях по борьбе
со случной болезнью одно-
копытных

 1. Общие положения.

Случная болезнь (дурина) инвазионная болезнь лошадей, ослов, мулов, вызывае-мая Trypanosoma equiperdum протекает преимущественно хронически.
1.2. Заражение животных происходит, в основном, половым путем, при искусствен-ном осеменении спермой, содержащей возбудителя, а также механическим - через предметы ухода, руки, различные инструменты (влагалищное зеркало, мочевой катетер, искусственная вагина.).
Заболевание животных случной болезнью наблюдают в любое время года. 1.3.Бо-лезнь характеризуется длительным (3-24 нед) инкубационным периодом, появле-нием отеков половых органов, вымени, живота (отечный брус), язв, депигмента-цией кожи, бляшек, парезов, параличей губ, ушей и расстройством координации движения. При патологоанатомическом исследовании отмечают истощение, де-генеративные изменения в мышцах сердца, крупа и задних конечностей.
1.4 Диагноз на случную болезнь однокопытных устанавливают на основании эпи-зоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатов ла-бораторных исследований (микроскопического, серологического).
1.5 В лабораторию для исследования на случную болезнь направляют соскобы с примесью крови из различных мест слизистой оболочки влагалища, мочеиспуска-тельного канала, сперму, экссудат из надрезов отеков и бляшек.
Соскобы из различных мест слизистой оболочки уретры берут с помощью урет-ральной ложки. Для этого жеребца фиксируют и вводят внутримышечно в область крупа рометар в дозе 7,5 см3 на 100 кг массы тела. Через 7-10 мин вводят урет-ральную ложку на глубину 5-6 см и делают 3-4 возвратно-поступательных движе-ния по стенке уретры. После чего уретральную ложку осторожно извлекают, опускают материал в пробирку с 2 см3 физиологического раствора рН 7,0-7,2 и закрывают пробкой.
Сперму от жеребцов получают на искусственную вагину в хозяйстве, переливают в стерильные пробирки (флаконы) по 2см3 и закрывают пробками.
Соскобы со стенок влагалища берут уретральной ложкой через влагалищное зер-кало. Материал опускают в пробирку с 2 см3 физиологического раствора рН 7,0-7,2 и закрывают пробкой.
Экссудат из надрезов отеков и бляшек собирают шприцем, переносят в пробирку и закрывают пробкой.
1.6 Для серологического исследования направляют 1-2 см3 сыворотки крови, на-тивной или консервированной 5 %-ным раствором фенола (1 капля на 1см3 сыво-ротки) или сухой борной кислотой (2-4% к объему).
1.7 Отобранный патологический материал в пробирках, доставляют в лаборато-рию в термосе со льдом не позднее 4-х часов, сыворотку крови - не позднее 2 дней с момента взятия.
1.8 Исследования биологического материала проводят согласно действующим ме-тодическим указаниям по лабораторным исследованиям на трипаносомозы лоша-дей, верблюдов, ослов, мулов и собак.

1.9 Результаты обследования лошадей.

1.9.1 Больными считают животных при наличии одного из следующих показате-лей:
обнаружение трипаносом в мазках из исходного материала,
обнаружение характерных для случной болезни клинических признаков (бляшки, парезы, параличи губ, ушей, зада, характерная депигментация, отеки половых губ и др) при отрицательных результатах микроскопического и серологического ис-следований; получение положительного серологического исследования; получе-ние дважды сомнительного серологического исследования.
1.9.2 Подозрительными по заболеванию считаются лошади:
имеющие неясные клинические признаки при отрицательных результатах сероло-гических исследований,
бывшие в случке с больными;
давшие в РСК один раз сомнительный результат при трехкратном исследовании. 1.9.3 Повторно на случную болезнь лошадей исследуют серологическим методом через 30 дн.

 2. Мероприятия по предупреждению заболевания лошадей случной болезнью

2.1 В целях профилактики случной болезни необходимо:
- комплектовать коневодческие хозяйства (фермы) лошадьми из благополучных хозяйств-поставщиков;
- не допускать к случке племенных жеребцов с кобылами (конематками), не про-веренными на случную болезнь в РСК;
- перед случкой клинически и серологически обследовать на случную болезнь племенных и пользовательных взрослых однокопытных животных дважды с ин-тервалом 30 дней;
2.2  Животных, вновь поступивших из других хозяйств, содержат изолированно не менее 30 дней, подвергают тщательному клиническому осмотру, микроскопи-ческому и серологическому исследованиям.
2.3 В случае выявления среди завезенных животных больных, положительно и сомнительно реагирующих в РСК, всю партию лошадей убивают.
2.4 На случных пунктах обслуживающий персонал при искусственном осемене-нии животных должен использовать одноразовые полиэтиленовые перчатки и пи-петки. Инструменты, применяемые для отбора материала, дезинфицируют путем кипячения в течение 10-15 мин. Подставных кобыл (на которых получают спер-му) в обязательном порядке обследуют на случную болезнь клинически и сероло-гически.
2.5 Для получения спермы за каждым жеребцом закрепляют отдельную искусст-венную вагину.
2.6 Ректальное исследование кобыл проводят в перчатках разового применения.

 3. Мероприятия, проводимые в неблагополучном хозяйстве.

3.1 При установлении диагноза хозяйство (ферму) объявляют неблагополучным по случной болезни и в нем решением администраций района вводят ограниче-ния. При этом запрещают ввод в хозяйство и вывод из него лошадей, ослов, мулов для племенных и пользовательных целей, а также перегруппировку их внутри хо-зяйства.
3.2 Взрослое поголовье лошадей, ослов и их гибридов неблагополучного хозяйст-ва подвергают клиническому, микроскопическому и серологическому исследова-ниям. Больных, положительно и дважды сомнительно реагирующих в РСК, жи-вотных убивают, а подозрительных по заболеванию случной болезнью содержат изолированно и вновь обследуют микроскопическим и серологическим методами с интервалом 30 дн до получения трехкратного отрицательного результата по группе.
3.3 В неблагополучных хозяйствах ведут точный учет жеребцов (ослов, мулов), кобыл, идущих в случку.
3.4.Мясо больных и положительно реагировавших животных перерабатывают в вареные колбасы согласно п. 5.1 действующих Правил ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продук-тов.
При истощении животного или обнаружении дистрофических изменений в мы-шечной ткани, мясо и внутренние органы направляют на утилизацию.
Шкуры от павших и вынужденно убитых больных животных выпускают без ог-раничений.
3.5.После каждого случая выделения зараженного животного и убоя его, а также перед снятием ограничений помещения, предметы ухода, оборудование считают от навоза, моют и подвергают дезинфекции одним из следующих препаратов: 2 %-ный раствор натра едкого, 2 %-ный раствор формалина, параформальдегида, 2 %-ный раствор хлорной извести, 5 %-ный раствор лизола из расчета 0,3-0.5 л/м2 площади. Раствор натра едкого применяют горячим (30-90°С).
3.6.Ограничения с неблагополучного хозяйства по случной болезни лошадей сни-мают через 2 года после последнего случая выделения клинически больного жи-вотного и получения ежегодно в течение этого периода отрицательных результа-тов серологических исследований.
3.7.После оздоровления хозяйства от случной болезни жеребцов-производителей и кобыл случного возраста ежегодно в течение 5 лет подвергают трехкратному серологическому исследованию за 3, 2 и 1 месяц до начала случной компании. Животных, давших положительную или дважды сомнительную реакции, убивают и  поступаю согласно п. 3 настоящей инструкции.

С утверждением настоящей инструкции на территории Российской Федерации утрачивает силу « инструкция о мероприятиях по предупреждению и ликвидации случной болезни однокопытных», утвержденная Главным управлением ветерина-рии Госкомиссии Совмина СССР по продовольствию и закупкам 12 ноября 1990 года.
УТВЕРЖДАЮ
Заместитель начальника Департамента ветеринарии
В.В. Селиверстов

**Методические указания по лабораторным исследованиям на случную болезнь лошадей, ослов, мулов
(Утверждены. 16 октября 1984 г.)
1. Общие положения.**
1.1. Случная болезнь—протозойное заболевание лошадей, ослов, мулов, вызываемое возбудителем Trypanosoma equiperdum; про-текает преимущественно хронически.
1.2. Диагноз на случную болезнь ставят на основании результатов микроскопического и серологического исследований материалов с учетом клинических и эпизоотологических данных.
1.3. Для исследования в лабораторию направляют: соскобы со слизистой оболочки влагалища, мочеиспускательного канала, взятые уретральной ложкой; выпот из надрезов отеков и бляшек, собранный шприцем в стерильные пробирки; сыворотку крови нативную или консервированную одним из общепринятых методов.
Патологический материал доставляют в термосе со льдом и иследуют не позднее 6 ч, а сыворотку крови — не позднее 2 дней пос-ле взятия.
**2. Микроскопическое исследование.**
2.1. Из доставленного материала делают раздавленные капли и 6—8 тонких мазков.
2.1.1. Соскоб или выпот густой консистенции разбавляют теплым физиологическим раствором (37 °С) 1:2, наносят каплю на предметное стекло, накрывают покровным и исследуют на наличие подвижных трипаносом в затемненном поле микроскопа при малом увеличении.
2.1.2. Тонкие мазки высушивают на воздухе, фиксируют метиловым спиртом в течение 3—5 мин или этиловым 20—25 мин, окрашивают по Романовскому в течение 20—30 мин, затем промывают водой, высушивают и исследуют с использованием иммерсионной системы микроскопа.
Протоплазма трипаносом окрашивается в голубой цвет, ядро - в розовый, жгутик и ундулирующая мембрана — в светло-розовый.
**3. Серологическое исследование.**
3.1. Серологическое исследование сыворотки крови проводят в реакции связывания комплемента (РСК).
3.2. Компоненты реакции:
антиген трипаносомный жидкий или лиофилизированный;
комплемент — нативная, консервированная или сухая (изготовленная на биофабрике) сыворотка крови морской свинки;
гемолитическая сыворотка (гемолнзин) с титром не ниже 1:1000;
нормальная и испытуемые сыворотки нативные или консервированные одним из общепринятых методов;
2,5 %-ная взвесь эритроцитов барана на физиологическом рас-творе;
физиологический раствор—0,85 %-ный раствор химически чистого хлорида натрия на дистиллированной воде с рН 6,8—7,2.
3.3. Подготовка компонентов для реакции.
3.3.1. Перед постановкой реакции готовят разведение каждого компонента в соответствии с указаниями на этикетках и в количе-стве, необходимом для всего опыта, включая титрование. В процессе работы не допускается дополнительно разводить компоненты, смешивать их с ранее разведенными и использовать в реакции без титрования.
3.3.2. При использовании сухого комплемента содержимое необходимого количества ампул растворяют в физиологическом растворе и сливают в одну пробирку. Полученный раствор комплемента используют для титрования (в разведении 1:20) и главного опыта.
3.3.3. Гемолизин используют в реакции в удвоенном титре. Например, при титре гемолизина 1:1000 его берут 2:1000.
3.3.4. Испытуемые трипаносомную и нормальную сыворотки, разведенные для главного опыта и титрования комплемента, инактивируют 30 мин при 56—58 С (сыворотки ослов и мулов — при 64 С).
3.3.5. Антиген трипаносомный лиофилизированный или жидкий используют в рабочем разведении, которое в 2 раза ниже его предельного титра. Например, титр антигена 1:200, его рабочее разведение будет 1:100.
3.3.6. Эритроциты барана отмывают физиологическим раствором путем центрифугирования при 1,5—3 тыс. об/мин в течение 10—15 мин до полной прозрачности надосадочной жидкости, после чего готовят 2,5 %-ную взвесь на физиологическом растворе.
3.3.7. Физиологический раствор, используемый для разведения компонентов, готовят в день постановки реакции и кипятят в течение 5 мин.
3.4. Разведенные компоненты перед постановкой реакции проверяют на антикомплементарность и гемотоксичность
3.5. После проверки компонентов готовят гемолитическую систе-му, смешивая равные объемы гемолизина в рабочем титре с 2,5 %-ной взвесью эритроцитов и выдерживают ее 25—30 мин при 37— 38 С
3.6. Титрование компонентов реакции.
3.6.1. Гемолизин титруют при использовании новой серии или в случае подозрения на снижение титра.
Из основного разведения гемолизина 1:100 (0,1 мл гемолизина и 9,9 мл физиологического раствора) готовят следующие разведения 1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000; 1:2500; 1:3000.
Затем в ряд пробирок переносят по 0,5 мл каждого разведения гемолизина, добавляют в каждую пробирку 0,5 мл комплемента в разведении 1:20, 0,5 мл 2,5 %-ной взвеси эритроцитов, 1,0 мл физиологического раствора и выдерживают в водяной бане 10 мин при 37-38 С.
Титром гемолизина считают наибольшее его разведение, при ко-тором получен полный гемолиз эритроцитов.
3.6.2. Комплемент титруют в гемолитической системе из разве-дения 1:20 в дозах от 0,1 до 0,37 с интервалом 0,03 мл. В каждую пробирку добавляют недостающее до 0,5 мл количество физиологического раствора, по 1,0 мл гемолитической системы и физиологического раствора (вместо антигена и сыворотки) и выдерживают в во-дяной бане 10 мин при 37—38 °С.
Титром комплемента в гемолитической системе считают наименьшее его количество, вызывающее полный гемолиз эритроцитов. При использовании биофабричного комплемента титрование его в гемолитической системе необязательно.
3.6.3. Титрование комплемента в бактериолитической системе проводят перед каждой постановкой реакции на 3—4 сыворотках: позитивной (трипаносомной), негативной и 1—2 сыворотках из опыта.
Каждую сыворотку разливают по 0,1 мл в два ряда пробирок, добавляют по 0,4 мл физиологического раствора и инактивнруют, как указано в п. 3.3.4, или сначала готовят разведение сывороток 1:5, инактивируют и разливают по 0,5 мл. Затем в пробирки обоих рядов вносят комплемент, разведенный 1:20 в дозах от 0,13 до 0,37 с интервалом 0,03 мл.
Для более точной дозировки рекомендуют приготовить в дополнительном ряду пробирок необходимые разведения комплемента в 10-кратных объемах, затем аппаратом Флоренского с пипетками объемом 0,5 мл перенести разведение комплемента в ряды с сыворотками для титрования.
Внесение остальных компонентов и режим титрования  указаны в таблице 3 на примере негативной сыворотки.
Титром комплемента в бактериолитической системе считают минимальное количество его, вызывающее полный гемолиз эритроцитов в пробирках с негативной и испытуемой сывороткой без антигена, при полной задержке гемолиза в пробирках  с трипаносомной сывороткой и антигеном (в таблице 1 титр равен 0,25).
Для главного опыта берут дозу комплимента, полученную при титровании.
3.7. Общее количество комплемента для главного опыта определяют по формуле
Х=ТП/20
где X— количество комплемента для главного опыта; Т-титр комплимента в бактериолитической системе; П-количество пробирок в реакции; 20-разведение комплимента при тировании;
Например, в опыте 100 пробирок, титр комплименте 0,25, расчет его на опыт 025х100/20=1,25
Необходимое количество разведенного комплемента для реакции равно 50 мл (0,5х100), следовательно, к 1,25 мл основного раствора комплимента добавляют 48,75 мл физиологического раствора.
3.8. Постановка главного опыта.
3.8.1. Испытуемые сыворотки исследуют в разведении 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена (контроль). При массовых исследованиях допускается постановка реакции в одном разведении 1:5 (без контроля) с последующей перестановкой всех реагирующих сывороток, как указано выше.
Для этого каждую сыворотку разливают по 0,1 и 0,05 мл (опытные пробирки) и 0,1 мл (контрольные), добавляют соответственно 0,4, 0,45 и 0,4 мл физиологического раствора и инактивируют, как указано в п. 3.3.4.
В опытные пробирки вносят по 0,5 мл трипаносомного антигена в рабочем разведении, в контрольные — по 0,5 мл физиологического раствора, во все пробирки—по 0,5 мл комплемента в установленном титре.
После выдерживания реакции в водяной бане (20 мин при 37—38С) во все пробирки вносят по 1 мл гемолитической системы и вновь помещают в баню на 15 мин при 37—38С.
3 8.2. Контроли главного опыта:
позитивная и негативная сыворотки в разведении 1:5 с антигеном и без антигена;
антиген в двойной дозе без сыворотки (на антикомплементарность);
антиген в двойной дозе без сыворотки и комплемента (на гемотоксичность).
3.9. Учет и оценка результатов реакции.
3.9.1. Учет результатов реакции проводят дважды: сразу после водяной бани и на следующий день при хранении реакции в холодильнике.
Сначала учитывают результаты контролей: в пробирках с позитивной сывороткой и антигеном, с двойной дозой антигена без сыворотки и комплемента должна быть полная задержка гемолиза; в пробирках с позитивной и негативной сыворотками без антигена, с негативной сывороткой и антигеном, с двойной дозой антигена без сыворотки — полный гемолиз.
Степень задержки гемолиза эритроцитов определяют по шкале, приготовленной перед учетом реакции. Для этого содержимое 4—5 пробирок с полным гемолизом сливают в одну и готовят разведения по таблице
Разведения гемолизированной жидкости
Гемолизированная жидкость 1,0  0,75 0,5 0,25 -
Физиологический раствор      ---  2,5  0,5  0,75 1
Процент гемолиза                  100  75  50   25   0

Степень гемолиза в пробирках с исследуемыми сыворотками определяют в сравнении с гемолизом в пробирках шкалы.
Процент гемолиза выражают в крестах:
(++++) – отсутствие гемолиза, надосадочная жидкость бесцветная;
(+++) – гемолиз 25% эритроцитов;
(++) – гемолиз 50% эритроцитов;
(+) – гемолиз 75% эритроцитов;
(-) – полный гемолиз эритроцитов, осадок отсутствует.
3.9.2 Диагностическая оценка реакции. Положительной считают реакцию, оцененную на 2—4 креста в разведении 1:5 или 1—4 креста в разведении 1:10, сомнительной—на 1 крест в разведении 1:5, отрицательной — при полном гемолизе эритроцитов в обоих разведениях сыворотки.
3.10. Животных, с сывороткой крови которых получена сомни-тельная РСК, исследуют повторно через месяц.
**4. Диагноз** считают установленным при получении одного из следующих показателей:
обнаружение возбудителя при микроскопическом исследовании патматериала;
получение положительного результата РСК.
**5. Сроки исследований**, микроскопического — 1 день, серологиче-ского — 4 дня.