ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54627— 2011

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ ЖВАЧНЫЕ

Методы лабораторной диагностики гельминтозов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии им. К.И. Скрябина» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ «ВИГИС» Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 декабря 2011 г. № 774-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2013

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 2
4 Общие положения . . . 2
5 Требования безопасности . . . 3
6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы и реактивы . . . 3
7 Подготовка к исследованиям . . . 5
8 Флотационные методы определения наличия яиц и личинок гельминтов . . . 7
9 Седиментационные методы диагностики трематодозов . . . 7
10 Комбинированные (седиментационно-флотационные) методы . . . 8
11 Гельминтолярвоскопические методы диагностики нематодозов . . . 9
12 Методы определения количества яиц нематод, цестод и трематод в фекалиях . . . 10
13 Методы определения жизнеспособности яиц и личинок гельминтов . . . 10
14 Исследования павших животных на наличие гельминтов . . . 10
15 Метод исследования соскобов из объектов внешней среды на наличие яиц гельминтов . . . 10
16 Метод установления интенсивности инвазии . . . 11
17 Метод Романенко и Гуджабидзе для исследования почвы на наличие яиц гельминтов . . . 11
18 Метод исследования промежуточных и дополнительных хозяев нематод, цестод и трематод на зараженность . . . 12
Приложение А (справочное) Пример записи в журнале результатов гельминтологических исследований . . . 13

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ ЖВАЧНЫЕ

Методы лабораторной диагностики гельминтозов

Agricultural ruminant animals.
Methods of laboratory helminthology diagnostics

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сельскохозяйственных жвачных животных (далее — животные) и устанавливает методы лабораторной диагностики гельминтозов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 12.1.019—79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 54001—2010 Удобрения органические. Методы гельминтологического анализа

ГОСТ 2—85 Селитра аммиачная. Технические условия

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.018—93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.4.011—89 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация

ГОСТ 244—76 Натрия тиосульфат кристаллический. Технические условия

ГОСТ 490—2006 Кислота молочная пищевая. Технические условия

ГОСТ 1625—89 Формалин технический. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3760—79 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

ГОСТ 4168—79 Реактивы. Натрий азотнокислый. Технические условия

ГОСТ 4174—77 Реактивы. Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4236—77 Реактивы. Свинец (II) азотнокислый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4523—77 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4529—78 Реактивы. Цинк хлористый. Технические условия

ГОСТ 5556—81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5789—78 Реактивы. Толуол. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 6259—75 Реактивы. Глицерин. Технические условия
ГОСТ 6672—75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия
ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия
ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия
ГОСТ 9412—93 Марля медицинская. Общие технические условия
ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 14702—79 Селитра аммиачная водоустойчивая. Технические условия
ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия
ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия
ГОСТ 18481—81 Ареометры и цилиндры стеклянные. Общие технические условия
ГОСТ 19126—2007 Инструменты медицинские металлические. Общие технические условия
ГОСТ 21239—93 Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний
ГОСТ 22867—77 Реактивы. Аммоний азотнокислый. Технические условия
ГОСТ 23932—90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия
ГОСТ 24363—80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия
ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **гельминтозы:** Паразитарные болезни животных, вызываемые гельминтами — паразитическими червями.

3.2 **инвазия:** Проникание в организм животного паразитов (гельминтов) с последующим развитием сложного патофизиологического процесса их взаимодействия.

3.3 **интенсивность инвазии:** Общее число яиц и личинок гельминтов, обнаруженных у обследованного животного, выраженное в экземплярах.

3.4 **экстенсивность инвазии:** Отношение числа зараженных животных к общему поголовью обследованных животных разного возраста и вида, выраженное в процентах.

3.5 **нематодозы:** Болезни, вызываемые круглыми гельминтами, относящими к классу нематода (Nematoda).

3.6 **цестодозы:** Болезни, вызываемые ленточными гельминтами, относящими к классу цестода (Cestoda).

3.7 **трематодозы:** Болезни, вызываемые плоскими гельминтами, относящими к классу трематода (Trematoda).

3.8 **зоонозы:** Гельминтозы, возбудители которых паразитируют как у животных, так и у человека.

4 Общие положения

4.1 Лабораторную диагностику гельминтозов животных проводят по показателям:

- экстенсивности инвазии;
- интенсивности инвазии;
- числа жизнеспособных яиц и личинок гельминтов определенных видов в количественном или процентном отношении к общему числу обнаруженных.

4.2 Жизнеспособность обнаруженных яиц и личинок гельминтов определяют и подтверждают в соответствии с требованиями настоящего стандарта.

4.3 По числу обнаруженных яиц и личинок гельминтов интенсивность инвазии у животных классифицируют в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Класс гельминтов	Интенсивность инвазии в зависимости от числа обнаруженных яиц и личинок гельминтов, экз./1 г фекалий			
	Низкая	Средняя	Высокая	Очень высокая
Нематоды, цестоды	1—100	101—500*	501—1000	Св. 1000
Трематоды	1—10	11—100	Св. 101	—
* Для взрослых животных — низкая интенсивность инвазии.				

5 Требования безопасности

5.1 Сотрудники, выполняющие работу по отбору, доставке и анализу проб, должны иметь рабочую спецодежду: халаты, фартуки, перчатки, резиновую обувь по ГОСТ 12.4.011. Рабочие халаты подлежат обмену на чистые по истечении каждой рабочей недели. Спецодежду и обувь хранят в шкафах.

Сотрудники должны быть обеспечены средствами и условиями для личной гигиены и обязаны соблюдать санитарно-гигиенические требования.

5.2 Требования безопасности при работе с химическими реактивами — по ГОСТ 12.1.007, с электрооборудованием — по ГОСТ Р 12.1.019.

Требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.018.

5.3 Помещение, в котором проводят анализы, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Работы необходимо проводить в вытяжном шкафу с применением резиновых перчаток.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы и реактивы

Шкаф вытяжной.

Холодильник электрический бытовой, любого класса, позволяющий поддерживать температуру от минус 6 °С до плюс 5 °С, по техническим характеристикам и условиям эксплуатации соответствующий требованиям ГОСТ 16317.

Термостат электрический (типа ТС-1/80 СПУ или аналогичный), позволяющий поддерживать температуру от 5 °С до 60 °С с допустимой погрешностью ± 0,4 °С.

Центрифуга напольная (типа ЦЛС-31 М со сменным ротором) с частотой вращения 1500—2500 об/мин.

Микроскоп стереоскопический типа МБС, обеспечивающий 100-кратное увеличение.

Осветитель к микроскопу ОИ-19 или аналогичного типа.

Камеры счетные Горяева или ВИГИСа.

Столик нагревательный к микроскопу (столик Морозова).

Весы с пределами допустимой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 5 мг и ± 10 мг по ГОСТ Р 53228.

Пинцеты анатомические.

Пинцеты хирургические.

Набор ареометров АОН-1 типа 1 (А1) с пределами измерений от 1,000 до 1,600 кг/см^3 по ГОСТ 18481.

Аппарат Бермана.

Гомогенезатор электрический.

Электромешалка.

Сита почвенные с размером диаметра ячеек 0,25; 0,3; 0,5; 1,0 мм^2.

Стаканы пластмассовые вместимостью 30 см^3.

Петли металлические гельминтологические диаметром 8—9 мм.

Штатив для пробирок лабораторный.

Столик с гнездами для воронок.
Кюветы эмалированные.
Кюветы почковидные.
Спиртовка СЛ-1 по ГОСТ 25336.
Часы песочные на 3—5 мин или сигнальные.
Шпатели пластмассовые и металлические по ГОСТ 19126.
Ножницы анатомические.
Ножницы хирургические по ГОСТ 21239.
Прибор для уравновешивания центрифужных пробирок вместимостью от 10 до 100 $см^3$ (типа ПЦП).
Приборы вакуумного фильтрования типов ПВФ-142/ЭМ, ПВФ-142/Э.
Термометры технические стеклянные с пределами измерения температуры от 0 °С до 100 °С и от 100 °С до 200 °С по ГОСТ 28498.
Совки, портативные лопаты, пробоотборники.
pH-метр, обеспечивающий измерение с погрешностью не более ± 0,01 ед. pH.
Дозаторы пипеточные.
Шкаф сушильный лабораторный, обеспечивающий поддержание температуры от 0 °С до 105 °С с допустимой погрешностью ± 2 °С.
Карандаши по стеклу (стеклографы).
Груши резиновые разных размеров.
Спринцовки резиновые разной вместимости.
Перчатки резиновые.
Фартук клеенчатый.
Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.
Бумага пергаментная.
Емкости для отбора проб воды, органических удобрений, навоза, навозных стоков, осадков, пригодные для обеззараживания, из нейтральных материалов, канистры, ведра вместимостью 8—10 $дм^3$, тазы.
Клеенка, полиэтиленовые пленка, пакеты, мешки.
Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.
Марля медицинская по ГОСТ 9412.
Стекла предметные размерами 25 × 75, 60 × 120 мм по ГОСТ 9284.
Стекла покровные размерами 18 × 18, 24 × 24 мм по ГОСТ 6672.
Чашки биологические Петри по ГОСТ 25336.
Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 400 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 25336.
Стаканы стеклянные или пластмассовые вместимостью 50—150 $см^3$.
Чашки выпарные плоскодонные сферические вместимостью 1000 и 2500 $см^3$ по ГОСТ 25336.
Пипетки градуированные вместимостью 1—10 и 50 $см^3$ по ГОСТ 29227.
Пипетки глазные.
Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.
Колбы конические вместимостью 50, 100 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770.
Стекла часовые разных размеров по ГОСТ 23932.
Цилиндры градуированные с носиком вместимостью 1, 25, 100, 200, 500 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770.
Палочки стеклянные.
Трубки резиновые длиной 20—30 см.
Банки стеклянные с притертыми пробками разной вместимости (до 1000 $см^3$).
Ступки и пестики фарфоровые разных размеров по ГОСТ 9147.
Посуда лабораторная фарфоровая по ГОСТ 9147.
Эксикаторы с притертой крышкой.
Стаканы стеклянные высокие с носиком (ВН) вместимостью 50, 100 $см^3$ по ГОСТ 1770.
Стаканы аптечные вместимостью 50 и 100 $см^3$.
Пробирки центрифужные градуированные (ПЦГ) вместимостью 10 $см^3$ по ГОСТ 1770.
Кристаллизаторы стеклянные.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
Калий едкий по ГОСТ 24363.
Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.
Натрий хлористый по ГОСТ 4233.
Натрий хлористый, х. ч., на изотоническом растворе массовой долей 0,85 % (для жидкости Барбагалло с 3 %-ным формалином).

Натрий азотнокислый по ГОСТ 4168.
Аммоний азотнокислый по ГОСТ 22867 или гранулированная аммиачная селитра по ГОСТ 2.
Селитра аммиачная водоустойчивая по ГОСТ 14702.
Хлорид цинка по ГОСТ 4529.
Свинец азотнокислый по ГОСТ 4236.
Формальдегид 40 %-ный.
Формалин технический по ГОСТ 1625.
Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.
Глицерин по ГОСТ 6259.
Аммиак по ГОСТ 3760.
Магний сернокислый по ГОСТ 4523.
Эфир этиловый (диэтиловый, серный).
Метиленовый синий, х. ч.
Цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174.
Натрия тиосульфат по ГОСТ 244.
Толуол по ГОСТ 5789.
Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300.
Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.
Кислота молочная по ГОСТ 490.
Индикаторы бумажные для определения pH в диапазоне 6—8 ед. pH с интервалом деления 0,2.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

7 Подготовка к исследованиям

7.1 Отбор и подготовка проб фекалий

7.1.1 Точечные пробы отбирают из фекалий животных, патологического материала, соскобов объектов внешней среды, промежуточных и дополнительных хозяев гельминтов.

7.1.2 Точечные пробы фекалий берут от живых и павших животных.

7.1.3 Точечные пробы фекалий от живых животных (5 г от овец или коз и 10 г от крупного рогатого скота или оленей) берут из прямой кишки животного или только что выделившегося испражнения. В последнем случае берут верхнюю часть фекалий, не соприкасающуюся с полом или почвой.

Руки после взятия точечной пробы тщательно моют, чтобы не занести яйца или личинки гельминтов из фекалий инвазированного животного.

Точечные пробы берут от 10 % поголовья группы, но не менее чем от 30 животных каждой возрастной группы. От коров дойного стада и быков-производителей точечные пробы берут от каждого животного.

7.1.4 Точечные пробы фекалий от павших животных берут из прямой кишки в количестве, указанном в 7.1.3.

7.1.5 Отобранные точечные пробы фекалий упаковывают в герметичный сосуд, полиэтиленовый пакет или пергаментную бумагу, на которых ставят номер точечной пробы.

Отобранные точечные пробы доставляют в лабораторию в течение суток со времени взятия, консервируют 2,5 %-ным раствором бихромата калия и хранят до проведения испытаний в холодильнике при температуре 2 °С—4 °С для задержки развития личинок нематод.

7.1.6 Точечные пробы патологического материала отбирают при вскрытии павших или вынужденно убитых животных.

При отборе точечных проб учитывают характерные патологоанатомические изменения и берут части кишечника, паренхиматозных органов, которые консервируют бихроматом калия. Для гистологических исследований точечные пробы хранят в 10 %-ном растворе формальдегида.

7.1.7 Для определения загрязненности объектов внешней среды яйцами и личинками нематод, цестод и трематод отбирают из разных мест от трех до десяти соскобов (по 3 г) с пола станков, проходов, стен станков, кормушек и смывы с предметов ухода за животными (скребки, метла). Отобранные соскобы объектов внешней среды упаковывают по 7.1.5.

7.1.8 Для определения зараженности промежуточных и дополнительных хозяев личинками нематод, цестод и трематод в летние месяцы в местностях, неблагополучных по гельминтозам, из разных мест отбирают 10—20 экземпляров дождевых червей (олигохет), моллюсков, пастбищных клещей.

Отобранные точечные пробы помещают в пробирки, закрывают пробками и доставляют в лабораторию в день отбора.

7.1.9 Отправляемые в лабораторию пробы снабжают сопроводительным документом, в котором указывают:

- хозяйство (отделение, ферму, цех, участок);
- число животных в отделении, цехе, участке;
- систему содержания животных;
- возраст и пол животного;
- категорию упитанности животного;
- заболеваемость и смертность животных;
- продолжительность заболевания животных;
- на наличие какого гельминтоза проводят исследование;
- дату отбора проб и отправления на исследование;
- фамилию с инициалами и подпись ветеринарного врача.

При индивидуальном обследовании основных коров дойного стада и быков-производителей номера или клички их на упаковке и в описи должны строго соответствовать.

Все отобранные пробы, направляемые в лабораторию для испытаний, транспортируют в ящиках, имеющих гнезда для стандартной посуды.

7.1.10 Из лабораторных проб отбирают анализируемые пробы фекалий массой 1—5 г для проведения исследований методом овоскопии.

7.2 Отбор и подготовка проб почвы

Точечные пробы с поверхности почвы (с глубины 1—3 см) берут из затененных и освещенных солнцем участков шпателем, а с глубины до 20 см — лопаточкой или буром. С каждого обследуемого участка одновременно по диагонали отбирают три — пять точечных проб по 100 г каждая.

Из точечных проб, взятых с одного участка на одной глубине, путем перемешивания получают объединенную пробу.

Из объединенной пробы получают лабораторные пробы массой 50—100 г.

Лабораторные пробы помещают в банки с крышкой или целлофановые пакеты. Каждая проба должна иметь этикетку с указанием места отбора, даты, глубины, характера исследуемого участка (в тени или под солнцем, состав почвы, наличие растительности и другие). В лаборатории пробы помещают в холодильник или каждую из них пересыпают в кристаллизатор, заливают жидкостью Барбагалло.

В холодильнике почву хранят не более одного месяца при температуре 4 °С, периодически аэрируя и увлажняя ее.

7.3 Приготовление растворов

7.3.1 Приготовление флотационных растворов

В качестве флотационных растворов, с помощью которых из анализируемых проб фекалий выделяют яйца и личинки гельминтов, используют насыщенные растворы солей. Наибольшей флотационной способностью обладают растворы солей при температуре 20 °С—22 °С. Плотность растворов определяют ареометрами по ГОСТ 18481. Правильность приготовленных растворов определяют также по образованию кристаллической пленки на поверхности раствора и выпадению кристаллов на дно сосуда.

7.3.1.1 Приготовление насыщенного раствора хлористого натрия плотностью 1,18—1,19 г/см^3

420 г хлористого натрия по ГОСТ 4233 растворяют в 1 дм^3 кипящей дистиллированной воды.

Затем раствор остужают и фильтруют через воронку с ватой или двухслойной марлей в чистую стеклянную посуду. Ареометром проверяют плотность раствора, которая должна быть 1,18—1,19 г/см^3.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

7.3.1.2 Приготовление раствора нитрата аммония плотностью 1,28—1,29 г/см^3

1500 г нитрата аммония по ГОСТ 22867 или аммиачной селитры по ГОСТ 2 растворяют в 1 дм^3 горячей дистиллированной воды по ГОСТ 6709 в эмалированной посуде при постоянном размешивании и подогревании.

Затем раствор остужают и фильтруют в чистую посуду. Ареометром проверяют плотность раствора, которая должна быть 1,28—1,29 г/см^3.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

7.3.1.3 Приготовление раствора сульфата магния плотностью 1,28—1,29 г/см^3

920 г сульфата магния по ГОСТ 4523 растворяют в 1 дм^3 дистиллированной воды и остужают.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

7.3.1.4 Приготовление смеси хлористого натрия и нитрата аммония плотностью 1,27—1,28 г/см^3

250 г хлористого натрия по ГОСТ 4233 и 550 г нитрата аммония по ГОСТ 4523 растворяют в 1 дм^3 кипящей дистиллированной воды.

Остывший раствор фильтруют в чистую посуду, ареометром проверяют плотность, которая должна быть 1,27—1,28 г/см^3.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

7.3.2 Приготовление раствора сернокислого цинка плотностью 1,24 г/см^3

400 г сернокислого цинка по ГОСТ 4174 растворяют в 1 дм^3 горячей дистиллированной воды по ГОСТ 6709 в эмалированной посуде при постоянном размешивании и подогревании. Через 24 ч раствор может дать осадок, и его плотность понизится.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

8 Флотационные методы определения наличия яиц и личинок гельминтов

8.1 Сущность методов

Флотационные методы основаны на определении наличия яиц нематод, цестод, некоторых трематод, личиночных стадий паразитических и свободноживущих нематод, а также члеников и половозрелых форм, всплывающих на поверхность флотационного раствора с испытуемым материалом, с помощью микроскопа.

При определении наличия яиц нематод, цестод и трематод под микроскопом используют соответствующий атлас яиц гельминтов.

8.2 Метод Фюллеборна для диагностики нематодозов и цестодозов

Анализируемую пробу массой 1 г заливают в ступке 3—5 см^3 насыщенного раствора хлористого натрия по 7.3.1.1, тщательно размешивают пестиком или стеклянной палочкой и по мере размешивания добавляют раствор, доводя объем до 15 см^3. Затем процеживают через сито в чистый стакан и отстаивают в течение 40 мин. За время флотации яйца нематод и цестод, удельный вес которых меньше веса насыщенного раствора хлористого натрия, всплывают на поверхность и концентрируются на поверхностной пленке.

Затем, прикасаясь металлической петлей к разным местам поверхностной взвеси, снимают три капли раствора и наносят на предметное стекло, и исследуют под микроскопом. Для недопущения быстрого высыхания и кристаллизации капель на предметных стеклах к ним добавляют по небольшой капле 50 %-ного водного раствора глицерина.

Металлическую петлю обжигают над пламенем спиртовки в начале и конце испытаний. При массовых исследованиях каплю на предметном стекле покровным стеклом не накрывают, а металлическую петлю промывают резкими движениями в стаканчике с дистиллированной водой.

8.3 Метод Котельникова-Хренова для диагностики нематодозов и цестодозов

Исследование проводят по 8.2 с помощью флотационного раствора нитрата аммония по 7.3.1.2 с изменением времени отстаивания после фильтрования жидкости до 10—15 мин.

8.4 Комбинированный флотационный метод для диагностики нематодозов и цестодозов

Исследование проводят по 8.2 с помощью комбинированного флотационного раствора по 7.3.1.4 с изменением времени отстаивания после фильтрования жидкости до 10—15 мин.

9 Седиментационные методы диагностики трематодозов

9.1 Сущность методов

Седиментационные методы основаны на осаждении яиц гельминтов в процессе обработки проб фекалий дистиллированной водой или другими жидкостями и исследовании осадка.

Данные методы применяют для диагностики трематодозов, реже — других гельминтозов.

9.2 Метод последовательного промывания для диагностики фасциолеза, парамфистоматоза, дикроцелиоза и других гельминтозов

Анализируемую пробу фекалий массой 3 г помещают в стакан вместимостью 50—100 см^3, вливают небольшое количество дистиллированной воды и палочкой размешивают до получения жидкой кашицеобразной массы, затем добавляют дистиллированную воду порциями до объема 50 см^3 при постоянном размешивании.

Смесь фильтруют, пропуская через ситечко в другой стакан, и отстаивают в течение 5 мин до образования осадка, после чего верхний слой жидкости сливают до осадка, а к осадку добавляют снова такое же количество дистиллированной воды и отстаивают в течение 5 мин, после чего жидкость снова сливают до осадка.

Такие операции повторяют до тех пор, пока надосадочный слой воды не будет прозрачным. Последний раз верхний слой сливают или отбирают спринцовкой, опустив наконечник в стакан, не доводя до дна 1,5—2,0 см, а осадок поочередно разливают на часовые или предметные стекла и исследуют под микроскопом.

В случае, когда фекалии овец очень плотные, их растирают пестиком в ступке с водой.

9.3 Метод Болховитинова для выявления яиц трематод

В лабораторные пробирки наливают по 6—8 см^3 насыщенного раствора хлорида натрия и вставляют в штатив наклонно, помещая нижний конец пробирки в гнездо, не противоположное верхнему отверстию, а в соседнее.

Анализируемые пробы фекалий массой 1—2 г тщательно размешивают в ступке с 10—15 см^3 дистиллированной воды комнатной температуры. Затем медленно по стенкам воронки через двойной слой марли процеживают содержимое из ступки в пробирку таким образом, чтобы фекальная смесь оказалась в поверхностном слое раствора соли.

Рекомендуемое время отстаивания — 30—90 мин. За это время тяжелые яйца трематод оседают на дно пробирки. Затем верхний слой сливают, а осадок помещают на часовое или предметное стекло и исследуют под микроскопом.

10 Комбинированные (седиментационно-флотационные) методы

10.4.1 Сущность методов

Комбинированные (седиментационно-флотационные) методы основаны на комбинации противоположных приемов обработки проб фекалий — седиментации и флотации, благодаря чему происходит обогащение осадка или поверхностной пленки яйцами гельминтов и удаление излишних посторонних частиц взвеси, которые значительно мешают исследованию.

Методы более трудоемкие, однако, при некоторых гельминтозах более информативны.

10.4.2 Метод Дарлинга

Анализируемую пробу массой 1 г заливают в ступке 5 см^3 дистиллированной воды, тщательно размешивают, добавляя дистиллированную воду до 15 см^3. Затем полученную взвесь процеживают через сито в стакан и отстаивают в течение 5 мин. После отстаивания верхний слой жидкости сливают, а на дне оставляют осадок с водой, который переносят в центрифужную пробирку. Наполненные до одинакового уровня пробирки центрифугируют с частотой вращения 2000 об/мин в течение 2 мин. После чего жидкость из пробирок сливают, а к осадку добавляют 10 см^3 флотационного раствора натрия хлористого по 7.3.1.1, тщательно перемешивают до получения взвеси и опять центрифугируют в течение 2 мин.

Затем металлической петлей снимают из каждой пробирки по три капли поверхностной взвеси, переносят на предметное стекло и препарат исследуют под микроскопом.

10.4.3 Метод Щербовича

Испытания проводят по 10.4.2, а в качестве флотационного раствора используют насыщенный раствор сульфата магния по 7.3.1.3.

10.4.4 Метод Вишняускаса

Применяется для диагностики фасциолеза, стронгилятозов желудочно-кишечного тракта, трихоцефалеза, цестодозов и диктиокаулеза жвачных животных.

Анализируемую пробу фекалий массой 3 г от крупного рогатого скота и 1 г от овец тщательно размешивают с 50 см^3 дистиллированной воды в ступке, затем фильтруют через сито в стеклянную посуду вместимостью 100 см^3. Ступку прополаскивают несколько раз 50 см^3 дистиллированной воды, которой промывают фекальные массы на сите. 100 см^3 полученного фильтрата отстаивают в течение 5 мин, затем верхний слой жидкости отбирают спринцовкой или осторожно сливают, оставляя на дне 20 см^3 жидкости с осадком.

К жидкости с осадком добавляют 80 см^3 дистиллированной воды и вновь отстаивают в течение 5 мин. После чего надосадочную жидкость отбирают спринцовкой или сливают, оставляя на дне 10 см^3 жидкости, которую перемещают в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 1 мин при 1500 об/мин.

Затем верхний слой жидкости отбирают спринцовкой или сливают, оставляя только осадок. К осадку постепенно добавляют раствор сульфата цинка по 7.3.2 так, чтобы мениск жидкости образовался

выше краев центрифужной пробирки. Центрифужную пробирку покрывают покровным стеклом так, чтобы жидкость всей своей поверхностью соприкасалась с покровным стеклом. Заблаговременно перед началом испытания края центрифужных пробирок шлифуют на бруске. Центрифугируют в течение 0,5 мин при 1500 об/мин.

Яйца гельминтов всплывают и прилипают к покровному стеклу. Покровное стекло с яйцами снимают и помещают на предметное стекло, предварительно нанеся одну каплю дистиллированной воды, и исследуют под микроскопом.

11 Гельминтолярвоскопические методы диагностики нематодозов

11.1 Сущность методов

Методы гельминтолярвоскопии позволяют обнаружить в фекалиях личинок и определить по ним возбудителей гельминтозов. Гельминтолярвоскопию используют для диагностики диктиокаулезов жвачных, протостронгилеза, мюллериоза, цистокаулеза овец, эляфостронгилеза оленей и других.

Анализируемые пробы свежих фекалий исследуют не позднее четырех часов после отбора, при этом шарики фекалий разрушают.

11.2 Метод Бермана-Орлова для диагностики нематодозов

5 г анализируемой пробы фекалий овец (коз) или 10 г анализируемой пробы фекалий крупного рогатого скота (оленей) заворачивают в кусочек марли и помещают в воронку на металлическое сито. Предварительно в воронку наливают дихлорированную воду температурой 40 °С. Заполненный анализируемой пробой фекалий и дистиллированной водой аппарат Бермана оставляют при комнатной температуре на 3 ч.

Личинки нематод обладают термотропностью и благодаря этому перемещаются из анализируемой пробы фекалий в теплую воду и оседают на дно пробирки. Перед испытанием пробирки осторожно разъединяют с резиновой трубкой и быстрым движением, не встряхивая осадок на дне, сливают жидкость из пробирки до осадка. Так снимают все пробирки в аппарате и ставят их в штатив. Осадок разливают на часовые или предметные стекла и микроскопируют. При осмотре под микроскопом личинки нематод подвижные, и их легко найти.

Эффективность метода для выявления зараженных диктикаулюсами животных составляет 80 %.

11.3 Метод Вайда для диагностики диктиокаулеза, протостронгилеза, мюллериоза и цистокаулеза овец и коз

На часовое или предметное стекло кладут несколько шариков свежевыделенных фекалий коз или овец и добавляют небольшое количество дистиллированной воды температурой около 40 °С. По истечении 40 мин шарики фекалий удаляют, оставшуюся жидкость на стекле исследуют под микроскопом на наличие личинок нематод.

Эффективность метода для выявления инвазированных диктикаулюсами овец при интенсивной инвазии составляет 70 %.

11.4 Метод Шильникова (упрощенный метод Бермана)

Анализируемые пробы фекалий заворачивают в марлевые салфетки, раскладывают по стаканчикам вместимостью 30 см^3, имеющих форму усеченного конуса и сферическое дно (выпуклость дна направлена кверху), заливают теплой водой и оставляют на 8—10 ч.

После этого анализируемые пробы осторожно вынимают, а жидкость отстаивают в течение 10—15 мин. Затем стаканчики медленно наклоняют, сливают воду до появления мути и дают отстояться остатку жидкости в течение 5—10 мин. После этого стаканчик наклоняют и из него пипеткой отбирают верхний прозрачный слой воды до тех пор, пока в пипетку не начнет всасываться осадок на дне. После удаления лишней воды на дне стаканчика остается 0,5—1,0 см^3 жидкости, которую пипеткой каплями наносят на предметное или часовое стекло и исследуют под микроскопом.

В случае, когда в стаканчике образуется густой осадок, наливают дистиллированную воду, осадок взбалтывают, дают отстояться в течение 10—15 мин, а затем воду сливают. Осадок просматривают порциально, каплями, так как при этом затрачивается меньше времени и концентрация личинок на единицу площади в них довольно большая.

Эффективность метода для выявления зараженных диктиокаулюсами животных составляет 75 %.

Примечание — На препарате часто скапливается много личинок нематод, которых трудно дифференцировать из-за их подвижности. Для прекращения движения предметное стекло с личинками нематод нагревают над пламенем спиртовки.

Также личинки нематод можно обездвижить прибавлением двух-трех капель раствора, состоящего из двух частей жидкости Барбагалло, двух частей дистиллированной воды и одной части 5 %-ного раствора йода. После этого осадок взбалтывают и выливают на стекло для микроскопирования. Личинки теряют подвижность без нарушения своей структуры.

Для дифференциации личинок диктиокаулюсов применяют метод окрашивания. К осадку в пробирке или вылитому на стекло добавляют одну-две капли 0,1 %-ного водного раствора метиленового синего. Осадок встряхивают и через 20—30 с микроскопируют. В результате личинки диктиокаулюсов овец окрашиваются в ярко-сиреневый, телят — в светло-сиреневый цвет, личинки других нематод остаются неокрашенными, частицы корма окрашиваются в зеленый цвет, а жидкость — в голубой.

12 Методы определения количества яиц нематод, цестод и трематод в фекалиях

12.1 Определение количества яиц нематод, цестод и трематод с помощью счетной камеры Горяева

1 г фекалий размешивают в ступке с 15 см^3 дистиллированной воды и тщательно гомогенизируют. Полученную суспензию фильтруют через сито, 10 см^3 фильтрата помещают в центифужную пробирку и центрифугируют с частотой вращения 2000 об/мин в течение 2 мин. Затем жидкость из пробирки сливают, а к осадку добавляют 10 см^3 флотационного раствора хлористого натрия, тщательно перемешивают и используют для заполнения счетной камеры Горяева.

При отсутствии счетной камеры используют предметное стекло, на которое наносят 0,15 см^3 суспензии и накрывают покровным стеклом.

Заполненную камеру Горяева или предметное стекло выдерживают в течение 2 мин, чтобы яйца нематод могли подняться к поверхности, и под микроскопом подсчитывают количество яиц нематод. Полученное число, умноженное на 100, показывает содержание яиц нематод в 1 г фекалий. Для более точного определения количества яиц используют две-три камеры.

12.2 Определение количества яиц нематод, цестод и трематод с помощью счетной камеры ВИГИСа

1 г фекалий размешивают в ступке с 5 см^3 флотационного раствора аммиачной селитры и тщательно перемешивают пестиком. По мере размешивания добавляют флотационный раствор и доводят до объема 15 см^3. Взвесь фильтруют через ситечко в чистый стакан с последующим отжимом содержимого в ситечко и тщательным размешиванием взвеси. Затем пастеровской пипеткой быстро переносят 0,5 см^3 взвеси в одну из ячеек счетной камеры и оставляют на 2 мин, после чего подсчитывают количество яиц нематод. При необходимости заполняют и другие ячейки взвесью пробы из того же стаканчика, но при этом каждый раз перед заполнением ячейки смесь перемешивают.

Подсчет яиц нематод в ячейке проводят с помощью микроскопа при искусственном освещении.

Для установления количества яиц в 1 г фекалий делают расчет по числу обнаруженных яиц в одной, двух или четырех ячейках. Для этого число яиц, выявленных в ячейке, умножают на 30, в двух ячейках — на 15, а в четырех — на 7,5.

13 Методы определения жизнеспособности яиц и личинок гельминтов

Определение жизнеспособности яиц и личинок гельминтов проводят по ГОСТ Р 54001 (раздел 8).

14 Исследования павших животных на наличие гельминтов

Исследования павших животных на наличие гельминтов заключается в установлении характерных патологоанатомических изменений в органах животных при патологоанатомическом вскрытии.

При этом у животных исследуют паренхиматозные органы и желудочно-кишечный тракт, обращая внимание на характер изменений, локализацию, количество и размер гельминтов.

15 Метод исследования соскобов из объектов внешней среды на наличие яиц гельминтов

Анализируемую пробу массой 3 г переносят в стакан с 30 см^3 дистиллированной воды, ставят в холодильник, выдерживают в течение 12 ч и гомогенизируют в течение 2 мин в электрическом гомогенезаторе с частотой вращения 2000 об/мин. Полученную суспензию фильтруют в течение 5 мин. Затем

жидкую часть сливают, к осадку добавляют 10 см^3 флотационного раствора хлористого натрия и тщательно перемешивают путем встряхивания. После чего готовой взвесью наполняют счетную камеру или помещают 0,15 см^3 суспензии на предметное стекло, накрывают ее покровным стеклом, выдерживают в течение 2 мин и подсчитывают количество яиц нематод.

Для определения числа яиц нематод в 1 г анализируемой пробы подсчитанное число яиц нематод умножают на коэффициент 67.

Степень загрязненности объектов внешней среды и зараженности животных оценивают в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Число яиц нематод в 1 г анализируемой пробы	Степень загрязненности объекта внешней среды
Менее 500	Низкая
От 500 до 1000 включ.	Средняя
Св. 1000	Высокая

16 Метод установления интенсивности инвазии

Интенсивность инвазии устанавливают подсчетом числа яиц гельминтов в трех каплях анализируемой пробы массой 1 г при микроскопии и делением полученного числа на 3 в соответствии с таблицей 1.

Полученное число показывает ориентировочную интенсивность гельминтозной инвазии в одной капле анализируемой пробы.

При установлении интенсивности инвазии учитывают одновременное присутствие разных видов нематод, цестод, трематод и паразитических простейших.

17 Метод Романенко и Гуджабидзе для исследования почвы на наличие яиц гельминтов

Исследование почвы на наличие яиц гельминтов проводят на разном удалении от животноводческих помещений, на пастбище и других местах с поверхности и различной глубине.

25 г анализируемой пробы почвы, отобранной по 6.2, помещают в центрифужные пробирки вместимостью 80—100 см^3 и заливают 3 %-ным раствором едкого натрия или калия в соотношении 1:1.

Содержимое пробирок тщательно размешивают при помощи электромешалки или стеклянных палочек, отстаивают в течение 20—30 мин, затем центрифугируют в течение 5 мин при 800 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а почву промывают водой от одного до пяти раз в зависимости от типа почвы (для песчаных и супесчаных почв достаточно одной промывки, для глинистых, суглинистых, черноземных — от двух до пяти раз) до получения прозрачной надосадочной жидкости.

После промывки к почве добавляют 45 см^3 насыщенного раствора натрия нитрата, тщательно размешивают и центрифугируют в течение 3 мин. При отсутствии натрия нитрата можно использовать раствор магния сульфата. После центрифугирования пробирки со смесью ставят в штатив и осторожно доливают раствор натрия нитрата до образования выпуклого мениска, а затем покрывают предметными стеклами размером 10 × 6 см, предварительно обезжиренными смесью спирта с эфиром (в соотношении 1:2) или прокипяченными в воде со щелочью или стиральным порошком. Смесь в пробирках отстаивают в течение 30 мин.

Во время отстаивания яйца нематод всплывают на поверхность и прилипают к стеклу. Затем стекла снимают, а на их место ставят чистые. На снятые стекла наносят несколько капель 50 %-ного водного раствора глицерина, капли накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Затем просматривают вторые стекла.

Для обнаружения яиц гельминтов предметные стекла просматривают при увеличении 80 раз (окуляр 10 × объектив 8), а для определения степени развития, жизнеспособности и степени деформации — при увеличении в 400 раз (окуляр 10 × объектив 40). Подсчитанное в двух предметных стеклах количество яиц нематод по видам дает характеристику степени загрязнения или обсемененности разных проб почвы яйцами гельминтов.

18 Метод исследования промежуточных и дополнительных хозяев нематод, цестод и трематод на зараженность

18.1 Общие положения

Промежуточных и дополнительных хозяев нематод, цестод и трематод собирают в местах вероятного обитания и исследуют их в живом виде.

Примечание — Инвазированные промежуточные хозяева являются источниками заражения животных гельминтами. Роль промежуточных хозяев выполняют различные представители беспозвоночных и позвоночных животных, в том числе млекопитающих, но в основном это беспозвоночные: брюхоногие и двустворчатые моллюски, малощетинковые, ракообразные, насекомые, паукообразные (отряд Parasitiformes — клещи) и др.

Собранных промежуточных хозяев вскрывают, расчленяют и исследуют тело беспозвоночного под стереоскопическим микроскопом. При этом применяют метод компрессорного исследования.

Беспозвоночное животное или части его тела кладут на предметное стекло, накрывают вторым предметным стеклом и, сдавливая, микроскопируют. Если беспозвоночные малых размеров и прозрачные (циклопиды, дафниды и пр.), то их накрывают покровным стеклом и микроскопируют при легком надавливании на покровное стекло препаровальной иглой.

Также применяют два ускоренных метода массовых исследований промежуточных хозяев.

Первый заключается в переваривании промежуточных хозяев в искусственном желудочном соке (соляная кислота — 7 $см^3$, пепсин — 5 г, дистиллированная вода — 1000 $см^3$). В термостате при температуре 37 °С—39 °С переваривание длится несколько часов, в осадке остаются живые личинки. Осадок частями исследуют под микроскопом. При этом можно исследовать по видам освобожденных от раковин моллюсков, ракообразных, насекомых, олигохет и других беспозвоночных.

Второй метод применяют при исследовании гаммарусов, водяных осликов, дафний и водных насекомых для выявления личинок нематод стрептокар, тетрамересов, эхинурий и др.

Беспозвоночных завертывают в кусочек мельничного шелка, тщательно разминают руками и закладывают в аппарат Бермана. В воронку наливают теплую воду и выдерживают 4—6 ч. Освободившиеся личинки нематод выходят и опускаются на дно пробирки. Осадок частями микроскопируют, одновременно исследуют большое количество промежуточных хозяев одного вида или рода.

18.2 Особенности исследования моллюсков, Mollusca

Остроконечными ножницами тело моллюска освобождают от раковины. Прочную раковину крупных моллюсков разрушают ударом молотка. При этом из моллюска вытекает жидкость, и в ней нередко обнаруживают церкарии, редии и другие личиночные формы гельминтов, поэтому моллюсков вскрывают в чашке Петри, на часовом стекле или в кювете. Тело моллюска расчленяют на отдельные части и органы, которые исследуют компрессорным методом.

Мелких моллюсков исследуют целыми, даже без снятия раковины, церкарии при этом свободно выходят из тела, активно двигаются в вытекающей жидкости. В тканях тела также можно заметить метацеркариев. Метацеркариев эхиностоматид птиц и млекопитающих определяют по наличию шипов на воротнике. Так как извлечение метацеркариев из тканей и органов моллюска затруднено, рекомендуется применять метод переваривания тела моллюсков в искусственном желудочном соке.

18.3 Особенности исследования муравьев, Formicidae

Муравьев с находящимися в них зрелыми метацеркариями дикроцелиумов находят вблизи муравейников, на растениях, чаще в оцепеневшем состоянии. Для исследования собирают оцепеневших муравьев. Брюшко муравья отсекают скальпелем, а затем под стереоскопическим микроскопом в капле воды расщепляют иглами.

18.4 Особенности исследования мух семейства Muscidae

Собранных с животных мух помещают в каплю физиологического раствора, вскрывают их при помощи игл под стереоскопическим микроскопом. При необходимости их исследуют под большим увеличением.

Приложение А
(справочное)

Пример записи в журнале результатов гельминтологических исследований

А.1 Пример записи в журнале результатов гельминтологических исследований проб фекалий от жвачных животных, соскобов из объектов внешней среды, почвы, промежуточных и дополнительных хозяев гельминтов приведен в таблице А.1.

Таблица А.1

№ п.п	Дата поступления проб	Дата взятия проб	Вид животных и место отбора проб (хозяйство, населенный пункт, владелец)	Количество поступивших проб	Дата исследования проб	Метод исследования					Количество обнаруженных инвазионных элементов (по классам и видам), экз.									Всего обнаружено инвазионных элементов, экз	Проведено культивирование, экз.	Погибло при культивировании (по видам), экз	Количество инвазионных элементов гельминтов в стандартном объеме пробы, экз	Должность, ФИО проводившего исследования
						Овоскопия			Ларвоскопия		Трематоды			Цестоды			Нематоды								
						Флотация	Седиментация	Комбинированный	Бермана	Вайда	Фасциолы	Дикроцелии	Парамфистомы	Мониезии	Тезаниезии	Авителины	Стронгилята желудочно-кишечного тракта	Стронгилята легочные	Другие					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

УДК 599.735.631.421.616-07.995.1:006.354 С19 ОКС 11.220

Ключевые слова: лабораторная диагностика гельминтозов жвачных животных, методы определения яиц и личинок гельминтов, пробы фекалий, объекты внешней среды, промежуточные и дополнительные хозяева, экстенсивность и интенсивность инвазии, определение жизнеспособности

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 10.12.2012. Подписано в печать 25.01.2013. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,80. Тираж 83 экз. Зак. 84.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru »@gostinfo.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru