ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

КРУПНЫЙ РОГАТЫЙ СКОТ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА

ГОСТ 25755—91

Издание официальное

82 р. 30 к. БЗ 1—92/18

КОМИТЕТ СТАНДАРТИЗАЦИИ И МЕТРОЛОГИИ СССР
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 636.9.001.4:006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

КРУПНЫЙ РОГАТЫЙ СКОТ

Методы лабораторной диагностики инфекционного ринотрахеита

ГОСТ 25755—91

Meat cattle Methods of laboratory diagnostics of infectious rynotracheitis

ОКСТУ 9809

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на крупный рогатый скот и устанавливает методы диагностики инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вызываемого вирусом бычьего герпеса типа 1.

1. ОТБОР ПРОБ

1.1. Пробы патологического материала берут от больных, вынужденно убитых и павших животных и от абортированных плодов.

1.2. Пробы патологического материала от подозреваемых в заболевании животных берут в период максимального проявления у них клинических признаков (температурная реакция, угнетение, воспалительные процессы в верхних дыхательных путях, серозные истечения из носовой полости и глаз, вульвовагиниты и аборты у коров, баланопаститы у быков), от вынужденно убитых и павших животных — не позднее 2 ч после убоя или падежа.

1.3. От больных животных берут смывы со слизистых оболочек носовой полости, глаз, влагалища, препуция, а также пробы спермы, от вынужденно убитых и павших животных — кусочки носовой перегородки, трахеи, гортани, легких, селезенки, средостенные лимфоузлы, от абортированных плодов — кусочки паренхиматозных органов и плаценты.

1.4. Смывы берут стерильными тампонами во флаконы с 2—5 $см^3$ питательной среды или раствора Хенкса с добавлением антибиотиков. Кусочки органов массой до 20 г помещают в стерильную посуду.

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1992

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

Флаконы с пробами патологического материала (смывы и органы), а также пробы спермы помещают в термос со льдом или углекислотой и доставляют в лабораторию не позднее 1 сут с момента их взятия

1 5 Допускается хранение патологического материала до начала исследований при температуре 4—6 °С в течение 2—3 сут При температуре минус 30 °С и ниже патологический материал хранят не более 10 сут

1 6 Пробы спермы хранят при температуре минус 20 °С не более 5 сут

1 7 Для ретроспективной диагностики от 15—20 животных берут стерильно парные пробы крови объемом не менее 5 $см^3$ Первую пробу отбирают на 2—3 сут болезни, вторую от тех же животных через 18—21 сут

Из крови методом отстоя получают сыворотку, замораживают при минус 10—30 °С и хранят до получения второй пробы

1 8 Сыворотки должны быть исследованы одновременно, не позднее 3 сут после последнего взятия крови Сыворотки крови, замороженные при температуре минус 20 °С и ниже, хранят не более 3 мес

2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2 1 Метод выделения вируса

Сущность метода заключается в выявлении цитопатического действия (ЦПД) вируса в культуре клеток и его последующей идентификации

2 1 1 *Аппаратура, материалы и реактивы*

Центрифуга с частотой вращения 5000 $мин^{-1}$

Холодильник, обеспечивающий температуру 4 и 8 °С

Пробирки бактериологические вместимостью 20 $см^3$

Пробирки центрифужные вместимостью 10 $см^3$

Пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$ по ГОСТ 25336

Флаконы пенициллиновые вместимостью 10—15 $см^3$

Термостат, обеспечивающий температуру (37±0,5) °С

Раствор Хенкса

Питательная среда для культуры клеток — 0,5 %-ный раствор гидролизата лактальбумина на растворе Хенкса или среда № 199

Антибиотики (стрептомицин сульфат, бензилпенициллин натриевая соль)

Культура клеток первично трипсинизированной почки эмбриона коровы или овцы, почки теленка или овцы, тестикул бычка и их субкультуры или перевиваемые линии клеток ПТ-80, ПТ, МДВК, ТР, ЛЭК

Вирус инфекционного ринотрахеита с титром не ниже $10^{4,0}$ ТЦД 50/см^3

Сыворотка гипериммунная специфическая к вирусу инфекционного ринотрахеита с титром не ниже 1 64

Сыворотка отрицательная, не содержащая антител к вирусу инфекционного ринотрахеита

2 1 2 *Подготовка к исследованию*

2 1 2 1 *Обработка смывов*

Флаконы с тампонами встряхивают в течение 2—3 мин, тампоны отжимают во флаконы и удаляют Содержимое флакона встряхивают и затем центрифугируют с частотой вращения 3000 мин$^{-1}$ в течение 10—15 мин Надосадочную жидкость пипеткой переносят в пробирку, добавляют антибиотики, выдерживают от 2 до 4 ч при 4 °С и используют для заражения культуры клеток

2 1 2 2 *Обработка органов*

Из кусочков органов готовят 10—20 % ную суспензию на растворе Хенкса, содержащем антибиотики Суспензию центрифугируют с частотой вращения 5000 мин$^{-1}$ в течение 20 мин Надосадочную жидкость пипеткой переносят в стерильную пробирку, выдерживают при 4—6 °С в течение 16—18 ч, затем используют для заражения культуры клеток

2 1 2 3 *Обработка спермы*

Пробы спермы размораживают, разбавляют 1 10 питательной средой для культур клеток с добавлением антибиотиков, замораживают 2—3 раза при минус 15—40 °С, оттаивают при 37—38 °С, центрифугируют с частотой вращения 2000 мин$^{-1}$ в течение 10 мин, надосадочную жидкость используют для заражения культуры клеток

2 1 3 *Проведение исследования*

Для выделения вируса из пробирок с монослоем культуры клеток удаляют ростовую среду и вносят по 0,2—0,3 см^3 каждого испытуемого материала — по 4—5 пробирок на каждую пробу Пробирки выдерживают при 37 °С в течение 1 ч, затем из них удаляют внесенную испытуемую жидкость Монослой 2—3 раза ополаскивают питательной средой для культур клеток с антибиотиками и добавляют по 1,0 см^3 той же среды

Контролем служат 4—5 пробирок с незараженной культурой клеток, в которых проводят смену ростовой питательной среды. Пробирки с испытуемым материалом и контрольные инкубируют при 37 °С в течение 5—6 сут, ежедневно микроскопируя для учета ЦПД вируса

Для выделения вируса проводят три последовательных пассажа с интервалом 5—6 сут Перед проведением повторного пассажа пробирки с испытуемым материалом замораживают при минус

20 °С и оттаивают при 37 °С, содержимое объединяют и используют для заражения новой партии культуры клеток

2.1.4 *Оценка результатов*

Пробу испытуемого материала считают отрицательной, если в третьем пассаже не будет обнаружено цитопатическое действие вируса. ЦПД вируса в культуре клеток устанавливают по наличию округления клеток, носящего вначале очаговый или диффузный характер с последующим отделением их от стекла. При наличии ЦПД в культуре клеток проводят идентификацию выделенного вируса.

2.2 *Метод идентификации вируса*

Сущность метода заключается в нейтрализующем действии антител специфической гипериммунной сыворотки, которые подавляют способность вируса вызывать ЦПД в культуре клеток.

2.2.1 Аппаратура, материалы, растворы, реактивы и питательные среды по п. 2.1.1.

2.2.2 *Проведение исследования*

Перед постановкой реакции нейтрализации специфическую и отрицательную сыворотки разводят в соотношении 1:10 питательной средой для культуры клеток и прогревают в водяной бане при 56 °С в течение 30 мин. В два ряда пробирок (по семь пробирок в каждом ряду) вносят по 2 см^3 сыворотки в пробирки первого ряда — специфическую, второго ряда — отрицательную сыворотку.

Готовят десятикратные разведения испытуемого вируса от 10^{-1} до 10^{-7} на питательной среде для культуры клеток в объемах, достаточных для постановки реакции, вносят разведенный вирус в два ряда пробирок с сывороткой, начиная с разведения 10^{-7}, в объеме 2 см^3 на пробирку. Пробирки со смесью разведенного вируса и сывороткой встряхивают и выдерживают 1 ч в термостате при 37 °С. Затем по 1 см^3 каждой смеси сыворотки с разведениями вируса вносят в четыре пробирки с культурой клеток. Для контроля служат незараженные культуры клеток (отрицательный контроль) и инфицированные разведениями вируса без сыворотки (положительный контроль). Пробирки инкубируют в термостате при 37 °С. Результаты реакции учитывают по цитопатическому действию вируса на 5—7 сут.

При этом признаки ЦПД в пробирках с незараженной культурой клеток должны отсутствовать и быть четко выражены в положительном контроле.

2.2.3 *Оценка результатов*

Вычисляют по методу Рида и Менча или Кербера титр типируемого вируса в присутствии специфической и отрицательной сывороток, выражаемый в ТЦД 50/см^3. Разность в титрах вируса с отрицательной и специфической сыворотками не менее чем на два логарифма свидетельствует о принадлежности возбудителя к вирусу бычьего герпеса типа 1.

2.3. Метод экспресс-диагностики с помощью ДНК-зонда

Сущность метода заключается в индикации и идентификации ДНК вируса ИРТ в исследуемом материале ^{32}Р-ДНК-зондом, который обладает способностью гибридизироваться (связываться) с комплементарным участком ДНК вируса ИРТ. Результаты гибридизации учитывают по радиоавтографу на рентгеновской пленке.

2.3.1. *Аппаратура, материалы, реактивы*

Холодильник, обеспечивающий температуру от минус 10 до плюс 4 °С.

Термостат лабораторный, обеспечивающий температуру 68 °С.

Сушильный шкаф с терморегулятором, обеспечивающий температуру 80 °С.

Центрифуга настольная с частотой вращения 2000 мин$^{-1}$.

Пробирки для микроанализа.

Цилиндры стеклянные по ГОСТ 1770 вместимостью 50, 100, 250, 500 см^3.

Микропипетки вместимостью от 0,005 см^3 до 1 см^3.

Стеклянные пипетки по ГОСТ 25336 вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 см^3.

Рентгеновская пленка РМ 11×11.

Кассеты для рентгеновской пленки 15×15 см по ТУ 6—17—1245.

Ванночки для проявления рентгеновской пленки.

Закрепитель для рентгеновской пленки.

Проявитель для рентгеновской пленки.

Капроновые фильтры размером 10×10 см с нанесенными незараженными культурами клеток и инфицированными разведениями вируса.

Набор для экспресс-диагностики ИРТ с помощью ДНК-зондов, в состав которого входят:

^{32}Р-ДНК-зонд;

натрий гидроокись по ГОСТ 4328, растворы с массовой концентрацией 1 моль/дм^3 и 0,5 моль/дм^3;

ацетат натрия по ГОСТ 199;

додецилсульфат натрия;

хлороформ;

раствор фенола насыщенный;

ледяная уксусная кислота по ГОСТ 61;

буферный раствор № 1 для предгибридизации;

буферный раствор № 2;

буферный раствор № 3;

буферный раствор № 4;

буферный раствор № 5 для разбавления.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

2.3.2. *Подготовка к исследованию*

2.3.2.1. *Приготовление рабочих растворов*

Раствор гидроокиси натрия с массовой концентрацией 1 моль/дм³ готовят, растворяя 4 г гидроокиси натрия в 10 см дистиллированной воды.

Раствор гидроокиси натрия с массовой концентрацией 0,5 моль/дм³ готовят разведением 2 см³ раствора гидроокиси натрия с массовой концентрацией 1 моль/дм³ в 2 см³ дистиллированной воды.

Раствор ацетата натрия — 1 флакон с ацетатом натрия растворяют в 20 см³ воды.

Раствор додецилсульфата натрия — 1 флакон с додецилсульфатом натрия растворяют в 500 см³ воды.

Буферный раствор № 1 — 1 флакон с лиофилизированным буферным раствором № 1 растворяют в 10 см³ воды и прогревают 15 мин при 68 °С.

Буферный раствор № 2 — 1 флакон с лиофилизированным буферным раствором № 2 растворяют в 0,5 см³ воды и прогревают 15 мин при 68 °С.

Буферный раствор № 3 — готов к применению.

Буферный раствор № 4 — 1 флакон с лиофилизированным буферным раствором № 4 растворяют в 500 см³ воды и прогревают 15 мин при 68 °С.

Буферный раствор № 5 — 1 флакон с лиофилизированным буферным раствором № 5 растворяют в 20 см³ воды.

2.3.2.2. *Приготовление рабочего разведения ^{32}Р-ДНК-зонда*

Рабочее разведение ^{32}Р-ДНК-зонда готовят непосредственно перед использованием. Во флакон с лиофилизированным ^{32}Р-ДНК-зондом добавляют 0,1 см³ 0,5 М раствора гидроокиси натрия и прогревают 10 мин при 68 °С, затем добавляют каплю ледяной уксусной кислоты, перемешивают и приливают 0,5 см³ буфера № 5. Раствор до его использования выдерживают при 68 °С в течение 10 мин. Раствор хранению не подлежит.

2.3.2.3. *Приготовление растворов для обработки капроновых фильтров*

Растворы для обработки капроновых фильтров готовят на основе буферного раствора № 4 и раствора додецилсульфата натрия

Раствор А — 25 см³ буферного раствора № 4 разводят водой до 100 см³.

Раствор Б — 10 см³ буферного раствора № 4 и 10 см³ раствора додецилсульфата натрия разводят водой до 200 см³.

Раствор В — 10 см³ буферного раствора № 4 и 2 см³ раствора додецилсульфата натрия разводят водой до 200 см³.

Раствор Г — 2,5 см³ буферного раствора № 4 и 25 см³ раствора додецилсульфата натрия разводят водой до 500 см³. Перед применением прогревают 1 ч при 60 °С.

2.3.2.4. *Обработка носовых смывов*

До исследования или первичной обработки смывы хранят при 4—6 °С не более 24 ч. Перед исследованием тампоны отжимают и удаляют, а оставшуюся жидкость центрифугируют с частотой вращения 3000^{-1} в течение 15—20 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, а осажденные на дно пробирки клетки ресуспендируют и повторно отмывают центрифугированием в растворе Хенкса или физрастворе (pH 7,2). После удаления надосадочной жидкости клеточный осадок суспендируют в 0,03—0,06 см^3 дистиллированной воды, добавляют к нему равный объем гидроокиси натрия с массовой концентрацией 1 моль/дм^3, выдерживают 10 мин при плюс 68 °С, охлаждают в бане со льдом 3—5 мин и добавляют такой же объем (0,03—0,06 см^3) буфера № 3.

2.3.2.5. *Обработка органов*

Из кусочков органов готовят 10—20 %-ную суспензию в 0,5 см^3 растворе Хенкса или физраствора.

Добавляют к суспензии 0,15 см^3 раствора додецилсульфата натрия, выдерживают 1 ч при 68 °С, центрифугируют 10 мин с частотой вращения 2000 мин$^{-1}$, отсасывают 0,5 см^3 раствора фенола и перемешивают в течение 1 мин, после чего центрифугируют с частотой вращения 2000^{-1}. Верхний слой переносят в отдельную пробирку и добавляют к нему 0,6 см^3 хлороформа, закрывают пробкой, перемешивают 20 с, центрифугируют 10 мин с частотой вращения 2000 мин$^{-1}$, отсасывают верхний слой и переносят в другую пробирку. Добавляют 0,06 см^3 раствора ацетата натрия и 1,2 см^3 96 % этилового спирта, выдерживают от 8 до 10 ч при температуре от минус 10 до минус 20 °С. Пробирки центрифугируют, сливают надосадочную жидкость, осадок промывают центрифугированием в 0,5 см^3 96 % этилового спирта и высушивают 30 мин при 68 °С в открытой пробирке. Сухие осадки растворяют в 0,04 см^3 раствора гидроокиси натрия концентрацией 0,5 моль/дм^3, выдерживают 10 мин при 68 °С, охлаждают 3—5 мин, помещая пробирку в лед, добавляют 0,02 см^3 буфера № 3.

2.3.2.6. *Обработка спермы*

Исследованию подвергают свежеполученные, замороженные в жидком азоте или высушенные на стекле или полистироле образцы спермы объемом 0,15 см^3. Исследуемые образцы разводят до объема 0,5 см^3 буферным раствором № 5 (высушенные образцы при этом вначале суспендируют в 0,015 см^3 дистиллированной воды). Добавляют к образцам по 0,02 см^3 рабочего раствора додецилсульфата натрия и выдерживают 1 ч при 37 °С. Дальнейшая обработка спермы проводится, как указано в п. 2.3.2.5.

2.3.3. *Проведение исследования*

Подготовленные для исследования пробы наносят в объеме 0,005 см^3 на капроновый фильтр, начиная с клетки № 5. На клетках № 1—2 адсорбирована ДНК вируса ИРТ (положительный контроль), на клетках № 3—4 отрицательный контроль.

После нанесения исследуемого материала фильтры высушивают при 68 °С в течение 10 мин. Затем замачивают в течение 10 мин при 20 °С в 100 см³ раствора А и помещают в полиэтиленовый пакет с 10 см³ буферного раствора № 1. Пакет с капроновым фильтром запаивают и помещают на 1 ч в термостат при 68 °С.

На обезжиренные стекла размером 15×15 см наносят 0,6 см³ рабочего разведения ^{32}Р-ДНК-зонда. Извлеченный из полиэтиленового пакета фильтр помещают лицевой стороной на стекло с нанесенным зондом и аккуратно протирают его для удаления пузырьков воздуха.

Стекло с притертым фильтром помещают в стерилизатор с подогретым до 80 °С вазелиновым маслом так, чтобы масло покрыло фильтр. Стерилизатор выдерживают 20 мин в сушильном шкафу при 80 °С, затем шкаф отключают и, не открывая, оставляют остывать до 55 °С. После этого шкаф открывают и охлаждают до комнатной температуры.

Отделяют фильтр от стекла, обезжиривают его в хлороформе, ополаскивают в 50 см³ раствора Б и выдерживают 10 мин при 20 °С в новой порции (150 см³) раствора Б. Далее капроновый фильтр промывают при 20 °С в 200 см³ раствора В и трехкратно в течение 15 мин (со сменой раствора) в 160 см³ раствора Г при 68 °С. Затем высушивают между листами фильтровальной бумаги при 68 °С в течение 15 мин.

Для получения радиоавтографа капроновый обработанный фильтр накладывают лицевой поверхностью на эмульсионный слой рентгеновской пленки, помещают в металлическую кассету и экспонируют 14—16 ч при 20 °С.

Удаляют капроновый фильтр, а рентгеновскую пленку общепринятым способом проявляют, фиксируют, высушивают на воздухе. Работы с рентгеновской пленкой проводят в темной комнате при красном свете.

2.3.4. *Оценка результатов*

Результаты исследования учитывают визуально. Положительный результат характеризуется наличием темного пятна на рентгеновской пленке в месте контакта ее с нанесенным на капроновый фильтр исследуемым материалом, сопоставимого по контрастности с положительным контролем (клетки 1—2) и отсутствием потемнения пленки при отрицательном контроле (клетки 3—4). При отрицательном результате на месте контакта с исследуемым материалом пленка остается прозрачной.

Получение положительного результата свидетельствует о контаминации исследуемого материала вирусом ИРТ. В комплексе с клиническими и эпизоотологическими данными служит основанием для постановки диагноза на инфекционный ринотрахеит.

2.4. Метод иммунофлуоресценции

Сущность метода заключается в обнаружении с помощью флу-

оресцирующих антител вируса инфекционного ринотрахеита в мазках отпечатках и гистологических срезах, приготовленных из легких, трахеи, почек, гортани и лимфатических узлов

2 4 1 *Аппаратура, материалы и реактивы*

Микроскоп люминесцентный

Термостат обеспечивающий регулирование температуры 37 °С

Микротом с замораживающим столиком

Стекла предметные по ГОСТ 9284

Стекла покровные по ГОСТ 6672

Чашки Петри

Пипетки пастеровские

Ацетон по ГОСТ 2603

Натрий хлористый по ГОСТ 4233

Натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 4172

Натрий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 245

Масло нефлуоресцирующее

Иммуноглобулины флуоресцирующие (коньюгат) против вируса инфекционного ринотрахеита

Конъюгат нормального глобулина

2 4 2 *Подготовка к исследованию*

Для обнаружения возбудителя из патологического материала готовят мазки отпечатки или среды на замораживающем микротоме толщиной 3—5 мм Препараты подсушивают на воздухе, фиксируют в ацетоне 10 мин при комнатной температуре и отмывают в проточной водопроводной воде 5—10 мин.

Препараты подсушивают и наносят флуоресцирующие иммуноглобулины в рабочем разведении

Обработку ведут во влажной камере при 37 °С в течение 40 мин Затем препараты ополаскивают в физиологическом растворе (pH 7,2—7,4), три раза меняя раствор, в дистиллированной воде и подсушивают на воздухе На препарат наносят нефлуоресцирующее масло

Для контроля часть мазков отпечатков или срезов аналогично обрабатывают конъюгатом нормального глобулина

2 4 3 *Проведение исследования*

Мазки-отпечатки или срезы просматривают под люминесцентным микроскопом в сине-фиолетовых лучах.

2 4 4 *Обработка результатов*

Наличие яркого желто-зеленого цвета диффузного свечения цитоплазмы клеток свидетельствует об обнаружении возбудителя болезни В контрольных препаратах наблюдают тусклое зеленовато-серое свечение ткани

2 5. Метод реакции нейтрализации (РН)

Сущность метода заключается в подавлении цитопатического действия вируса в культуре клеток нейтрализующими антителами сыворотки крови.

2 5.1 *Аппаратура, материалы и реактивы*

Аппаратура, материалы и реактивы — по пп 2.1 1 и 2.1.2

2 5.2 *Проведение исследования*

Исследуемые сыворотки прогревают в водяной бане при 56 °С в течение 30 мин. Готовят двукратные разведения исследуемых сывороток от 1 2 до 1 64 в объеме 0,5 см^3 на питательной среде для культуры клеток с антибиотиками Затем готовят необходимый объем вируса, содержащего 100 ТЦД 50 в 0,1 см^3 и добавляют его в количестве 0,5 см^3 в каждую пробирку с сывороткой соответствующего разведения Смесь сыворотки и вируса встряхивают, выдерживают в термостате в течение 1 ч при 37 °С, после чего в четыре пробирки с культурой клеток вносят по 0,2 см^3 смеси сыворотки и вируса и по 0,8 см^3 поддерживающей среды с антибиотиками Контролем служат пять пробирок с незараженной культурой клеток, в которых производят смену питательной среды

Для контроля 100 ТЦП вируса готовят десятикратные разведения его, начиная с исходного до 10^{-3} (исходное разведение соответствует рабочему разведению вируса, взятого для постановки реакции) В пробирки с культурой клеток вносят (по четыре пробирки на каждое разведение) разведение вируса по 0,1 см^3 и по 0,9 см^3 среды Опытные и контрольные пробирки помещают в термостат при 37 °С

2 5 3 *Оценка результатов*

Контроль дозы вируса проводят после проявления ЦПД вируса в контрольном ряду пробирок. Цитопатическое действие вируса должно отмечаться в разведениях — исходном, 10^{-1}, 10^{-2} (не менее двух пробирок) В разведении 10^{-3} ЦПД должно отсутствовать.

В пробирках с незараженной культурой клеток ЦПД не должно наблюдаться.

Титром сыворотки считают предельное ее разведение, задерживающее развитие цитопатического действия вируса в 50 % зараженных культур клеток Положительной считается сыворотка, нейтрализующая 100 ТЦД вируса в разведении 1:2 и выше Ретроспективный диагноз на инфекционный ринотрахеит ставят при двух-, четырехкратном и более приросте антител в пробах сывороток крови переболевших животных.

2 6 Метод реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)

Сущность метода заключается в способности антител исследуемой сыворотки вызывать агглютинацию эритроцитов с адсорбированным на их поверхности специфическим ИРТ антигеном.

2 6 1 *Аппаратура, материалы и реактивы*

Аппарат для микротитрования типа «Такачи», «Титртек» или микропипетки.

Набор эритроцитарного диагностикума для серодиагностики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в РНГА, в состав которого входят:

жидкий специфический вирус ИРТ эритроцитарный антиген — 3 %;

жидкий контрольный эритроцитарный антиген — 3 %;

сухая специфическая сыворотка крупного рогатого скота к вирусу ИРТ;

сухая отрицательная сыворотка крупного рогатого скота;

сухая нормальная сыворотка кролика (для разбавителя).

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 4172.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198.

Формалин технический.

Дистиллированная вода по ГОСТ 6709.

2.6.2. *Подготовка к исследованию*

2.6.2.1. *Приготовление фосфатно-буферного физиологического раствора (ФБР)*

0,85 г хлористого натрия растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см³ в небольшом (60—80 см³) количестве дистиллированной воды, вносят 2,06 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, растворяют соль, а затем вносят 0,46 г KH_2PO_4, растворяют ее и доводят общий объем до 100 см³ дистиллированной водой. pH буфера должен быть 7,2—7,4.

2.6.2.2. *Приготовление разбавителя*

К 100 см³ ФБР добавляют 1 см³ нормальной сыворотки кролика, затем смесь прогревают при температуре 65—66 °С в течение 40 мин, охлаждают до комнатной температуры, добавляют 0,3 см³ формалина, фильтруют через бумажный фильтр. Разбавитель хранят при комнатной температуре.

2.6.2.3. *Приготовление рабочих концентраций специфического и контрольного эритроцитарных антигенов*

Рабочие растворы специфического и контрольного эритроцитарных антигенов в день постановки реакции готовят разбавлением имеющихся в наборе эритроцитарных антигенов разбавителем в три раза, то есть к 1 см³ антигена добавляют 2 см³ разбавителя.

2.6.2.4. *Подготовка сухих сывороток*

Сухие сыворотки разводят добавлением к содержимому ампулы 1 см³ дистиллированной воды.

2.6.3. *Проведение исследования*

В лунки микропанели с помощью капельницы вносят по 0,05 см³ разбавителя. В первые лунки специальной петлей или пипеткой вносят исследуемые сыворотки в количестве 0,05 см³. На каждую исследуемую сыворотку используют два ряда лунок. Последующими переносами получают двукратные разведения сыво-

роток от 1:2 до 1:256. Затем в первый ряд лунок вносят по 0,025 см³ рабочего разведения специфического эритроцитарного антигена, а во второй ряд — по 0,025 см³ рабочего разведения контрольного эритроцитарного антигена. Панель осторожно встряхивают, закрывают крышкой и ставят в холодильник при температуре от 4 до 8 °С на 16—24 ч.

Одновременно проводят контроль на активность специфического эритроцитарного антигена со специфической сывороткой. Для этого в ряд лунок микропанели вносят разбавитель (по 0,05 см³), в первую лунку вносят 0,05 см³ специфической сыворотки и последующими переносами получают двукратные разведения сывороток от 1:2 до 1:1024. Затем во все лунки вносят по 0,025 см³ специфического эритроцитарного антигена.

Контроль на отсутствие агглютинации специфического и контрольного эритроцитарных антигенов отрицательной сывороткой крупного рогатого скота проводят следующим образом.

В два ряда лунок микропанели вносят по 0,05 см³ разбавителя (в первые лунки по 0,05 см³ отрицательной сыворотки) и делают двукратные разведения. Затем в первый ряд вносят по 0,025 см³ специфического эритроцитарного антигена, а во второй ряд по 0,025 см³ контрольного эритроцитарного антигена

Контроль на отсутствие спонтанной агглютинации специфического и контрольного эритроцитарных антигенов проводят следующим образом.

В лунки микропанели вносят разбавитель по 0,05 см³, а затем добавляют в один ряд по 0,025 см³ специфического, а во второй ряд по 0,025 см³ контрольного эритроцитарного антигена (в рабочем разведении).

2 6 4 *Оценка результатов*

Оценку результатов проводят на следующий день. За титр в РНГА принимают наивысшее разведение сыворотки, дающее четкую агглютинацию, проявляющуюся в виде зонта Оценку реакции проводят только при условии четких результатов контроля.

При контроле реакции титр специфической сыворотки со специфическим вирусом ИРТ эритроцитарным антигеном должен быть не ниже 1 128, с контрольным эритроцитарным антигеном — не выше 1 4

Титр отрицательной сыворотки со специфическим и контрольным эритроцитарным антигеном не должен превышать 1:4

В контрольных лунках на спонтанную агглютинацию эритроциты должны осесть в виде точки или плотного кольца.

Результаты РНГА с испытуемыми сыворотками оценивают по титрам антител со специфическим антигеном и в зависимости от наличия антител к контрольному эритроцитарному антигену.

При наличии в испытуемых сыворотках антител к контрольному эритроцитарному антигену в титрах не выше 1:4 положитель-

ными считают сыворотки, дающие по специфическим к вирусу ИРТ эритроцитарным антигенам титры 1 16 и выше

При наличии в испытуемых сыворотках антител с контрольным эритроцитарным антигеном в титрах более 1 4 положительными считают сыворотки, которые со специфическим к вирусу ИРТ эритроцитарным антигеном дают титры в четыре и более раз выше Увеличение титров антител в парных сыворотках в четыре раза и выше свидетельствует о наличии инфекции

2 7 Метод иммуноферментного анализа (ИФА)

Сущность метода заключается в специфическом взаимодействии антител и антигена с последующим присоединением к полученному комплексу антивидового иммуноглобулина, меченого ферментом, способным вызывать разложение субстрата с образованием цветного продукта

2 7 1 *Аппаратура, материалы и реактивы*

Считывающее устройство (спектрофотометр с вертикальным лучом)

Промывающее устройство

Многоканальные и одноканальные дозирующие микропипетки объемом от 0,05 до 1,0 см^3

Стеклянные пипетки по ГОСТ 25336 вместимостью 1 и 2 см^3.

Набор флаконов для иммуноферментной диагностики ИРТ

Биологические компоненты

специфический антиген ИРТ,

специфическая положительная сыворотка,

отрицательная сыворотка,

иммуноферментный (пероксидазный) антивидовой конъюгат,

инертный белок (овальбумин, альбумин человека или лошадиная сыворотка)

Химические компоненты

калий фосфорнокислый однозамещенный KH_2PO_4 по ГОСТ 4198,

калий фосфорнокислый двузамещенный $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ по ГОСТ 2493,

натрий хлористый NaCl по ГОСТ 4233,

твин 20 (тритон Х 305),

лимонная кислота ($C_6H_8O_7$) по ГОСТ 3652,

О фенилендиамин по ТУ 6—09—08—1127,

гидроперит,

гидроокись калия по ГОСТ 24363, раствор с массовой концентрацией 0,1 моль/дм^3;

кислота серная по ГОСТ 4204,

кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор с массовой концентрацией 0,1 моль/дм^3,

спирт ректификованный по ГОСТ 5962,

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

2.7.2. *Подготовка к исследованию*

2.7.2.1. *Приготовление рабочих растворов*

Адсорбционный буферный раствор (калий-фосфатный концентрации 0,01 моль/дм³ pH 7,2—7,4) — предназначен для растворения антигена. Содержимое флаконов № 6, 7 и 8 растворяют в 5 дм³ дистиллированной воды, фильтруют, проверяют pH. При необходимости pH корректируют раствором гидроокиси калия или соляной кислоты концентрации 0,1 моль/дм³.

Инкубационный буферный раствор предназначен для растворения сывороток, конъюгата, а также для промывки микропанелей. К 4,5 см³ адсорбционного буфера добавляют содержимое флакона № 9.

Субстратный буферный раствор (фосфатно-цитратный, pH 5,0—5,2) предназначен для приготовления субстрата. Состоит из двух компонентов: растворов А и Б.

Раствор А

Содержимое ампулы (флакона) № 10 растворяют в 50 см³ дистиллированной воды в мерной колбе.

Раствор Б

Содержимое ампулы (флакона) № 11 растворяют в 50 см³ дистиллированной воды в мерной колбе, затем к 24,3 см³ раствора А добавляют 25,7 см³ раствора Б и 50 см³ дистиллированной воды, проверяют pH. В случае необходимости для установления требуемого pH добавляют небольшими порциями кислотный (А) или щелочной (Б) компоненты буфера.

Индикаторный раствор. Готовят непосредственно перед использованием. Применяют для цветного проявления реакции на последней ее стадии.

Содержимое одной ампулы (флакона) № 12 растворяют в 2 см³ спирта-ректификата и добавляют 48 см³ субстратного буфера, вносят 0,8 см³ перекиси водорода, полученной путем растворения одной таблетки № 13 и 10 см³ дистиллированной воды.

Изменение цвета субстратного раствора (пожелтение раствора до внесения в микропанели) является следствием использования для его приготовления недостаточно чистой посуды. В таком случае раствор подлежит замене.

Раствор серной кислоты. 2 см³ концентрированной серной кислоты растворяют в 18 см³ дистиллированной воды. Раствор применяют для остановки реакции.

Буферные растворы и раствор серной кислоты хранят при температуре 4—6 °С не более 3 мес. Субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием. Раствор хранению не подлежит.

2.7.2.2. *Подготовка биологических компонентов набора*

Содержимое каждой ампулы (флакона) со специфическим антигеном растворяют в 20 см³ адсорбционного буферного раствора. Содержимое ампул с антивидовым иммуноферментным конъюгатом и инертным белком растворяют в 20 см³ инкубационного буферного раствора. Положительную и отрицательную сыворотки растворяют в 5 см³ инкубационного буферного раствора, получая разведения 1:100.

Растворенные антигены сыворотки, антивидовой конъюгат хранят при 4—6 °С 3—4 недели, раствор белка — в течение 2—3 мес при минус 20 °С.

2.7.3. *Проведение исследования*

2.7.3.1. *Сорбция антигена на микропанели*

В лунки микропанелей вносят по 0,1 см³ рабочего раствора специфического антигена, приготовленного, как указано в п. 2.7.2.2, закрывают крышкой и выдерживают при 4 °С в течение 16—18 м.

Микропанели промывают инкубационным буферным раствором три раза по 5 мин путем заполнения лунок и удаления раствора сливанием или отсасыванием с помощью вакуумного насоса или специального промывающего устройства. Порцию промывочного раствора используют однократно.

Неиспользованные микропанели с адсорбированным антигеном высушивают при комнатной температуре и хранят при 4—6 °С не более 3 мес.

Во все лунки вносят по 0,1 см³ раствора инертного белка, приготовленного, как указано в п. 2.7.2.2, и помещают в термостат на 30 мин.

Микропанели повторно промывают инкубационным буферным раствором три раза по 5 мин.

2.7.3.2 *Разведение сывороток*

Каждую лунку микропанели заполняют инкубационным буферным раствором в объеме 0,1 см³.

В первую лунку первого горизонтального ряда, предназначенного для контроля качества субстрата, добавляют дополнительно 0,1 см³ указанного буферного раствора (отрицательный контроль).

В первую лунку второго горизонтального ряда вносят 0,1 см³ отрицательной сыворотки (отрицательный контроль).

В первую лунку третьего горизонтального ряда вносят 0,1 см³ специфической положительной сыворотки, приготовленной, как указано в п. 2.7.2.2 (положительный контроль).

В первую и пятую лунки остальных горизонтальных рядов вносят по 0,1 см³ исследуемых парных проб сывороток, предварительно разведенных 1:100 в инкубационном буферном растворе в отдельных пробирках или планшетах.

Содержимое всех рядов титруют методом двукратных разведений в объеме 0,1 см³ в четырех лунках, используя при этом пипетки или сменные наконечники к микропипеткам, и получают

разведения сывороток от 1:200 до 1:1600. Из последних лунок каждого ряда по 0,1 см³ содержимого удаляют.

Микропанели закрывают крышкой и выдерживают при 37 °С в термостате 1—1,5 ч.

2.7.3.3. *Внесение конъюгата*

Все лунки микропанелей промывают три раза по 5 мин инкубационным буферным раствором, как указано в п. 2.7.3.1, вносят по 0,1 см³ рабочего раствора иммуноферментного конъюгата, подготовленного, как указано в п. 2.7.2.2, и инкубируют в термостате при 37 °С 1 ч.

Промывают три раза по 5 мин инкубационным буферным раствором.

Вносят субстратный буферный раствор по 0,1 см³ во все лунки микропанелей и выдерживают их в темноте при комнатной температуре 10—30 мин.

Затем реакцию останавливают, добавляя в каждую лунку раствора серной кислоты в объеме 0,05 см³.

2.7.4. *Оценка результатов*

Результаты оценивают визуально или при помощи спектрофотометра не позднее 3 ч после остановки реакции.

Визуальная оценка. При наличии специфических антител (положительная проба) ряд лунок с исследуемыми сыворотками имеет оранжево-коричневое окрашивание в разведениях сыворотки 1:200, сравнимое с цветом раствора в положительном контроле (3-й горизонтальный ряд микропанели).

Отрицательными считают пробы, не изменившие окраску, или имеющие слабое пожелтение, аналогичное цвету отрицательных контролей.

Спектрофотометрический учет. Регистрацию результатов реакции проводят на специальных фотометрах с вертикальным лучом при длине волны 490 нм. Результаты выражают в единицах оптической плотности ($ОП_{490}$).

Положительными считают пробы, $ОП_{490}$ которых, начиная с разведения 1:200, в два и более раз превосходит уровень оптической плотности отрицательного контроля, но при этом не должен быть ниже 0,200 ед.

Сомнительными пробами считают такие пробы, $ОП_{490}$ которых выше отрицательного контроля и составляет 0,150—0,199 ед.

Уровень оптической плотности ниже 0,150 ед. свидетельствует об отрицательной реакции.

Основанием для постановки диагноза на ИРТ является увеличение титра антител в парных пробах сывороток в 2 и более раз. При этом учитывают эпизоотическую ситуацию в хозяйстве, наличие клинических и патологоанатомических признаков заболевания.

Обнаружение положительных проб при эпизоотологическом

обследовании животных, ранее не вакцинированных против ИРТ, свидетельствует о циркуляции в стаде возбудителя болезни и служит основанием для произведения дополнительных исследований по уточнению диагноза.

Сыворотки, давшие сомнительную реакцию, подлежат повторному исследованию и при подтверждении первоначального результата считаются положительными.

2.8. Метод реакции латексагглютинации (РЛА)

Сущность метода заключается в специфическом взаимодействии антител исследуемой сыворотки с антигеном, иммобилизованным на поверхности латексных частиц, приводящем к агглютинации последних.

2.8.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

96-луночные полистироловые микропанели (планшеты) для иммунологических реакций с U-образным дном.

Дозирующие одноканальные или многоканальные пипетки объемом 0,05—0,25 см³.

Капельницы и пипетки микротитраторов типа «Такачи» или «Титертек» для титрования в объемах 0,025; 0,05 и 0,1 см³.

Стеклянные градуированные пипетки по ГОСТ 25336 вместимостью 1,0; 5,0; 10,0 см³.

Шприц медицинский объемом 5 см³ с иглами.

Диагностический набор, содержащий следующие компоненты:

№ 1 — конъюгат латекса со специфическим антигеном;

№ 2 — специфическую положительную сыворотку;

№ 3 — отрицательную сыворотку;

№ 4 — бычий сывороточный альбумин;

№ 5 — 10-кратный концентрат рабочего буферного раствора.

2.8.2. *Подготовка к исследованию*

2.8.2.1. *Приготовление рабочего буферного раствора*

Рабочий буферный раствор (0,2 М глицерин-гидроокись натрия с 0,15 М NaCl, pH 8,5—8,7) предназначен для титрования сывороток и постановки реакции. Для его приготовления компонент № 5 растворяют в 180 см³ дистиллированной воды, фильтруют, проверяют pH. При необходимости доводят pH до 8,5—8,7 растворами гидроокиси натрия или соляной кислоты с массовой концентрацией 1 моль/дм³. Компонент № 4 растворяют в полученном буферном растворе. Рабочий буферный раствор хранят при температуре 4—6 °С в течение 1 мес.

2.8.2.2. *Подготовка биологических компонентов набора*

Латексный конъюгат (компонент № 1) тщательно суспендируют в 2 см³ дистиллированной воды, используя шприц с иглой.

Компоненты № 2 и № 3 растворяют в 1 см³ дистиллированной воды.

В растворенном состоянии биологические компоненты набора хранят при температуре 4—6 °С в течение 1 мес. Перед каждым новым исследованием осадок латекса необходимо ресуспендировать с помощью шприца.

2.8.2.3. *Приготовление рабочей суспензии латексного конъюгата*

Суспензию латексного конъюгата смешивают с рабочим буферным раствором в соотношении 1:50 и тщательно перемешивают, стараясь избежать вспенивания раствора. Рассчитывают количество рабочего буферного раствора, необходимое для постановки РЛА. При этом учитывают количество исследуемых проб сывороток и объема, в котором проводится титрование образцов. Рабочую суспензию латексного конъюгата используют в течение 15 мин с момента приготовления.

2.8.3. *Проведение исследования*

Исследуемые и контрольные сыворотки предварительно разводят 1:20 физиологическим раствором (pH 7,2—7,4).

Во все лунки планшетов для иммунологических реакций вносят по 0,05 см^3 рабочего буферного раствора. В первые 10 лунок горизонтального ряда (ряд А) вносят по 0,05 см^3 предварительно разведенных исследуемых сывороток, а в 11-ю и 12-ю лунки — аналогичный объем контрольных (положительную и отрицательную сыворотки — компоненты № 2 и № 3). Содержимое всех рядов титруют методом двукратных разведений в объеме 0,05 см^3, получая разведения сывороток от 1:40 до 1:5120. Из последних лунок каждого ряда удаляют 0,05 см^3 содержимого. Титрование сывороток осуществляется многоканальной пипеткой или с помощью микротитраторов, согласно прилагаемым к ним инструкциям. Допускается проводить титрование сывороток в объемах 0,025 и 0,1 см^3 при наличии соответствующего оборудования.

Во все лунки планшетов вносят рабочую суспензию латексного конъюгата, приготовленную, как указано в п. 3.8.2.3, в объеме, равном объему, в котором проводили титрование сывороток. Планшет накрывают крышкой, аккуратно встряхивают и оставляют на столе при комнатной температуре.

2.8.4. *Оценка результатов*

Результаты учитывают через 12—16 ч после постановки реакции. Образование на сферической поверхности дна лунок диффузного осадка в виде «зонтика», как и в лунках 11-го вертикального ряда планшета (положительный контроль), свидетельствуют о положительном результате исследования, характеризующем наличие специфических антител в исследуемых сыворотках.

Образование на дне лунок в центре осадка в виде «точки», как и в лунке 12-го вертикального ряда планшета (отрицательный контроль), свидетельствует об отрицательном результате исследо-

вания, характеризующем отсутствие специфических антител в исследуемых сыворотках.

Одновременное образование осадка в виде «зонтика» и «точки» в лунках с исследуемой сывороткой при отсутствии подобного явления в контрольных рядах свидетельствует о сомнительном результате исследования.

Титром сывороток, исследуемых в РЛА, считают такое их максимальное разведение, при котором на дне лунки четко определяется диффузный осадок в виде «зонтика» без следов «точки». Сыворотки, давшие сомнительный результат, подлежат повторному исследованию и при подтверждении результатов считаются положительными.

Основанием для постановки диагноза на ИРТ является увеличение титра антител в парных сыворотках в четыре и более раз. При этом учитывается эпизоотическая ситуация в хозяйстве, наличие клинических и патологоанатомических признаков заболевания.

Обнаружение положительных проб при эпизоотологическом обследовании животных, ранее не вакцинированных против ИРТ, свидетельствует о циркуляции в стаде возбудителя болезни и служит основанием для проведения дополнительных исследований по уточнению диагноза.

2.9. Метод ранней диагностики ИРТ по выявлению специфических антител в носоглоточных смывах

Сущность метода заключается в выявлении специфических к вирусу ИРТ антител в носоглоточных смывах больных животных в серологических реакциях (РНГА, ИФА и др.). Метод позволяет диагностировать ИРТ на 3-и — 7-е сут болезни.

2.9.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Аппаратура, материалы и реактивы — по пп. 2.6.1, 2.7.1.

2.9.2. *Подготовка к исследованию* — по пп. 2.6.2, 2.7.2.

2.9.3. *Получение материала для исследования*

Исследованию подлежат носоглоточные смывы, полученные от 8—10 подозреваемых в заболевании ИРТ животных при появлении первых клинических признаков заболеваний и на 3-и — 7-е сут наблюдения.

Для получения носоглоточных смывов используют резиновые трубки длиной 25—30 см, диаметром 1,5—2,0 см с проволочными петлями внутри. В петли вставляют кусочки поролона размером 1×3×6 см и втягивают внутрь трубок. Поверхность трубок смазывают вазелином. Трубки вводят по нижнему носовому ходу на глубину 20—25 см и выталкивают проволочной петлей поролон. Через 2—3 мин пропитанный слизью поролон втягивают внутрь трубки и вместе с ней извлекают из носового хода. Помещают кусочки поролона в пенициллиновые флаконы, содержащие 4,5 $см^3$

стерильного физраствора и закрывают резиновыми пробками. Материал транспортируют в лабораторию в термосе со льдом или жидким азотом или консервированным мертиолятом 1:10000.

2.9.3.1. *Подготовка носоглоточных смывов к исследованию*

Кусочки поролона при помощи пинцетов тщательно отжимают, извлекают из флаконов и обеззараживают кипячением. Смывы переносят в центрифужные пробирки, центрифугируют 10—15 мин с частотой вращения 2000—2500 мин$^{-1}$ для освобождения от клеточного детрита и подвергают исследованию. При необходимости смывы хранят в замороженном состоянии при минус 20—70 °С в течение 30—60 сут.

2.9.4. *Проведение исследований*

Исследования в РНГА проводят в соответствии с п. 2.6.5, в ИФА — п. 2.7.3, используя вместо испытуемых сывороток подготовленные носоглоточные смывы. В РНГА носоглоточные смывы исследуют в разведенном от 1:2 до 1:256, в ИФА — в нативном виде и в разведениях 1:2, 1:4, 1:8.

2.9.5. *Оценка результатов*

Результаты РНГА оценивают согласно п. 2.6.6, результаты ИФА — по п. 2.7.4.2.

Результаты исследований на ИРТ считают положительными при отсутствии антител в первично полученном материале и появлении их в любых титрах в повторных, полученных на 3-и — 7-е сут болезни, пробах.

При обнаружении антител в первично полученном материале основанием для постановки диагноза на ИРТ является четырехкратное и выше увеличение их титров в повторных пробах.

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, **А. Э. Аваков**, канд. хим. наук; **В. Н. Денисенко**, канд. вет наук; **О. И. Сухарев**, д-р вет. наук

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 27.12.91 № 2240

3. **СРОК ПРОВЕРКИ** — 1996 г.,
периодичность проверки — 5 лет

4. **ВЗАМЕН ГОСТ 25755—83**

5. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта	Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 61—75	2.3.1	ГОСТ 4328—77	2.3.1
ГОСТ 199—78	2.3.1	ГОСТ 5962—67	2.7.1
ГОСТ 245—76	2.4.1	ГОСТ 6709—72	2.3.1, 2.7.1
ГОСТ 1770—74	2.3.1	ГОСТ 6672—75	2.4.1
ГОСТ 2493—75	2.7.1	ГОСТ 9284—75	2.4.1
ГОСТ 2603—79	2.4.1	ГОСТ 24363—80	2.7.1
ГОСТ 3118—77	2.7.1	ГОСТ 25336—82	2.1.1, 2.3.1, 2.7.1
ГОСТ 3652—69	2.7.1		
ГОСТ 4172—76	2.4.1	ТУ 6—17—1245—78	2.3.1
ГОСТ 4198—75	2.6.1		
ГОСТ 4204—77	2.7.1	ТУ 6—09—08—1127—78	2.7.1
ГОСТ 4233—77	2.4.1, 2.7.1		

Редактор *Т. П. Шашина*
Технический редактор *О. Н. Никитина*
Корректор *А. И. Зюбан*

Сдано в наб 29.01.92 Подп в печ 15.04.92 Усл печ. л. 1,5. Усл. кр.-отт. 1,5. Уч.-изд. л. 1,45.
Тираж 386 экз.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, ГСП,
Новопресненский пер., 3.
Калужская типография стандартов, ул. Московская, 256. Зак. 361

gost.e-ecolog.ru