

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра -

Главный государственный

санитарный врач

Республики Беларусь



М.И. Римжа

2008 г.

Регистрационный № 108-1207

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ
НА НАЛИЧИЕ ООЦИСТ КРИПТОСПОРИДИЙ,
ЦИСТ ЛЯМБЛИЙ, ЯИЦ ГЕЛЬМИНТОВ
НА ОСНОВЕ АДСОРБЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

государственное учреждение «Научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОР: д.б.н. Скрипова Л.В.

Минск, 2008

Настоящая инструкция устанавливает метод лабораторного исследования качества воды на наличие ооцист криптоспоридий, цист лямблий, яиц гельминтов с целью безопасности для здоровья человека, проводимого в порядке исполнения Закона Республики Беларусь «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

Инструкция применяется в лабораториях учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, а также ведомственный контроль качества воды расфасованной, воды поверхностных и подземных водоисточников, централизованного водоснабжения, в т. ч. на соответствие:

– СанПиН 2.1.4-1074-01 «Питьевая вода и водоснабжение населенных мест. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения»;

– СанПиН 10-124 РБ 99 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества» раздел «паразитологический показатель»;

– СанПиН 2.3.4.10-47-2005 «Вода питьевая. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества», раздел «паразитологический показатель».

Инструкция предназначена для врачей-паразитологов, врачей-лаборантов по паразитологии санитарно-эпидемиологических учреждений, а также лабораторий ведомственных организаций.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

- Центрифуга с гнездами для пробирок 10 мл
- Микроскоп для микробиологических исследований
- Весы лабораторные
- Шпатель, штативы лабораторные
- Предметные и покровные стекла, стеклянные палочки, цилиндры, колбы, стаканы измерительные
- Пробирки центрифужные на 10, 50 мл
- Нить капроновая или леска, бигуди вместо контейнера
- Дистиллированная или кипяченая вода
- Синька метиленовая или малахитовая зелень
- Спирт этиловый 96°
- Серный эфир
- Серная и соляная (1%) кислоты
- Карболовый фуксин
- Концентрат гидробиологический и десорбент (ТУ РБ 100558032.096-2003; № 016566)
- Раствор Люголя 1%
- Глицерин 30%
- Детергент 0,5%

- Сульфат аммония $[(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4]$ х.ч.
- Сульфат железа $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3]$ х.ч.
- Сульфат меди (Cu SO_4) х.ч.
- Окись алюминия (Al_2O_3)

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Осуществление государственного санитарного надзора и производственного лабораторного контроля качества воды хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования из поверхностных и подземных водоисточников, плавательных бассейнов, централизованного и децентрализованного водоснабжения, а также расфасованной.
2. Предупредительный и текущий санитарный надзор.
3. Оценка эффективности оздоровительных мероприятий в очагах и микроочагах паразитозов.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Метод обнаружения ооцист криптоспоридий, цист лямблий, яиц гельминтов в воде предназначен:

- для обнаружения в воде ооцист криптоспоридий, цист лямблий и яиц гельминтов, представляющих непосредственную угрозу здоровью человека;
- для осуществления контроля качества воды по паразитологическим показателям: в расфасованной, поверхностных водоемах, ручьях, каптажах, колодцах, артезианских скважинах, в распределительной сети систем централизованного, хозяйственно-питьевого водоснабжения, в водоемах рекреационного назначения и плавательных бассейнах.

Принцип метода: ооцисты криптоспоридий, цисты лямблий и яйца гельминтов адсорбируются на коагуляционных сорбентах.

Метод обладает чувствительностью обнаружения ооцист криптоспоридий, цист лямблий и яиц гельминтов, равным единичным экземплярам в литрах, миллилитрах воды. Эффективность выделения возбудителей данным методом зависит от исходной концентрации паразитарных патогенов в пробе, объеме пробы.

Приготовление реактивов

Детергент: в мерный цилиндр, при помощи мерной пипетки вносят 0,5 мл раствора жидкого моющего, жирорастворимого средства ("Fairy" и т. п.), доливают водой до метки 100 мл.

Рабочая смесь: для исследования воды в количестве 1 л готовят смесь из окиси алюминия 0,7 г, сульфат аммония 0,1 г; сульфат железа 0,1 г; сульфат меди 0,1 г; тщательно смешать.

Отбор и подготовка проб воды для исследования

Количество проб и точек забора в распределительной сети утверждается по согласованию с санитарно-эпидемиологической службой при разработке рабочей программы с учетом численности водопотребителей.

Контроль воды подземных водоисточников по паразитологическим показателям может быть рекомендован при условии неоднократных неудовлетворительных микробиологических результатах исследования.

Вода расфасованная

Для исследования расфасованной воды необходима 1 единица упаковки, но не менее 100 мл.

Вариант 1. В единицу упаковки опускают фиксированный нитью концентратор гидробиологический, взбалтывают. В больших емкостях, держа за нить концентратор гидробиологический, водят круговыми движениями в течение 5 мин. После чего концентратор гидробиологический исследуют по методике (см. ниже метод 1).

Вариант 2. В единицу упаковки с водой добавляют рабочую смесь из расчета 1:1000 (например, в 5; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,35; 0,1 л воды соответственно 5; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,35; 0,1 г), тщательно перемешивают и отстаивают 15-20 мин. После чего исследуют по методике (см. ниже метод 2).

Вода системы централизованного водоснабжения

Вариант 1. Концентратор гидробиологический фиксированный капроновой нитью или леской помещают в металлический контейнер, опускают в емкость 50 л и заполняют водой из крана или в любую посуду в течение 1 ч 40 мин пропускают 50 л, установив скорость тока воды – 1 л за 2 мин. После чего концентратор гидробиологический исследуют по методике (см. ниже метод 1).

Вариант 2. В единицу упаковки с водой добавляют рабочую смесь из расчета 1:1000 (например, в 5; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,35; 0,1 л воды соответственно 5; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,35; 0,1 г), тщательно перемешивают и отстаивают 15-20 мин. После чего исследуют по методике (см. ниже метод 2).

Вода децентрализованных водоисточников

Вариант 1. Концентратор гидробиологический фиксированный капроновой нитью или леской помещают в металлический контейнер и опускают в водоисточник на 10 мин, ритмично меняя глубину погружения «вверх», «вниз». После чего, концентратор гидробиологический исследуют по методике (см. ниже метод 1).

Вариант 2. В единицу упаковки с водой добавляют рабочую смесь из расчета 1:1000 (например, в 5; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,35; 0,1 л воды соответственно 5; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,35; 0,1 г), тщательно перемешивают и отстаивают 15-20 мин. После чего исследуют по методике (см. ниже метод 2).

Методы исследований

Метод 1. Содержимое концентратора (собранный со стенок ткани) помещают в мерную, центрифужную пробирку (10 мл). Добавляют 6-8 мл приготовленного десорбента (содержимое полиэтиленового пакетика выливают в колбу, промывая, доливают теплой 40-45° дистиллированной водой до 500 мл), размешивают стеклянной палочкой и оставляют на 15-20 мин. Надсадочную жидкость (не выбрасывая!) сливают в чистую пробирку, добавляют такое же количество дистиллированной воды, размешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об./мин.

Надосадочную жидкость сливают, оставляют 0,5-1,0 мл и из осадка готовят препараты на предметных стеклах, покрывают покровными и микроскопируют, сканируя всю площадь покровного стекла, с использованием 100-600-кратного увеличения (объективы – 10х, 40х, окуляры – 10х, 15х) сухой оптической системы.

Метод 2. После отстаивания воды с рабочей смесью, надосадочную жидкость удаляют, а осадок переносят в центрифужные пробирки 10-50 мл (в зависимости от объема осадка) и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об./мин. Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 3 мл 1% раствора HCl для растворения хлопьев, перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в таком же режиме. Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 6-8 мл приготовленного детергента, размешивают стеклянной палочкой и оставляют на 15-20 мин. Надосадочную жидкость (не выбрасывая!) сливают в чистую пробирку, добавляют такое же количество дистиллированной воды, размешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об./мин.

Оставляют 0,5-1,0 мл осадка, из него готовят препараты на предметных стеклах, покрывают покровными и микроскопируют, сканируя всю площадь покровного стекла, с использованием 100-600-кратного увеличения (объективы – 10х, 40х, окуляры – 10х, 15х) сухой оптической системы.

При исследовании на наличие цист лямблий и яиц гельминтов препарат не окрашивают или подвергают окраске раствором Люголя.

Для обнаружения ооцист криптоспоридий полученный осадок распределяют равномерно на предметных стеклах (не менее 4) и высушивают на воздухе. На тщательно высушенный мазок наносят 2-3 капли смеси Никифорова (смесь равных частей серного эфира и 96° этилового спирта) на 8-12 мин. После чего предметные стекла ставят вертикально и тщательно высушивают.

Мазки быстро проводят над пламенем горелки и окрашивают карболовым фуксином в течение не менее 20 мин. Мазки промывают дистиллированной водой, обесцвечивают (дифференцируют) 5-10% серной кислотой в течение 10-20 с и снова промывают. Затем дополнительно окрашивают 0,2% водным раствором метиленового синего или 5% малахитовой зелени в 10% этиловом спирте в течение 3-5 мин. Промывают дистиллированной водой, тщательно высушивают на воздухе и исследуют с масляной иммерсионной системой микроскопа с увеличением не менее 1000 х (90-100-кратный объектив) или применяют фазово-контрастное микроскопирование.

Ооцисты криптоспоридий окрашиваются в разные оттенки ярко красного (малинового, вишневого) цвета и имеют вид округлых образований диаметром 4,5-6 мк с отчетливо видимой оболочкой и структурированным содержимым (можно наблюдать наличие 4 веретенообразных темно-окрашенных спорозоитов) на синем или зеленом основном фоне.

Ооцисты криптоспоридий окрашиваются в красный цвет, все остальные микроорганизмы в синий (рис. 1).

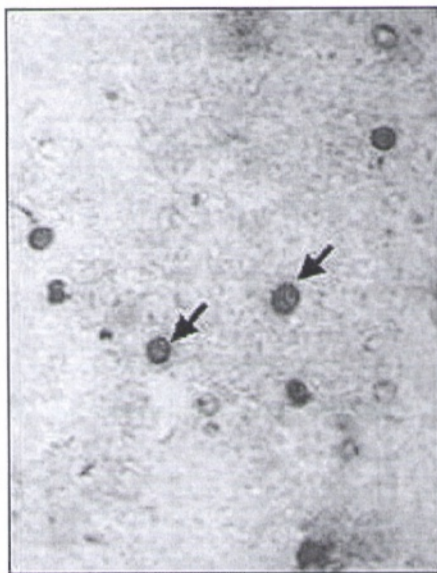


Рис. 1. Окраска на кислотоустойчивость по Цилю – Нильсену (округлые образования, отмеченные стрелками, являются оонистами *Cryptosporidium*)

Очищенная вода не должна содержать ооцист криптоспоридий, цист лямблий и яиц гельминтов.

Оценка результатов

Для проведения качественной оценки результатов необходимо, чтобы каждая проба была измерена в одних и тех же единицах – л, мл.

Содержание личинок или яиц гельминтов, цист и ооцист простейших должно быть указано в пересчете на эти единицы.

Объекты исследований считаются чистыми, если в них не обнаружены личинки или яйца гельминтов, цисты и ооцисты простейших. При обнаружении хотя бы одного паразитарного агента объект считается загрязненным.

При оценке загрязненности паразитарными патогенами объектов исследования могут быть приняты следующие категории:

а) объекты чистые – не содержат личинок или яиц гельминтов, цист и ооцист простейших;

б) объекты загрязненные – любое количество личинок или яиц гельминтов, цист и ооцист простейших на л, мл.

В первом случае проводятся мероприятия, направленные на охрану указанных объектов окружающей среды от паразитарных патогенов; во втором – на оздоровление, а затем уже на охрану.

Отрицательный результат анализа не гарантирует отсутствие паразитарных патогенов в пробе, поэтому результат исследования должен представляться в протоколе термином «не обнаружены».

В заключении о санитарном состоянии объекта необходимо указать общее количество исследованных проб и число положительных из них с уточнением количества выявленных яиц и цист (ооцист) в единице

измерения пробы, что необходимо для определения интенсивности загрязнения. При микроскопировании подсчитывают число паразитарных патогенов во всем объеме осадка, что соответствует их числу во всей исследованной пробе. Одновременно определяют систематическую принадлежность обнаруживаемых паразитических организмов; идентификация их проводится по следующим признакам:

ЦИСТЫ ЛЯМБЛИЙ – овальная форма, размеры 10-14 мк в длину и 6-10 мк в ширину; незрелые цисты содержат 2 ядра, зрелые – 4; ядра находятся у переднего полюса цисты. Оболочка цисты отчетливо выражена и большей частью отстает от протоплазмы, что является одним из характерных отличий цист лямблий от цист других простейших. Внутри цисты, вдоль по средней линии, проходят две опорные нити – аксостили; в косом или поперечном направлении лежат характерные парабазальные тела (2 – в незрелых и 4 – в зрелых цистах), нередко заметен сложно свернутый жгутиковый аппарат. Плотность 1,06-1,09.

ЦИСТЫ АМЕБЫ ДИЗЕНТЕРИЙНОЙ – округлая, редко овальная форма, размеры от 10 до 16 мк; молодые цисты содержат 1-2 ядра с центрально расположенной звездчатой кариосомой, зрелые цисты содержат 4 ядра, в зрелых четырехъядерных и незрелых двухъядерных цистах ядра расположены в различных плоскостях; оболочка цист двухконтурная в виде светлого прозрачного ободка. Одноядерные цисты почти всегда содержат в большом количестве гликоген, который в виде крупной вакуоли с нерезкими очертаниями занимает обычно больше половины цисты и раствором Люголя окрашивается в темно-коричневый цвет. Плотность 1,08-1,1.

Следует иметь в виду, что в природной воде могут встречаться цисты *Entamoeba dispar*, идентичные цистам дизентерийной амебы, но не обладающие патогенными свойствами для человека. В этом случае следует в протоколе исследования отмечать находки без указания видовой принадлежности таких цист. Для идентификации их необходимы дополнительные специальные исследования. Однако и в данной ситуации должна быть настороженность в отношении эпидемического неблагополучия.

ЦИСТЫ БАЛАНТИДИЯ КИШЕЧНОГО – правильная круглая форма, плотная двухконтурная оболочка, средний размер около 50 мк. Внутри цист имеется крупное бобовидное ядро. Протоплазма однородна, гликоген в ней распылен равномерно. Под оболочкой в некоторых цистах заметно углубление, представляющее собой редуцированный цитостом – органеллу, соответствующую началу пищеварительной трубки многоклеточных. Ресничный покров отсутствует. Плотность 1,1.

ООЦИСТЫ КРИПТОСПОРИДИЙ – имеют сферическую или овальную форму. Размеры инвазионных ооцист варьируют от 4 до 6 мк. Каждая ооциста содержит 4 спорозонта и резидуальное тело. Стенка ооцисты гладкая, бесцветная. Состоит из двух электронно-плотных слоев, отделенных тонким электронно-прозрачным пространством друг от друга. Тусклая линия (иногда заметная в световой микроскоп), проходящая от одного полюса

ооцисты до другого по окружности стенки. Электронной микроскопией идентифицируется как шов, который раскрывается при эксцистировании. Плотность 1,0.

ЯЙЦА АСКАРИДЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ (СВИНОЙ) – оплодотворенные яйца овальной или шаровидной формы. Наружная оболочка крупнобугристая, толстая, коричневого цвета (иногда встречаются яйца без наружной, бугристой оболочки). Размеры яиц 50-70 x 40-50 мк. Яйцеклетка мелкозернистая и шаровидная, расположена в центре яйца. Плотность 1,10-1,14.

Зрелое яйцо (способное заразить при заглатывании) содержит внутри подвижную личинку, свернувшуюся кольцевидно или перекрестно.

ЯЙЦА ТОКСОКАРЫ (АСКАРИДЫ СОБАК) – почти круглые, 65-75 мк в диаметре, с нежноячеистой наружной толстой оболочкой темно-коричневого цвета, внутри яйца видна округлая зародышевая клетка. Зрелые инвазионные яйца содержат внутри подвижную свернувшуюся кольцом или перекрестно личинку. Плотность 1,22.

ЯЙЦА ВЛАСОГЛАВА – симметричные, имеют лимонобразную или бочонковидную форму. Оболочка темно-коричневая, толстая. На обоих полюсах имеются светлоокрашенные пробковидные образования. Размеры яиц 50-54 x 23-26 мк. В зрелых инвазионных яйцах видна подвижная личинка. Плотность 1,16-1,22.

ЯЙЦА ОСТРИЦЫ – асимметричные. Одна сторона заметно уплощена, другая выпукла. Размеры яиц 50-60 x 30-32 мк. Оболочка тонкая, гладкая и бесцветная. Яйца могут быть на различных стадиях созревания, до головастикоподобной личинки включительно. Плотность 1,14.

ЯЙЦА ЦЕПНЯ КАРЛИКОВОГО – оболочка яйца бесцветная, тонкая, гладкая. Форма овальная. Размер яиц 40 x 50 мк, эмбриофора (зародыш) почти шаровидная (29 x 30 мк), с длинными нитевидными придатками на полюсах. Плотность 1,12.

ОНКОСФЕРЫ ТЕНИИД (цепня свиного и эхинококков) – овальная форма, размеры 31-40 x 2-30 мк; имеют тонкую наружную оболочку и толстую радиально-исчерченную внутреннюю оболочку темно-коричневого цвета. Внутри онкосферы находится зародыш-эмбриофора с шестью зародышевыми крючьями. Плотность 1,24.

Изображения цист кишечных простейших и яиц гельминтов представлены в приложении.

Приложение
 Возбудители паразитарных болезней



Рис. 1. Ооцисты криптоспоридии (окраска по Цилю – Нильсену)



Рис. 2. Цисты лямблий



Рис. 3. Циста балантидия кишечного



Рис. 4. Цисты амёбы дзентерии



Рис. 5. Яйца аскариды человеческой (свиной): а) оплодотворенное; б) незатопленное



Рис. 6. Яйцо острицы



Рис. 7. Яйца фасциолы а) свежесыроечное; б) инвазионное



Рис. 8. Яйца аскариды собачьей (токсокары) а) на начальной стадии развития; б) инвазионное



Рис. 9. Оокифера тенелл



Рис. 10. Яйцо цесты карликового