

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь



И.В. Гаевский
« 27 » марта 2016 г.
Регистрационный номер № 028-1215

**МЕТОДЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО
АНАЛИЗА ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД, ИСПОЛЗУЕМЫХ
В РЕКРЕАЦИОННЫХ ЦЕЛЯХ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Республиканское унитарное предприятие
«Научно-практический центр гигиены»

Авторы: к.м.н., доцент Дроздова Е.В., Нежвинская О.Е., Бурая В.В.,
Суровец Т.З., Фираго А.В.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
21.03.2016
Регистрационный № 029-1215

**МЕТОДЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В РЕКРЕАЦИОННЫХ
ЦЕЛЯХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Е.В. Дроздова, О.Е. Нежвинская, В.В. Бурая,
Т.З. Суровец, А.В. Фираго

Минск 2015

ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) определяет методы санитарно-микробиологического контроля воды поверхностных водных объектов, используемых в рекреационных целях (далее — рекреационные воды), в отношении ее эпидемической безопасности по бактериологическим показателям.

2. Инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей-вирусологов, иных специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных организаций здравоохранения.

ГЛАВА 2 ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

1. Оборудование

Нормативная документация
(СТБ, ГОСТ, ТУ и др.)

Автоматическая станция для экстракции ДНК в комплекте	
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений $pH \pm 0,1$ (рН-метр)	ГОСТ 19881-74
Аппарат для встряхивания жидкости в колбах или пробирках	ТУ 64-1-2451-78
Аппарат для встряхивания пробирок, скорость вращения $250-3000 \text{ мин}^{-1}$	
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $(45 \pm 5)^\circ\text{C}$	ГОСТ 12026-76
Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) или ламинарный шкаф класса биологической безопасности II тип А	ГОСТ 24104-2001
Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости	
Весы лабораторные квадрантные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	
Весы лабораторные квадрантные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 1000 г	
Денситометр для бактериальных суспензий	
Дистиллятор электрический	ГОСТ 28311-89
Дозаторы пипеточные	ГОСТ 25706-83

Компьютер, совместимый с программным обеспечением амплификатора/детектора, в комплекте с монитором, клавиатурой, мышью, кабелем, компакт-дисками с информацией по эксплуатации и инструкциями по настройке прибора	ГОСТ 8284-78
Лупа с двукратным увеличением	
Микроскоп световой биологический с увеличением 90–1000 ^x	
Микроцентрифуга настольная типа эппендорф (частота вращения не менее 13000 мин ⁻¹)	
Насос вакуумный (водоструйный)	
Прибор для мембранной фильтрации под вакуумом с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм и устройство для создания разрежения 0,5–1,0 атм	
Распределительная емкость объемом 1–2,5 дм ³	
Стерилизатор паровой с рабочим давлением пара не более 0,22 МПа (2,2 кгс/см ²)	«Правила устройства и безопасности сосудов, работающих под давлением», утвержденные приказом-постановлением МЧС РБ и Министерства труда РБ от 30.04.1998 № 33/45
Стерилизатор суховоздушный для температурного режима (180±5)°С	
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100°С с ценой деления шкалы 1°С	ГОСТ 24498-90
Термостат для пробирок типа эппендорф вместимостью 1,5 см ³ , диапазон температур от 15 до 120°С	
Термостат электрический суховоздушный для температурного режима (44±0,5)°С	ГОСТ 24498– 90
Термостат электрический суховоздушный для температурного режима (37±1)°С	
Холодильник бытовой	
Центрифуга, обеспечивающая 20000x g	ГОСТ 16317-87
Электроплитка бытовая	ГОСТ 14919-83

3. Материалы

Бумага индикаторная универсальная	Нормативная документация (СТБ, ГОСТ, ТУ и др.) ТУ 6-091181-76
-----------------------------------	--

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556-81
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336-82Е
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 25336-82
Колпачки металлические для пробирок	
Маркеры водостойкие	
Марля медицинская	ГОСТ 9412-93
Мембранные фильтры для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45 мкм и размером диска 35 или 47 мм или другие фильтрующие мембраны с аналогичной способностью фильтрации	
Наконечники к дозаторам	ГОСТ 21241-89
Ножницы	
Палочки стеклянные	
Петли бактериологические	
Пинцеты для работы с мембранными фильтрами	
Пипетки разной вместимости 2-го класса точности	ГОСТ 20292-74
Поплавки (трубки Дархема)	
Пробирки бактериологические типов П1 и П2	
Пробирки микроцентрифужные типа эппендорф вместимостью 0,2; 0,5 и 1,5 см ³	ГОСТ 25336-82
Пробки различных размеров: силиконовые, резиновые и др., выдерживающие высокую температуру, стерилизацию	ГОСТ 12026-76
Спиртовки лабораторные стеклянные	
Стекла предметные	
Стекла покровные	ГОСТ 23932-90Е
Цилиндры мерные на 100–500 см ³	ГОСТ 9284-75
Флаконы стеклянные градуированные	ГОСТ 6672-75
вместимостью 100; 200; 500 см ³	ГОСТ 1770-74
Штативы для пробирок	
Шпатели стеклянные	
Чашки биологические (Петри)	

ГОСТ 23932-90Е

3. Реактивы и питательные среды

Агар микробиологический
Агар питательный сухой
Азид натрия

Нормативная документация
(СТБ, ГОСТ, ТУ и др.)

ГОСТ 17206-96
ФС 42-188ВС-90

Азидная среда Сланеца	
Амиловый (бутиловый) спирт	ГОСТ 6709-72 ГОСТ 6038-79
Бромтимоловый синий	
Вода дистиллированная	
Глюкоза	ГОСТ 4148-78
Дрожжевой экстракт	
Казеин трипсиновой ферментации	
Калий фосфорнокислый однозамещенный	
Калия гидроксид	
Кислота соляная	ГОСТ 6038-74
Кристаллический фиолетовый водорастворимый	
Лактоза	
Лактозо-пептонная среда	
Набор реактивов для окраски по Граму	
Натрия хлорид	
α -нафтол	ГОСТ 195-77
Парадиметиламинобензальдегид	ГОСТ 4233-77
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 923-80
Питательная среда для выделения энтерококков, сухая	ГОСТ 13805-76
Реактив Ковача	ГОСТ 10929-76
Системы индикаторные бумажные (далее — СИБ) СИБ-лактоза	
СИБ-оксидаза	
Спирт этиловый ректификованный	
Спирт этиловый ректификованный технический	СТБ 1334-2003
Триптофановый бульон	ГОСТ 18300-87
L-триптофан	
2,-3,-5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ)	
Фенилендиаминовые соединения (тетраметилпарафенилендиамингидрохлорид или диметилпарафенилендиамин солянокислый)	
Фуксин основной	
Фуксин-сульфитная среда Эндо	

4. Реагенты для проведения ПЦР

Комплект реагентов (набор) для выделения ДНК из исследуемого материала	ТУ 9398-003-01897593-2009 или аналогичный по техническим
Комплект реагентов (набор) для выделения ДНК/РНК из исследуемого материала	ТУ 9398-071-01897593-2008 или аналогичный по

Комплекты реагентов (наборы) для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, обеспечивающие аналитическую чувствительность на уровне 1×10^3 ГЭ/см³ в отношении выявляемых фрагментов ДНК энтерогеморрагических *E. coli*, содержащие:

- смеси олигонуклеотидных праймеров на участки ДНК бактерий и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, комплементарных участкам амплифицируемых ДНК-мишеней
- полимеразу (TaqF)
- смесь буфера и нуклеозидтрифосфатов
- ДНК-буфер
- положительные контрольные образцы этапа ПЦР со специфическими фрагментами ДНК искомым микроорганизмов и внутренним контрольным образцом;
- отрицательный контрольный образец и внутренний неконкурентный контрольный образец этапа выделения
- минеральное масло для ПЦР

силика магнитная в растворе для автоматизированной экстракции ДНК,
буфер лизирующий для автоматизированной экстракции ДНК,
буфер для экстракции 1 для автоматизированной экстракции ДНК,
буфер для экстракции 2 для автоматизированной экстракции ДНК,
буфер для экстракции 3 для автоматизированной экстракции ДНК,
Питательные среды для обогащения микроорганизмов, приготовления бактериальных взвесей и их компоненты
Железа аммонийного цитрат
Литий хлористый
Налидиксовая кислота
Гуанидина гидрохлорид
Тритон X-100,
ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота)
Трис-НСl,
Суспензия двуокиси кремния силикагель (SiO₂)
Ацетон

Хлороформ водонасыщенный
2-меркаптоэтанол, х.ч.
смесь газов 5% O₂ , 15% CO₂ и 80% N₂ , х.ч.
в баллонах

ТУ 6-09-08-1024-81

Вода деионизированная
Спирт этиловый ректификованный
Дезинфицирующие средства (0,2% раствор
ДП-2Т, Дезолон и др.)

ГОСТ 5962-67

Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками, а также использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения для проведения исследований в соответствии с настоящей инструкцией. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

ГЛАВА 3 ОТБОР ПРОБ

1. Отбор проб для исследования поверхностных вод в местах купания и отдыха по микробиологическим показателям проводится:

- на расстоянии 1 км выше по течению от зоны купания на водотоках;
- на расстоянии 0,1–1,0 км в обе стороны от зоны купания на водоемах;
- в пределах зоны купания через равные интервалы.

2. Периодичность отбора проб для исследований в рамках государственного санитарного надзора устанавливается в зависимости от санитарно-эпидемиологической ситуации, но не менее 2 раз до начала купального сезона (не реже 1 раза в месяц в мае) и не реже 1 раза в неделю в течение купального сезона (июнь – август).

3. Отбор должен проводиться с 8 до 18 ч дня. Выбор времени отбора должен принимать во внимание вероятный период максимального загрязнения от местных сбросов сточных вод и влияния отдыхающих (день после пиковых посещений отдыхающих, например, после выходных).

Не следует проводить отбор проб во время событий, представляющих вред для здоровья (например, сильные дожди, штормовые условия).

Место отбора проб — на глубине колена (в 0,5 м от линии уреза воды) и на глубине грудной клетки (в 1 м от линии уреза воды). Отбор проб поверхностных вод в вышеперечисленных случаях осуществляется с мостов, помостов или плавательных средств.

Глубина отбора проб — 10–15 см от водной поверхности.

4. При отборе необходимо отметить погодные условия (сухо/влажно, дождь, температура воздуха, наличие купающихся и т.д.).

5. Исследования должны проводиться непосредственно после отбора проб, но не позднее 24 ч при условии транспортировки и хранения в правильных температурных условиях.

ГЛАВА 4 ПОДГОТОВКА К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ

1. Подготовка посуды и материалов.

Вся посуда, применяемая для микробиологического анализа, должна быть стерильной. Подготовка посуды и материалов следует проводить в соответствии с методическими указаниями «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» № 11-10-1-2002, утвержденными главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 25.02.2002.

2. Приготовление растворов, реактивов и питательных сред.

2.1. Общие требования.

При выполнении микробиологического анализа предпочтительно использовать стандартизированные сухие питательные среды промышленного производства; их приготавливают в соответствии с указаниями изготовителя. При взвешивании компонентов сред и испытуемых образцов допускается погрешность 0,1%.

Для приготовления растворов реактивов и питательных сред используют дистиллированную воду, если нет специальных указаний, и реактивы квалификации «х.ч.» или «ч.д.а.».

Необходимое значение водородного показателя рН (далее — рН) растворов и питательных сред устанавливают с помощью раствора гидроксида натрия массовой концентрации 0,1 моль/дм³ или раствора кислоты соляной объемной долей 0,1 моль/дм³; рН растворов и питательных сред определяют с помощью рН-метра. Ориентировочное определение рН растворов и питательных сред допускается проводить с помощью индикаторной бумаги.

Питательные среды, разлитые в чашки и хранящиеся в холодильнике, перед посевом должны быть прогреты до комнатной температуры. При наличии следов влаги на поверхности агаризованных питательных сред их подсушивают в термостате или ламинарном боксе, приоткрывая крышку, до исчезновения конденсата.

2.2. Приготовление растворов для разведений.

Солевой (физиологический) раствор. В 1 л дистиллированной воды растворяют 8,5 г хлорида натрия, устанавливают рН с расчетом, чтобы после стерилизации рН был $7,0 \pm 0,1$. Разливают во флаконы; стерилизуют при температуре $120 \pm 2^\circ\text{C}$ 20 мин. Разливают мерно в пробирки непосредственно перед посевом. Срок хранения — до 1 мес. при комнатной температуре.

Пептонный раствор. В 1 л дистиллированной воды растворяют при кипячении 1 г пептона. Устанавливают рН с расчетом, чтобы после стерилизации он был $7,0 \pm 0,1$. Разливают во флаконы; стерилизуют при температуре $120 \pm 2^\circ\text{C}$ 20 мин. Разливают мерно в пробирки непосредственно перед посевом. Срок хранения — до 1 мес. при комнатной температуре.

Пептонный солевой раствор. В 1 л дистиллированной воды растворяют при кипячении 8,5 г хлорида натрия и 1 г пептона. Устанавливают рН с расчетом, чтобы после стерилизации он был $7,0 \pm 0,1$. Разливают во флаконы; стерилизуют при температуре $120 \pm 2^\circ\text{C}$ 20 мин. Разливают мерно в пробирки

непосредственно перед посевом. Срок хранения — до 1 мес. при комнатной температуре.

Мясопептонный бульон (МПБ) (агар). В 1 дм³ мясной воды растворить 10,0 г пептона, 5 г хлористого натрия, профильтровать через бумажный фильтр. Установить рН 7,0–7,2, разлить в пробирки или флаконы, стерилизовать при температуре 121±1°С в течение 20 мин.

Для приготовления агара перед стерилизацией в МПБ добавить 15–20 г агара и кипятить на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара.

2.3. Растворы, реактивы и питательные среды для выявления и определения количества общих и термотолерантных колиформных бактерий и *Escherichiacoli*.

Фуксин-сульфитная среда Эндо (основная модификация). Готовят из сухого препарата по способу, указанному на этикетке. Если на поверхности среды заметны следы влаги, чашки перед посевом необходимо подсушить. Срок хранения чашек со средой не более 2–3 сут в темноте, если производителем не оговорены другие сроки.

Для повышения дифференцирующих свойств среды в готовую и охлажденную до 60–70°С среду перед разливкой в чашки допускается прибавлять на 100 мл среды 0,2 мл 5%-го спиртового раствора основного фуксина. Срок хранения раствора фуксина — не более 1 мес.

2.4. Растворы для проведения оксидазного теста.

Спиртовой раствор α-нафтола концентрации 50 г/мл: 5,0 г α-нафтола помещают в колбу вместимостью 100 мл, растворяют в этиловом спирте объемной концентрации 96% и доводят раствор этиловым спиртом до метки. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

Готовят 1%-й водный раствор любого фенилендиаминового соединения (диметил-п-фенилендиамина солянокислого, дифенил-п-фенилендиамина).

Растворы хранят в темных флаконах с притертыми пробками: 1-й — до одного месяца, 2-й — до одной недели. Перед употреблением к 3 частям первого раствора добавляют 7 частей второго раствора. Реактив может быть заменен коммерческими тест-системами для постановки оксидазного теста (СИБ-оксидаза или аналоги).

2.5. Растворы и реактивы для окраски по Граму готовят по ГОСТ 10444.1.

2.6. Раствор для проведения теста Греггерсона.

3% водный раствор КОН.

2.7. Питательные среды для подтверждения способности ферментировать лактозу до кислоты и газа.

Полужидкая среда с лактозой. В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 4–5 г агара, доводят до кипения, устанавливают рН 7,2–7,4, добавляют 1 мл 1,6% спиртового раствора бромтимолового синего; стерилизуют при 120±2°С 20 мин. В расплавленную среду вносят 5 г лактозы, нагревают до кипения, разливают в стерильные пробирки на высоту 3–5 см и стерилизуют при 112±2°С 12 мин. Срок хранения — не более 2 недель при комнатной температуре. Правильно

приготовленная среда зеленого цвета с синеватым оттенком (цвет бутылочного стекла). При образовании кислоты цвет среды изменяется на желтый.

Лактозо-пептонная среда. В 1 л дистиллированной воды при нагревании растворяют 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 5 г лактозы, 1 мл 1,6% раствора бромтимолового синего. После растворения ингредиентов устанавливают рН 7,4–7,6, разливают по 3–5 мл в пробирки с поплавком, стерилизуют при $112\pm 2^\circ\text{C}$ 12 мин.

2.8. Реактивы и среды для контроля продукции индола из триптофана.

Триптофановый бульон. В 1 л дистиллированной воды при нагревании растворяют 10 г казеина трипсиновой ферментации, 1 г L-триптофана, 5 г натрия хлористого и разливают по 3 мл в пробирки. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, пластиковыми или металлическими крышками (колпачками), затем стерилизуют течение 15 мин при температуре $120\pm 2^\circ\text{C}$. Полученную среду хранят в защищенном от света месте при температуре $5\pm 3^\circ\text{C}$ не более 10 сут.

Реактив Ковача. Приготовление реактива проводят в вытяжном шкафу. При этом необходимо использовать защитные перчатки и очки и избегать контакта с реагентами. Амиловый спирт может вызвать раздражение слизистых оболочек и головокружение. В 75 мл амилового или бутилового спирта (не содержащего органических оснований) растворяют 5 г п-диметиламинобензальдегида. Осторожно добавляют 25 мл концентрированной соляной кислоты плотностью 1,18 г/мл. Цвет реактива должен быть от светло-желтого до светло-коричневого. Реактив хранят при температуре $5\pm 3^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте.

3. Подготовка штаммов микроорганизмов.

Для выявления антагонистической активности штаммов используются музейные штаммы микроорганизмов вида *Micrococcus roseus* и *Pseudomonas fluorescences*, обладающие типичными морфологическими и биохимическими свойствами. Хранение музейных штаммов, а также проверка их биохимических и морфологических свойств проводится согласно действующей нормативной документации.

ГЛАВА 5 ПОДГОТОВКА ПРОБ

1. Подготовка проб — по ГОСТ 26668, ГОСТ 26669.

2. Отбирают необходимый для исследования объем (в соответствии с требованиями ТНПА в зависимости от определяемых показателей) в стерильную колбу с ватно-марлевой стерильной пробкой, встряхивают несколько раз и оставляют на 5–10 мин для дегазации.

3. Перед посевом пробу тщательно без образования пены перемешивают не менее 30 с и фламбируют край емкости. Используемые пробирки и чашки маркируют. Перед каждым отбором новой порции воды пробу тщательно перемешивают.

4. Приготовление разведений.

Для посева объемов воды менее 1 мл используют разведения анализируемой воды. Перед посевом раствор для разведений разливают по 9 мл в пробирки с соблюдением правил стерильности. Затем в первую пробирку с 9 мл раствора вносят 1 мл анализируемой воды. При этом наконечник не должен быть опущен ниже поверхности воды, чтобы избежать смывания бактерий с наружной стороны. Другой стерильной пипеткой или дозатором тщательно перемешивают содержимое пробирки, отбирают из нее 1 мл и переносят в чашку Петри, что будет соответствовать посеву 0,1 мл анализируемой воды. При необходимости посева меньших объемов этой же пипеткой переносят 1 мл содержимого первой пробирки в следующую пробирку раствора для разведения. Другой стерильной пипеткой делают посев 1 мл из второй пробирки, что будет соответствовать посеву 0,01 мл анализируемой воды. Время от момента приготовления разведений и заливки питательным агаром не должно превышать 30 мин.

ГЛАВА 6

ПРОВЕДЕНИЕ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Методика работы при использовании мембранных фильтров.

Мембранные фильтры должны быть подготовлены к анализу в соответствии с указаниями изготовителя.

Воронку и столик фильтровального аппарата обтирают марлевым (ватным) тампоном, смоченным спиртом ректифицированным, и фламбируют. После охлаждения на столик фильтровального аппарата кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр, прижимают его воронкой.

В воронку прибора для фильтрования наливают отмеренный объем воды, затем создают вакуум.

При посеве нескольких объемов одной пробы следует фильтровать через один фильтровальный аппарат без обеззараживания сначала меньшие, а затем большие объемы воды, меняя каждый раз фильтры. Перед фильтрованием каждой новой пробы прибор обеззараживают. Следует начинать с фильтрования воды или тех проб, которые предположительно не загрязнены, а затем фильтровать загрязненные пробы.

При фильтровании небольшого объема исследуемой воды следует в воронку налить предварительно не менее 10 мл стерильной воды, а затем внести анализируемую воду.

После окончания фильтрования и осушения фильтра отключают вакуум, воронку снимают, фильтр осторожно поднимают за край фламбированным пинцетом и переносят его, не переворачивая, на питательную среду, разлитую в чашки Петри, или в пробирки, избегая пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх.

2. Метод выявления и определения количества общих колиформных бактерий (ОКБ), термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ) и *Escherichia coli*.

2.1. Определение понятия показателей.

Общие колиформные бактерии — грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч.

Термотолерантные колиформные бактерии входят в число общих колиформных бактерий, обладают всеми их признаками и, кроме того, способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре $44\pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч.

Escherichia coli — термотолерантные колиформные бактерии, продуцирующие индол из триптофана при температуре $44\pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 22 ± 2 ч.

2.2. Анализ методом мембранной фильтрации.

Метод основан на фильтрации установленного объема воды через мембранные фильтры с последующим культивированием на селективной среде с идентификацией и учетом выросших бактерий.

Фильтруют объем воды, необходимый для получения изолированных колоний на фильтре. При получении стабильных отрицательных результатов допускается фильтрация 300 мл воды через один фильтр. После окончания фильтрования фильтр переносят на поверхность чашки Петри со средой Эндо, сохраняя его положение при фильтрации. Чашки с фильтрами помещают в термостат дном вверх и инкубируют при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч. Если на фильтрах нет роста или выросли колонии пленчатые, губчатые, плесневые, расплывчатые, выдается отрицательный ответ; анализ заканчивается через 24 ч.

Если на фильтрах обнаружен рост изолированных типичных лактозоположительных колоний: темно-красных, красных с металлическим блеском или без него или других подобного типа колоний с отпечатком на обратной стороне фильтра, подсчитывают число колоний каждого типа отдельно и подтверждают их принадлежность к ОКБ и ТКБ.

2.3. Идентификация выросших бактерий.

Для подтверждения наличия ОКБ исследуются все колонии, если на фильтрах выросло менее 5 колоний и не менее 3–4 колоний каждого типа. Для подтверждения наличия ТКБ исследуют все типичные колонии, но не более 10.

Каждую выбранную изолированную колонию исследуют на наличие оксидазной активности и отношение к окраске по Граму (микроскопия окрашенного по Граму препарата или постановка теста Грегерсена). Все оксидазо- и грамотрицательные колонии пересевают на скошенный питательный агар для дальнейшей идентификации.

Постановка оксидазного теста. Полоску фильтровальной бумаги помещают в чистую чашку Петри и смачивают 2–3 каплями реактива для оксидазного теста. Готовые бумажные системы смачивают дистиллированной водой. Часть изолированной колонии стеклянной палочкой или платиновой

петлей (металлическая петля из нихрома может дать ложноположительную реакцию) наносят штрихом на подготовленную фильтровальную бумагу. Реакция считается положительной, если в течение 1 мин появляется синее окрашивание штриха. При отрицательной реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется; при положительном результате эту колонию при дальнейшем исследовании исключают.

Если при исследовании колоний, окрашенных в темно-красный цвет, получают недостаточно четкий результат, необходимо повторить тест после инкубации колоний, пересеянных на скошенный питательный агар.

Из оксидазоотрицательной колонии делают мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют:

- на обезжиренное спиртом предметное стекло наносят петлей 1 каплю дистиллированной воды, вносят небольшое количество культуры из анализируемой колонии и распределяют ее по поверхности стекла;

- мазок высушивают при комнатной температуре и фиксируют трехкратным проведением через пламя горелки;

- на препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают раствор кристаллического фиолетового, через 0,5–1,0 мин бумагу снимают;

- наливают раствор Люголя на 0,5–1,0 мин, затем сливают его и промывают стекло обесцвечивающей жидкостью (96%-м этиловым спиртом), пока не перестанет отходить краситель (15–30 с);

- стекло тщательно промывают водой и докрашивают в течение 1–2 мин раствором фуксина или сафранина;

- стекло промывают и просушивают фильтровальной бумагой;

- препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

Грамотрицательные микроорганизмы имеют розовую окраску, грамположительные окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, колиформные бактерии являются грамотрицательными палочками.

Тест Греггерсена. Окраска по Граму может быть заменена тестом Греггерсена, не требующим использования оптики. В капле 3%-го водного раствора КОН на предметном стекле эмульгируют бактериальную массу, взятую с плотной среды. После нескольких секунд перемешивания петлей взвесь ослизняется и за петлей тянутся слизистые нити, что указывает на принадлежность испытуемой культуры к грамотрицательному виду. У грамположительных бактерий слизистые нити не образуются — реакция отрицательная.

2.4. Подтверждение способности ферментировать лактозу до кислоты и газа.

Для определения ферментации лактозы оставшаяся часть грам-, оксидазоотрицательной изолированной колонии засевают параллельно в две пробирки с лактозной средой:

- для подтверждения наличия ОКБ посев инкубируют при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч, в случае получения отрицательного результата через 24 ч пробирку с посевом оставляют для окончательного учета до 48 ч;

- для подтверждения наличия ТКБ и *E. coli* посев осуществляют в предварительно прогретую до $43\pm 1^\circ\text{C}$ среду и инкубируют при $44\pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч.

Первичный учет кислоты и газа на подтверждающих средах возможен через 4–6 ч. При обнаружении кислоты и газа выдают положительный ответ. При отсутствии кислоты и газа или при наличии только кислоты пробирки с посевами оставляют до 24–48 ч.

Если колония, подлежащая исследованию, незначительных размеров, тогда для накопления материала ее пересевают на скошенный питательный агар.

При отсутствии через 24 ч газообразования в пробирках, инкубирующихся при температуре $44\pm 0,5^\circ\text{C}$, получают окончательный отрицательный ответ, при наличии газообразования проводится дальнейшая идентификация ТКБ.

2.5. Подтверждение способности продуцировать индол из триптофана.

Колонии со скошенного питательного агара пересевают петлей в пробирки с триптофановым бульоном и инкубируют при температуре $44\pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 22 ± 2 ч. После инкубирования определяют образование индола путем добавления 0,2–0,3 мл реактива Ковача.

Образование вишнево-красной окраски на поверхности триптофанового бульона считают положительной индольной реакцией, подтверждающей образование индола.

2.6. Допускается при росте на агаре Эндо типичных лактозоположительных, оксидазоотрицательных колоний после инкубации при температуре $37\pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение 22 ± 2 ч выявлять антагонистическую активность выделенных штаммов без обязательной биохимической идентификации.

Подозрительные лактозопозитивные колонии, розовые или красные колонии с металлическим блеском или без него, пересевают радиальными штрихами на поверхность мясопептонного агара (МПА). Следует учитывать, что размер зоны ингибирования может зависеть от множества факторов, в т. ч. от толщины слоя питательного агара. Для получения воспроизводимых результатов в чашки заливают точно $20,0\pm 1,0$ мл МПА и при застывании агара чашки находятся в строго горизонтальном положении.

На одну чашку допускается засеять до 6 штаммов одновременно. Засеянные чашки Петри помещают в термостат при температуре $37\pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение 22 ± 2 ч. Параллельно в пробирках на косяках $30\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 22 ± 2 ч культивируют тест-штаммы *Micrococcus roseus* и *Pseudomonas fluorescences*, которые являются типичными представителями грампозитивной и грамотрицательной сапрофитной микрофлоры поверхностных водных объектов. По истечении этого срока между выросшими полосками штамма-антагониста засевают прерывистым кругом культуры тест-штаммов — бактерий вида *Micrococcus roseus* и *Pseudomonas fluorescences*. Полукруглые полоски нигде не должны соприкасаться с радиальными, они должны отступать от них на 1–2 мм. Чашки вновь ставят в термостат при температуре $30\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 22 ± 2 ч,

после чего учитывают результаты опыта. Если среди испытуемых штаммов имеются штаммы, обладающие антагонистической активностью, рост одного или обоих тест-микроорганизмов вокруг радиального штриха исследуемых штаммов отсутствует.

На рисунке представлена техника посева и рост штаммов, характеризующихся антагонистической активностью: А — чашка Петри через 24 ч после посева штаммов-антагонистов; Б — штаммы *Micrococcus roseus* и *Pseudomonas fluorescences* нанесены прерывистыми кругами; С — результат опыта через 24 ч: штамм № 3 обладает антагонистическим действием.

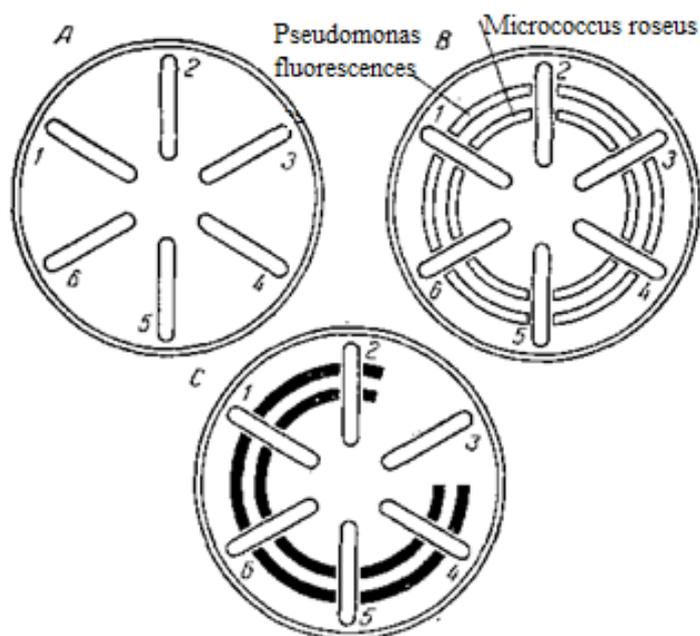


Рисунок — Схема посева штаммов для выявления антагонистической активности колиформных бактерий

2.7. Учет результатов.

Грамотрицательные колонии учитывают как ОКБ при отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при $37\pm 1^\circ\text{C}$ с образованием кислоты и газа.

Грамотрицательные колонии учитывают как ТКБ при отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при $44\pm 0,5^\circ\text{C}$ с образованием кислоты и газа.

ТКБ, продуцирующие индол из триптофана при $44\pm 0,5^\circ\text{C}$, учитывают как *Escherichia coli*.

При отсутствии общих и термотолерантных колиформных бактерий на всех фильтрах выдают результат: «не обнаружено КОЕ ОКБ и *E. coli* в 100 мл» и «не обнаружено КОЕ ТКБ и *E. coli* в 100 мл».

В случае идентификации всех выросших подозрительных колоний как ОКБ, ТКБ и *E. coli*, число колониеобразующих единиц подсчитывают на всех фильтрах и результат анализа выражают в КОЕ ОКБ, ТКБ и *E. coli* в 100 мл воды.

Вычисление проводят по формуле:

$$X = \frac{a * 100}{V}, \quad (1)$$

где X — число колоний в 100 мл;

V — профильтрованный объем воды через фильтры, на которых велся учет;

a — число подсчитанных на этих фильтрах колоний в сумме.

Если при выборочной проверке колоний одного типа получаются неодинаковые результаты, то значения ОКБ, ТКБ или *E. coli* среди колоний этого типа вычисляются по формуле:

$$X = \frac{(a * c)}{b}, \quad (2)$$

где X — число подтвержденных бактерий одного типа;

a — общее число колоний этого типа;

b — число проверенных из них;

c — число колоний с положительным результатом.

Полученные результаты учета по каждому типу колоний суммируют и далее подсчитывают по формуле (1).

Выдают окончательный результат: количество КОЕ ОКБ в 300 мл, из них количество КОЕ ТКБ в 300 мл, из них количество *E. coli* в 300 мл.

При наложении колоний или сплошном росте на всех фильтрах в случае подтверждения принадлежности к ОКБ, ТКБ и *E. coli* выдают качественный результат. При необходимости количественного учета анализ повторяют с использованием большего числа фильтров. Если все колонии на фильтре (фильтрах) оксидазоположительные или не подтвердилась их принадлежность к ОКБ и ТКБ, анализ завершается, в протоколе отмечают «зарост фильтров».

ГЛАВА 7 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДОМ ПЦР

1. Выявление энтерогеморрагических веротоксигенных *E. coli*, в т. ч. серотипа O157:H7 методом ПЦР.

При необходимости выявления в образцах воды энтерогеморрагических веротоксигенных *E. coli*, в т. ч. серотипа O157:H7 методом ПЦР, проводят пересев подозрительных колоний со среды Эндо на агар МПА, инкубацию при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч. Суточные культуры смывают с поверхности агара небольшим количеством стерильного физиологического раствора (или снимают петлей) и переносят в стандартную пробирку.

Концентрацию бактериальных клеток в суспензии проверяют по оптическому стандарту МакФарланда либо денситометрически на приборах, откалиброванных также по шкале МакФарланда (плотность суспензии должна составлять не менее 1,5–2,0 ед. по шкале МакФарланда). При использовании отраслевого стандарта для визуальной оценки мутности расчетная концентрация клеток в пробе должна составлять не менее 10^7 клеток/см³. Аналогичным образом устанавливают плотность культур на жидких средах.

Содержимое пробирки тщательно перемешивают на гомогенизаторе типа «вортекс» для получения гомогенной суспензии.

Для исследований в ПЦР используют подготовленные указанным образом взвеси микроорганизмов или бульонные культуры, содержащие не менее 10^7 клеток/см³, которые подвергают дальнейшим манипуляциям для выделения ДНК. Подготовленные образцы используют для анализа в тот же день.

2. Экстракция ДНК из исследуемых образцов.

2.1. Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии неконкурентного внутреннего контрольного образца («ВКО») на основе рекомбинантной ДНК для контроля правильности (точности) этапов выделения и амплификации ДНК.

2.2. В качестве отрицательного контроля («ОК») этапа экстракции ДНК из культуральной жидкости используют стерильный образец питательной среды для обогащения исследуемого продукта, предварительно протестированный на отсутствие ДНК искомым патогенных бактерий. При наличии спорных или невалидных результатов ПЦР используют ОК этапа выделения из набора реагентов.

2.3. Экстракцию ДНК из культуральной жидкости, взвесей микроорганизмов и бульонных культур проводят без дополнительной обработки, применительно к используемым наборам реагентов и в соответствии с утвержденными в установленном порядке инструкциями.

2.4. Для экстракции ДНК применяются коммерчески доступные комплекты реагентов на основе методов сорбции ДНК на силикагеле или преципитации ДНК в соответствии с инструкцией производителя при возможности их сочетания с комплектами реагентов для амплификационного этапа исследований.

Использование автоматических экстракторов нуклеиновых кислот допускается при наличии указаний в инструкции к прилагаемым комплектам реагентов на возможность их применения при анализе данного вида образцов.

Не допускается применение упрощенных методик экстракции ДНК на основе термокоагуляции.

3. Проведение ПЦР

3.1. ПЦР для выявления ДНК энтерогеморрагических веротоксигенных *E. coli* осуществляется с использованием наборов реагентов, обеспечивающих постановку любого из двух вариантов гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации — по конечной точке (вариант FEP)

и в режиме реального времени (вариант FRT). Постановка ПЦР осуществляется по схемам и алгоритмам, рекомендованным производителем комплектов реагентов с обязательным применением внутренних контрольных образцов с этапа экстракции ДНК.

3.2. Положительные результаты тестирования отрицательного контроля экстракции ДНК (стерильный образец использованной питательной среды для селективного обогащения) могут быть связаны с загрязнением среды генетическим материалом тестируемого микроорганизма. В этом случае необходимо повторить исследование с этапа селективного обогащения с применением сред, не содержащих ДНК искомого микроорганизма, с дополнительным включением в панель в качестве отрицательного контроля выделения препарата ОК0 из набора реагентов.

Отставание сигнала по каналу JOE/HEX на 3 и более пороговых цикла (Ct) для образца, не подвергавшегося инкубации ($Ct_{не\ инк} - Ct_{инк} \geq 3$), свидетельствует о наличии в продукте жизнеспособного микроорганизма.

4. Результаты оценивают отдельно по каждой пробе.

4.1. Заключение о присутствии энтерогеморрагических веротоксигенных *E. Coli* в исследованном объеме воды выдают при получении положительного результата ПЦР (выявлении ДНК указанных микроорганизмов в пробе).

4.2. Заключение об отсутствии энтерогеморрагических веротоксигенных *E. coli* в исследованном объеме воды выдают при получении отрицательного результата ПЦР (невыявлении ДНК искомым микроорганизмов).

4.3. Заключение о принадлежности выделенных изолятов к энтерогеморрагическим веротоксигенным *E. coli* в исследованном объеме воды выдают при получении положительного результата ПЦР (выявлении ДНК указанных микроорганизмов в пробе).

5. Выявление и определение количества энтерококков.

5.1. Определение понятия показателя.

Энтерококки — грамположительные, полиморфные, круглые, чаще слегка вытянутые с заостренными концами, клетки, располагающиеся попарно или в коротких цепочках. Являются показателями фекального загрязнения воды.

25.2. Определение энтерококков методом мембранной фильтрации.

Исследуемый объем воды фильтруют через 1 или несколько мембранных фильтров. Фильтры с посевами помещают на чашки Петри со средой, содержащей азид натрия, и инкубируют при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч.

Учет результатов проводится на фильтрах, содержащих от 5 до 50 колоний. Подсчитывают колонии, характерные для энтерококков: выпуклые, с ровными краями, розовые, светло-розовые, равномерно окрашенные или с темно-красным не четко оформленным центром. Как правило, все колонии, которые растут на азидной среде, можно отнести к фекальным стрептококкам, имеющим индикаторное значение. Очень мелкие (на пределе видимости невооруженным глазом), плоские разных оттенков колонии не учитывают.

5.3. Идентификация выросших бактерий.

При необходимости подтверждения принадлежности выросших колоний к энтерококкам определяют отсутствие каталазной активности и 2–3 колонии каждого типа микроскопируют после окраски по Граму.

Каталазный тест можно выполнить путем нанесения петлей капли 3%-й перекиси водорода на подозрительные колонии. Более точно каталазный тест выполняют на предметном стекле, нанося петлей культуру и после высушивания на воздухе добавляя каплю свежеприготовленной 3%-й перекиси водорода и прикрывая покровным стеклом. Наличие пузырьков газа – положительный тест.

5.4. Учет результатов.

Результат анализа выражают числом КОЕ энтерококков в исследуемом объеме воды. При отсутствии роста типичных колоний на всех фильтрах дают ответ «не обнаружено в X мл воды», где X — исследуемый объем воды. При сливном росте колоний результат оценивается как качественный, в протоколе отмечают «обнаружено в X мл воды», где X — исследуемый объем воды.