

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра,
Главный государственный
санитарный врач

М.И. Римжа
21 января 2008 г.
Регистрационный № 107-1207

**САНИТАРНО-ПАЗАРИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ПОЧВЫ, ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД, ИЛОВЫХ ПЛОЩАДОК,
ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ И СТОЧНЫХ ВОД**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «НИИ эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ: д-р биол. наук Л.В. Скрипова, А.И. Корзан, Н.А. Романенко

Минск 2008

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

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

- Дистиллированная или кипяченая вода
- Детергент № 1 – 2,5% раствор стирального порошка
- Детергент № 2 – 0,5% раствор жидкого моющего, жирорастворимого средства
- Концентратор гидробиологический
- Десорбент – содержимое полиэтиленового пакетика выливают в колбу, промывая, доливают теплой (40-45°) водой до 500 мл
- 3% NaOH или КОН
- Насыщенный азотно-кислый натрий (NaNO₃), уд. вес 1,38-1,40
- Раствор Люголя 1%
- Глицерин 30%
- Предметные и покровные стекла, стеклянные палочки, цилиндры, колбы, стаканы измерительные
- Электромешалка
- Центрифуга с гнездами для пробирок 10 мл
- Центрифуга со сменным ротором с гнездами для пробирок 100, 250 мл
- Микроскоп для микробиологических исследований
- Весы лабораторные
- Шпатель, штативы лабораторные

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Осуществление государственного санитарного надзора, а также производственного лабораторного контроля окружающей среды (почва, сточные воды, их осадки, иловые площадки, донные отложения).

2. Предупредительный и текущий санитарный надзор.

2.1. Оценка эффективности оздоровительных мероприятий в очагах и микроочагах паразитозов.

2.2. Контроль за правильным и безопасным использованием на этапах технологической обработки сточных вод и их осадка.

3. Оценка эффективности дегельминтизации нечистот, сточных вод и их осадка на очистных сооружениях различного типа.

Приготовление рабочих растворов

Детергент № 1 (рабочая концентрация стирального порошка)

В цилиндр помещают 10 г порошка и размешивают в 100 мл горячей воды. После остывания воды до комнатной температуры в цилиндре четко виден осадок из не растворившейся части порошка. В цилиндр доливают еще

100 мл горячей воды и размешивают осадок. После остывания воды до комнатной температуры в цилиндре виден осадок. Вновь повторяют указанные выше действия. После третьего разведения образования осадка не произошло. Рабочая концентрация детергента будет равна 2,5% ($10/100 = 10\%$; $5/100 = 5\%$; $2,5/100 = 2,5\%$).

Установлено, что рабочая концентрация для целого ряда стиральных порошков отечественного производства колеблется от 1 до 4%.

Для приготовления рабочих растворов можно использовать кипяченую воду.

Детергент № 2. В мерный цилиндр при помощи мерной пипетки вносят 0,5 мл раствора жидкого моющего, жирорастворимого средства («Fairu» и т. п.), доливают водой до метки 100 мл.

Насыщенный раствор азотно-кислого натрия (NaNO_3)

Соль азотно-кислого натрия (NaNO_3) смешивают с водой (в соотношении 1:1, т. е. 1 кг соли на 1 л воды) и нагревают до образования плёнки на поверхности раствора. После этого раствор охлаждают и ареометром измеряют удельный вес, который должен быть не ниже 1,38-1,40.

Отбор проб почвы

Пробы почвы следует отбирать: во дворах – на поверхности и с глубины 1-3 см; смет на асфальте, где играют дети; на огородах, в садах, тепличных и парниковых хозяйствах, земледельческих полях орошения – на поверхности и глубине 10-20 см.

С поверхности пробы собирают ложкой, совочком или большим шпателем, а с глубины 10-60 см лопатой или буром и помещают в пакеты из полиэтилена или клеенки.

При выяснении общей загрязненности яйцами гельминтов почвы на территории выделяют площадку размером 25 м². В 5-10 местах по диагонали площадки с поверхности и соответствующих глубин отбирают навески почвы по 10-20 г каждая. Путем тщательного перемешивания соответствующих навесок почвы составляют средние пробы. Каждая средняя проба весом 20-25-40 г должна иметь этикетку с указанием: места забора, даты, глубины, характера исследуемого участка (в тени или на солнце).

Пробы почвы домовладений берут отдельно с участков, которые наиболее часто загрязняются фекалиями (у входа в дом, по периметру отмостки, у туалетов, контейнеров мусоросборников, в помещениях для скота, вдоль забора и т. д.), а также в местах, где играют дети и в песочнице.

На огородах и ягодниках пробы отбирают с гряд, где выращиваются овощи, зелень, ягоды и корнеплоды, употребляемые в пищу в сыром виде (морковь, репа, редис, помидоры, огурцы, зеленый лук, салат, клубника, земляника и пр.). При взятии проб следует учитывать способы удобрения почвы (необезвреженными или обезвреженными фекалиями, очищенными или неочищенными сточными водами), а также объемы, сроки и способы их применения.

На территории детских учреждений: на игровых и спортивных площадках, около входа и вокруг помещений, вдоль забора, в песочницах, у веранд, в игровых домиках, вокруг душевых установок, наружных санузлов (туалеты и мусорных ящиков).

На рынках: под столами, в овощных и фруктовых рядах, в местах продажи живности и рассады, а также смывы с овощей.

На пляжах: в постоянно увлажняемых местах на берегу, в прилегающей к пляжу полосе суши, в закрытых павильонах, вокруг и внутри кабин для раздевания и одевания, около туалетов, мусорных контейнеров.

В парках, на бульварах и стадионах: в песочницах, на игровых и спортивных площадках, клумбах у павильонов, около туалетов и пр.

В оздоровительных лагерях: на спортивно-гимнастических площадках, около пищеблоков, столовых, мусорных контейнеров, туалетов, бань, прачечных, в местах водозаборов.

Исследование почвы с использованием детергентов, концентратора гидробиологического и азотно-кислого натрия (NaNO_3)

Метод № 1. Доставленную в лабораторию пробу почвы в количестве 20 г помещают в центрифужную пробирку объемом 100, 250 мл и заливают детергент № 1 или 2 из расчета 1:4, тщательно размешивают и оставляют на 15-20 мин. Надосадочную жидкость сливают в чистую пробирку. Для осаждения возбудителей добавляют такое же количество дистиллированной воды (1:1), размешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 3 мин при 1500 об./мин. Надосадочную жидкость сливают, из осадка готовят препараты на предметных стеклах с раствором Люголя, покрывают покровными стеклами и микроскопируют с использованием 100-600-кратного увеличения (объективы – 10x, 40x, окуляры – 10x, 15x) сухой оптической системы.

Метод № 2. Доставленную в лабораторию пробу почвы в количестве 20 г помещают по 2 г в 10 пробирок объемом 10 мл, заливают детергент № 2 в количестве по 8 мл, тщательно размешивают и оставляют на 15-20 мин. Надосадочную жидкость с отделившимися возбудителями сливают в чистую пробирку. Для осаждения возбудителей добавляют такое же количество дистиллированной воды (1:1), размешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 3 мин при 1500 об./мин. Надосадочную жидкость сливают, из осадка готовят препараты на предметных стеклах с раствором Люголя, покрывают покровными стеклами и микроскопируют с использованием 100-600-кратного увеличения (объективы – 10x, 40x, окуляры – 10x, 15x) сухой оптической системы.

Использование концентратора гидробиологического (усовершенствованный)

Пробу почвы в количестве 20 г в течение 5 мин размешивают с водой дистиллированной или кипяченой в количестве от 200 до 1000 мл. В полученную смесь помещают концентратор гидробиологический, удерживая его пинцетом, в течение 5 мин, круговыми движениями со дна и вверх, вниз

«собирают возбудителей». Через 5 мин содержимое концентратора (собрав со стенок ткани) вносят в мерную, центрифужную пробирку (10 мл). Добавляют 6-8 мл приготовленного десорбента для отделения возбудителей от сорбирующего реагента. Смесь размешивают стеклянной палочкой и оставляют на 15-20 мин. Надосадочную жидкость, с отделившимися возбудителями, сливают в чистую пробирку. Для осаждения возбудителей добавляют такое же количество дистиллированной воды, размешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об./мин (600g). Надосадочную жидкость сливают, оставляя 0,5-1,0 мл осадка и готовят из него препараты на предметных стеклах с раствором Люголя, покрывают покровными и микроскопируют, сканируя всю площадь покровного стекла, с использованием 100-600-кратного увеличения (объективы – 10x, 40x, окуляры – 10x, 15x) сухой оптической системы.

Для исследования на ооцисты криптоспоридий осадок наносят на предметные стекла, высушивают и проводят окраску по Цилю – Нильсену. Крашенные мазки микроскопируют, используя масляно-иммерсионный 90-100-кратный объектив или фазово-контрастное микроскопирование.

Метод флотации усовершенствованный (Романенко Н.А., 1976, ИМПТиМ)

Доставленную в лабораторию пробу почвы в количестве 25 г помещают в центрифужные пробирки объемом 250 мл (в случае отсутствия таких пробирок используют пробирки объемом 80-100 мл, помещая в них 15 г почвы) и заливают 3% раствором КОН или NaOH (в соотношении 1:2). Смесь размешивают (при помощи электромешалки или стеклянных палочек) в течение 5-8 мин и центрифугируют 5 мин при 800 об./мин. Надосадочную жидкость сливают, а почву промывают (от 1 до 5 раз в зависимости от типа почвы) чистой водой до получения прозрачной надосадочной жидкости и сливают. После промывки к почве добавляют 150 мл насыщенного раствора NaNO_3 , тщательно размешивают и оставляют на 15-20 мин. Надосадочную жидкость с отделившимися возбудителями сливают в чистую пробирку. Для осаждения возбудителей добавляют такое же количество дистиллированной или кипяченой воды, размешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об./мин (600g). Надосадочную жидкость сливают, оставляя 0,5-1,0 мл осадка и готовят из него препараты на предметных стеклах с раствором Люголя, покрывают покровными и микроскопируют, сканируя всю площадь покровного стекла, с использованием 100-600-кратного увеличения (объективы – 10x, 40x, окуляры – 10x, 15x) сухой оптической системы.

Для исследования на ооцисты криптоспоридий осадок наносят на предметные стекла, высушивают и проводят окраску по Цилю – Нильсену. Крашенные мазки микроскопируют, используя масляно-иммерсионный 90-100-кратный объектив или фазово-контрастное микроскопирование.

Исследование почвы на личинки гельминтов (анкилостомид, стронгилоид)

Метод Бермана. Стеклянную воронку (диаметром 10-15 см), соединенную при помощи резиновой трубки с узкой стеклянной пробиркой, устанавливают в штатив и наполняют водой (температура 45-50°). Почву в количестве 20-40 г на кусочке марли или мельничного газа помещают на металлическую сетку (или в ситечко для чая), которую устанавливают на воронку так, чтобы нижняя часть с почвой соприкасалась с водой.

Воронку с почвой ставят в термостат при температуре 37°С. Личинки в силу своей термотропности мигрируют из почвы через сито в воду и оседают на дно пробирки. Через 3-4 ч осторожно отсоединяют пробирку от воронки, сливают верхний слой жидкости, а осадок переносят на предметное стекло и микроскопируют.

Осадки сточных вод и иловых площадок

Пробы «сырого» осадка сточных вод берут из отстойников, септиков, биологических прудов, прудов-накопителей, иловых площадок с разных горизонтов поверхности и глубин 10, 30, 50, 70 см, а также после каждого метода обработки. Осадок влажностью 96-98% забирают 0,5 л с помощью черпака или кружки. Осадок по 2 г с 10 точек помещают в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 3 мин при 1000 об./мин. Надосадочную жидкость сливают. Полученный осадок, а также доставленные твердые осадки (70% влажности и ниже) смешивают и заливают детергент № 2 из расчета 1:4, тщательно размешивают и оставляют на 15-20 мин. Надосадочную жидкость с отделившимися возбудителями сливают в чистую пробирку. Для осаждения возбудителей добавляют такое же количество дистиллированной воды (1:1), размешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 3 мин при 1500 об./мин. Надосадочную жидкость сливают, из осадка готовят препараты на предметных стеклах с раствором Люголя, покрывают покровными стеклами и микроскопируют с использованием 100-600-кратного увеличения (объективы – 10х, 40х, окуляры – 10х, 15х) сухой оптической системы.

Для исследования на ооцисты криптоспоридий осадок наносят на предметные стекла, высушивают и проводят окраску по Цилю – Нильсену. Крашенные мазки микроскопируют, используя масляно-иммерсионный 90-100-кратный объектив или фазово-контрастное микроскопирование.

Донные отложения

В нескольких местах каждого пункта со дна реки или другого водоема берут среднюю пробу донных отложений объемом 20 г и исследуют по методике, предложенной для осадков сточных вод.

Сточные воды

Взятие проб должно быть не менее: 2-3 л неочищенной (до поступления на очистные сооружения); 3-5 л после сооружений механической очистки; 10-15 л после вторичных отстойников, биологических прудов, полей фильтрации, земледельческих полей орошения

(дренажные воды). Пробы сточной воды необходимо брать каждый час в течение суток (среднесуточная) или дня (с 7 до 20 часов – среднедневная), отдельными порциями по 0,5-1 л в большую емкость. Из нее после тщательного размешивания воды отбирают для исследования 3-4 пробы указанных объемов.

Ход исследования. Пробы неочищенных сточных вод и стоков, прошедших сооружения механической очистки отстаивают. Через 20 мин осветленную жидкость сливают, а осадок со слоем 2-3 см надосадочной воды переносят в центрифужные пробирки объемом 250 мл и центрифугируют в течение 3-5 мин при 1500 об./мин. После этого надосадочную жидкость сливают. Образовавшийся осадок заливают детергентом № 2 из расчета 1:4, тщательно размешивают и оставляют на 20 мин. Надосадочную жидкость с отделившимися возбудителями сливают в чистую пробирку. Для осаждения возбудителей добавляют такое же количество дистиллированной воды (1:1), размешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 3 мин при 1500 об./мин. Надосадочную жидкость сливают, из осадка готовят препараты на предметных стеклах с раствором Люголя, покрывают покровными стеклами и микроскопируют с использованием 100-600-кратного увеличения (объективы – 10х, 40х, окуляры – 10х, 15х) сухой оптической системы.

Для исследования на ооцисты криптоспоридий осадок наносят на предметные стекла, высушивают и проводят окраску по Цилю – Нильсену. Крашенные мазки микроскопируют, используя масляно-иммерсионный 90-100-кратный объектив или фазово-контрастное микроскопирование.

Оценка результатов

Для проведения качественной оценки результатов необходимо, чтобы каждая проба была взвешена или измерена в одних и тех же единицах: почва и донные отложения – 0,1 или 1 кг, вода – 1 л. 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 1 кг, 1 л.

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 обследовании проб почвы с территории необходимо прилагать масштабную карту с указанием на ней мест взятия проб, а также основных направлений движения поверхностного стока и других ландшафтно-климатических особенностей селитебной территории.

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 спорозоита 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. Зрелое яйцо (способное заразить при заглатывании) содержит внутри подвижную личинку, свернувшуюся кольцевидно или перекрестно. Плотность 1,10-1,14.

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 лимонообразную 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

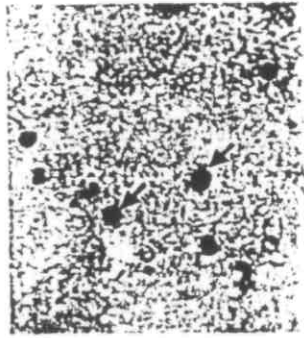


Рис. 1. Ооцисты криптоспоридий (окраска по Цилю — Нильсену)



Рис. 2. Цисты лямблий

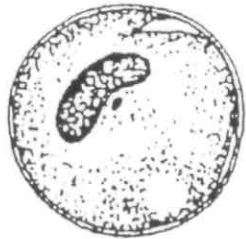


Рис. 3. Циста балантидия кишечного

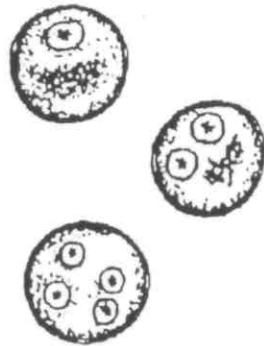


Рис. 4. Цисты амебы дизентерийной

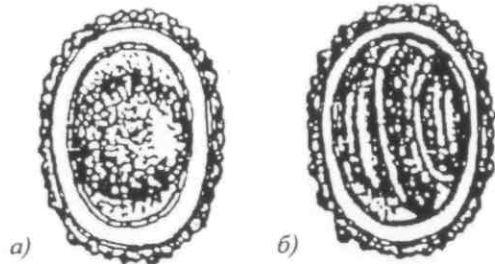


Рис. 5. Яйца аскариды человеческой (свиной): а) оплодотворенное; б) инвазионное

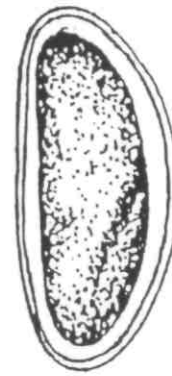


Рис. 6. Яйцо острицы

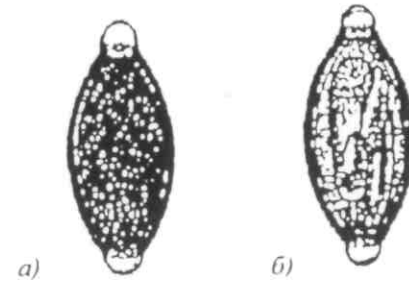


Рис. 7. Яйца власоглава: а) свежесвыделенное; б) инвазионное

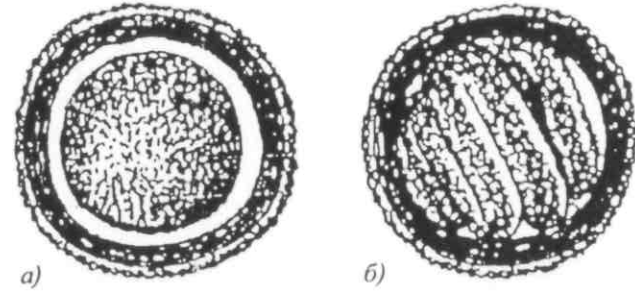


Рис. 8. Яйца аскариды собачьей (токсокары): а) на начальной стадии развития; б) инвазионное



Рис. 9. Онкосфера тениид

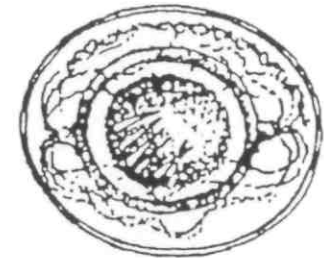


Рис. 10. Яйцо цепня карликового