

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный врач  
Республики Беларусь



В.И. Ключенович

31 декабря 2003 г.

Регистрационный № 146–1102

**ЛАБОРАТОРНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ  
ВОДЫ НА НАЛИЧИЕ ООЦИСТ  
КРИПТОСПОРИДИЙ**

Инструкция по применению

*Учреждение-разработчик:* НИИ эпидемиологии и микробиологии

*Авторы:* Л.В. Скрипова, Н.А. Романенко, Г.И. Новосильцев

## **ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время назрела необходимость разработки подходов к количественной оценке эпидемиологической значимости различных объектов окружающей среды в передаче инвазионного материала, а также экономически выгодных методов обнаружения возбудителей паразитарных болезней.

Заслуживают внимания исследования, направленные на разработку простых и эффективных методов индикации многих таксономических, разноплановых паразитарных агентов (гельминтов, энтеропатогенных простейших, в том числе ооцист криптоспоридий и др.) на различных объектах окружающей среды.

Существующие методики для проведения санитарно-паразитологических исследований воды не предназначены для индикации ооцист криптоспоридий из-за потери возбудителей на всех этапах исследования, т.е. при заборе и доставке проб, фильтровании (задержка возбудителей на фильтрах). Для применения иммуноферментного анализа (ИФА) требуется более сложная подготовка диагностического материала и использование дорогостоящих специальных тест-систем, не выпускающихся в настоящее время отечественными производителями.

Таким образом, назрела необходимость разработки эффективного и экономически выгодного метода обнаружения ооцист криптоспоридий в водной среде. Предлагаемый нами метод обеспечивает эффективное (70–80%) обнаружение ооцист криптоспоридий в воде. Метод найдет применение при осуществлении предупредительного и текущего санитарного надзора за работой санитарно-технических сооружений по обеззараживанию питьевых вод, сточных вод и их осадков, а также при проведении оздоровительных мероприятий в очагах паразитарных болезней.

## **НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ**

Настоящая инструкция устанавливает метод лабораторного исследования качества воды хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования на наличие ооцист криптоспоридий, проводимого в порядке государственного санитарно-эпидемиологического надзора с целью безопасности для здоровья человека.

Инструкция предназначена для применения в лабораториях учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, а также ведомственный контроль качества воды поверхностных и подземных источников воды.

## **МЕТОД ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДЫ НА НАЛИЧИЕ ООЦИСТ КРИПТОСПОРИДИЙ**

Методика предназначена для обнаружения в воде ооцист криптоспоридий, представляющих непосредственную угрозу для здоровья человека при их заглатывании, при осуществлении контроля качества воды по паразитологическим показателям в источниках хозяйственно-питьевого водоснабжения (поверхностных водоемах, ручьях, каптажах, колодцах, артезианских скважинах), в распределительной сети систем централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, а также в водоемах рекреационного назначения.

### **Принцип метода**

Ооцисты криптоспоридий обнаруживаются при микроскопическом исследовании осадка, получаемого после центрифугирования воды, обработанной коагулянтами, сорбентами и 3% хлористоводородной кислотой. Осаждение ооцист криптоспоридий происходит за счет коагуляции и адсорбции (прилипание, поглощение), внесенных в воду коагулянтов и сорбентов в процессе ее обработки и центрифугирования.

### **Чувствительность метода**

Метод обладает чувствительностью с пределом обнаружения, равным единичным ооцистам на 1 л воды. Эффективность выделения ооцист криптоспоридий данным методом зависит от исходной концентрации паразитарных патогенов в пробе, объема пробы, мутности, обилия фитопланктона.

## **ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

### **Оборудование**

1. Лабораторная центрифуга типа ОПН-3, ОПН-8, ЦЛС-31 М со сменным ротором или другие с аналогичными параметрами, обеспечивающие 1500–2500 об./мин (600–650 g), позволяющая центрифугировать пробы воды в центрифужных пробирках объемом 10–250 мл.

2. Холодильник электрический или газовый, поддерживающий температуру 4–6° С.

3. Термостат электрический типа ТС-80 или аналогичный с автоматическим терморегулятором с ценой деления 0,2° С.

4. Микроскоп биологический (типа МБИ, «БИОЛАМ» и др.), снабженный бинокулярной насадкой (АУ-12 и др.), препаратоводителем (типа СТ-12), имеющий объективы 10, 20, 40 и объектив 90–100х масляной иммерсии, а также желательны объектив 40–65х водной иммерсии, обеспечивающий увеличение от 100 до 1000 крат, имеющий объектив и укомплектованный окуляр-микрометром и объект-микрометром для калибровки первого, а также имеющий оптику фазового контраста, расширяющую возможности дифференциации ооцист от фитопланктона.

5. Осветитель ОИ-19 для микроскопа или другой аналогичный с мощностью лампы не менее 50 Вт.

6. Весы лабораторные для взвешивания в диапазоне 50 мг – 20 г (равноплечные ручные (аптекарские) с разновесами, ВЛР 200 г или др.).

7. Денсиметры (ареометры типа I (АI) с пределами измерения от 1000 до 1400 кг/м<sup>3</sup> (ГОСТ 1300–74).

8. Дозаторы пипеточные ПП-0,1, ПП-0,5, ПП-1,0 мл (ТУ 64–339–81).

9. Пинцет анатомический.

10. Стаканы стеклянные высокие с носиком (ВН) номинальной вместимостью 50–100 мл (ГОСТ 10394–63).

11. Пробирки центрифужные градуированные (ПЦГ) емкостью 10 мл (ГОСТ 1770–64).

12. Стекла предметные 25 × 75 мм.

13. Стекла покровные 18 × 18, 24 × 24 мм (6672–59).

14. Часы песочные на 3–5 мин или часы сигнальные.

15. Штативы лабораторные для пробирок (ТУ 64–1–707–80).

16. Емкости для отбора проб воды из нейтрального материала, пригодные для обеззараживания принятыми методами (канистры пластмассовые емкостью 20–25 л, стеклянные бутылки, флаги молочные металлические емкостью 30–35 л, эмалированные бидоны).

17. Цилиндры измерительные с носиком 1–00, 1–25, 1–500 (ГОСТ 1770–74).

18. Колба 2–50–2, 2–100–2, 1–1000 (ГОСТ 1770–74).
19. Широкогорлые стеклянные или пластиковые флаконы емкостью 100–500 мл с притертыми или завинчивающимися крышками.
20. Спиртовка.
21. Иглы препаровальные.
22. Ножницы с прямыми браншами.
23. Фильтровальная бумага.

### **Реактивы**

1. Вода дистиллированная (ГОСТ 6709–72).
2. Сульфат алюминия  $[Al_2(SO_4)_3]$ .
3. Сульфат меди  $(CuSO_4)$  х.ч.
4. Сульфат железа  $[Fe_2(SO_4)_3]$  х.ч.
5. Оксид алюминия  $(Al_2O_3)$ .
6. Древесный уголь БАУ-2.
7. Фуксин водорастворимый х.ч.
8. Карболовая кислота х.ч.
9. Спирт этиловый ректифицированный (ГОСТ 5962–67).
10. Твин-80.
11. Метиленовый синий сухой х.ч.
12. Иммерсионное масло.

### **Приготовление рабочих растворов реактивов**

1. Карболовый фуксин: 1 г основного фуксина растворяют в 10 мл этилового спирта, раствор выливают в 100 мл 5% раствора карболовой кислоты.
2. Солянокислый спирт: 3 мл соляной кислоты и 97 мл этилового спирта.
3. Водный 0,5% раствор метиленового синего.
4. Раствор 0,002% Твин-80: 1 мл концентрированного Твин-80 растворить в 500 мл воды.

## **ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Отбор и хранение проб**

Отбор проб питьевой воды и воды плавательных бассейнов по количеству и кратности проводят в соответствии с СанПиН «2.1.4. Питьевая вода и водоснабжение населенных мест. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных

систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Санитарные правила и нормы СанПиН 10–124 РБ 99», раздел «паразитологический показатель».

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

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

Отбор проб воды производится в чистые емкости. Сосуды больших объемов (молочные фляги, металлические и пластмассовые ведра и т.п.) тщательно промываются кипяченой водой и ополаскиваются отбираемой для анализа водой.

Пробы воды могут доставляться в лабораторию без обработки или (в целях облегчения их транспортирования) после предварительной обработки — концентрирования материала путем коагуляции и адсорбции с помощью таких коагулянтов, как сульфат алюминия, сульфат железа, сульфат меди, и сорбента (древесный уголь БАУ-2 или оксид алюминия).

В пробу воды на месте отбора одновременно добавляют один из коагулянтов и сорбент в дозе 0,4–0,6 г/л, затем тщательно перемешивают и отстаивают 15–20 мин. После этого надосадочную жидкость удаляют, осадок переносят в сосуд объемом 1 л, доставляют в лабораторию и обрабатывают по нижеописанной методике.

Пробы, не прошедшие предварительную обработку, могут храниться при температуре 15–20° С не более двух суток.

### **Ход исследования**

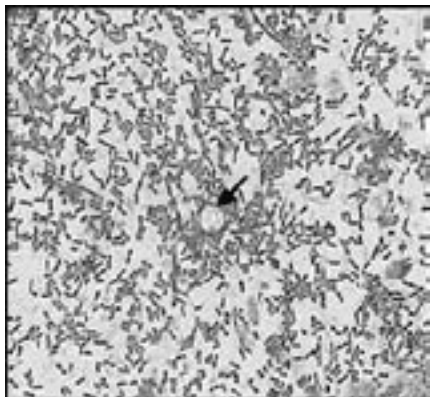
Питьевая вода исследуется в объеме не менее 50 л, вода водоисточников — в объеме не менее 25 л. В пробу воды одновременно добавляют один из коагулянтов (сульфат алюминия, сульфат железа, сульфат меди) и сорбентов (БАУ-2,  $Al_2O_3$ ) в количестве 0,4–0,6 г/л, тщательно смешивают, оставляют на 15–20 мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают, осадок энергично встряхивают и переносят в центрифужные пробирки, центрифугируют в течение

3 мин при 1000 об./мин. Воду сливают, к осадку добавляют по 6–8 мл 0,002% раствора Твин-80. Смесь размешивают и вновь центрифугируют, надосадочную жидкость сливают в чистую пробирку, добавляют столько же воды и центрифугируют в течение 3 мин при 1000 об./мин, надосадочную жидкость выливают, а осадок наносят на предметные стекла, высушивают на воздухе. Высушенный на воздухе осадок фиксируют над пламенем горелки, красят. При этом нужно избегать следующих ошибок:

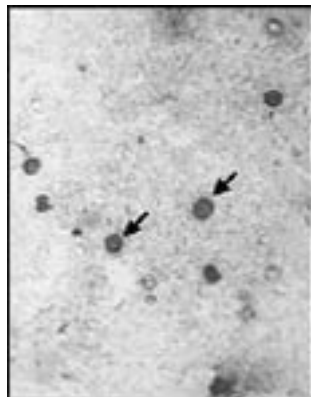
- изготовления слишком толстых препаратов;
- фиксирования плохо высушенных мазков;
- недостаточной фиксации;
- длительной фиксации над пламенем.

### Ход окраски

1. На высушенный препарат кладут кусочек фильтровальной бумаги и наливают раствор карболового фуксина.
2. Препарат нагревают над пламенем горелки до появления паров, охлаждают и снова нагревают (3 раза).
3. Дают остыть, сбрасывают фильтровальную бумагу.



*Рис. 1. Окраска по Граму (непрокрашенное округлое образование, отмеченное стрелкой, является криптоспоридиальной ооцистой)*



*Рис. 2. Окраска на кислотоустойчивость по Цилю — Нильсену (округлые образования, отмеченные стрелками, являются ооцистами Cryptosporidium)*

4. Опускают препарат в солянокислый спирт для обесцвечивания. Обесцвечивают до полного отхождения окраски.

5. Промывают водой.

6. Докрашивают препарат метиленовым синим в течение 20–30 с.

7. Промывают водой и высушивают на воздухе. Микроскопируют с иммерсионной системой весь объем полученного осадка.

Ооцисты криптоспоридий окрашиваются в красный, все остальные элементы и бактерии — в синий. При окраске по Граму ооцисты не прокрашиваются и остаются бесцветными (рис. 1, 2).

Микроскопирование и идентификация паразитарных патогенов в пробах воды должны выполняться специалистом, умеющим отличать их от фитопланктона и яиц гидробионтов.

На обработку одной пробы требуется не менее 10 человеко-часов. Результат анализа может быть получен не ранее чем на следующий рабочий день после доставки пробы.

При микроскопировании подсчитывают число паразитарных патогенов во всем объеме осадка, что соответствует их числу в исследованной пробе.