

Утверждаю
Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации
Г.Г.ОНИЩЕНКО
19 июня 1997 года

Дата введения - с момента
утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

САНИТАРНО - ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ МУК 4.2.668-97

1. Подготовлены авторским коллективом в составе: к.м.н. Новосильцев Г.И., д.м.н. Романенко Н.А. (ИМПитМ им. Е.И. Марциновского МЗ РФ), к.б.н. Рябченко В.А., Горяинова Г.С. (НИИКВОВ АКХ им. К.Д. Памфилова).

При подготовке Методических указаний использованы материалы, разработанные сотрудниками НИИКВОВ АКХ им. К.Д. Памфилова к.м.н. Русановой Н.А., к.т.н. Медришем Г.Л.

2. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 19 июня 1997 года.

3. Введены впервые.

Назначение и область применения

Настоящие Методические указания являются первым опытом методического обеспечения контроля качества воды питьевой, плавательных бассейнов и источников хозяйственно - питьевого водоснабжения по паразитологическим показателям, вновь внедренным в:

- СанПиН "Требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества" 2.1.4.559-96;

- СанПиН "Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды плавательных бассейнов" 2.1.2.568-96;

- СанПиН "Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации" 3.2.563-96, разработанных в развитие Закона РСФСР "О санитарно - эпидемиологическом благополучии населения" и предназначенных для паразитологов городских, районных, областных, краевых и республиканских центров госсанэпиднадзора и специалистов ведомственных лабораторий, осуществляющих контроль качества воды систем централизованного водоснабжения.

Методика предназначена для обнаружения цист патогенных простейших кишечника и яиц гельминтов в воде при осуществлении контроля качества воды по паразитологическим показателям в источниках хозяйственно - питьевого водоснабжения (поверхностных водоемах, ручьях, каптажах, колодцах, артезианских скважинах, в распределительной сети систем коммунального водоснабжения и плавательных бассейнах).

1. Принцип методики

Цисты патогенных простейших кишечника и яйца гельминтов обнаруживаются при микроскопическом исследовании осадка, получаемого после центрифугирования не менее 4-кратно разведенного раствора флотанта, в который искомые паразитарные агенты попадают из осадка, смываемого с мембранных фильтров после фильтрации через них определенных объемов исследуемой воды. Осаждение цист простейших и яиц гельминтов происходит за счет резкого снижения плотности флотанта, которая после разведения становится ниже таковой паразитарных агентов.

2. Чувствительность метода

Паразитарные патогены (цисты лямблий, амебы дизентерийной, балантидия кишечного, яйца гельминтов) могут быть обнаружены при содержании их в количестве не менее 1 экземпляра в 25 куб. дм воды из водоемных источников и в 50 куб. дм воды питьевой.

3. Оборудование и материалы

3.1. Устройство для вакуумной фильтрации через мембранные фильтры: стационарное устройство, используемое для бактериологических и химических исследований в лабораториях водоочистных станций и центров ГСЭН (фильтровальный аппарат АФ, выпускаемый заводами Минжилкомхоза РФ; фильтровальный аппарат типа Рублевского или другой аналогичный; при отсутствии указанных стационарных установок может быть использован аппарат Гольдмана, колбы для фильтрования под вакуумом номинальной вместимостью 2000 - 5000 мл (ГОСТ 6514-63), водоструйный насос (ГОСТ 10696-75) или насос Комовского, а в полевых условиях - ручной велосипедный насос (или другой с аналогичными свойствами).

3.2. Мембранные фильтры с размером пор 1 - 4 микрон и диаметром мембранного диска, соответствующим размерам фильтровальной ячейки фильтровального устройства, - обычно 35 +/- 2 мм (фильтры мембранные нитроцеллюлозные N 6 Мытищинской экспериментальной фабрики ультрафильтров; фильтрующие мембраны Владипор марки МФА-МА N 10 Казанского ПО "Тасма", "Миллипор", "Прагопор", "Сарториус" или другие с аналогичными свойствами).

3.3. Лабораторная центрифуга, обеспечивающая 1500 - 2500 об./мин. (600 - 650 г), позволяющая центрифугировать пробы воды объемом 10 мл (типа ОПН-3, ОПН-8, ЦЛС-31М со сменным ротором).

3.4. Холодильник электрический или газовый, поддерживающий температуру 4 - 6 град. С.

3.5. Термостат электрический с автоматическим терморегулятором и термометром с ценой деления 0,2 град. С (ТС-80 или аналогичный).

3.6. Микроскоп биологический (типа МБИ, "БИОЛАМ" и др.), снабженный препаратоводителем (типа СТ-12) и обеспечивающий увеличение от 50 до 900 крат.

3.7. Осветитель ОИ-19 для микроскопа или другой аналогичный.

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

3.9. Денсиметры (ареометры типа I (AI) с пределами измерения от 1,000 до 1,400 кг/куб. м (ГОСТ 1300-74).

3.10. Дозаторы пипеточные ПИ-0,1, ПИ-0,5, ПИ-1,0 мл (ТУ 64-339-81).

3.11. Пинцет анатомический.

3.12. Кисти мягкие (из волоса белки, колонка или соболя) для живописи, N 12 - 18.

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

3.14. Пробирки центрифужные градуированные (ПЦГ) емкостью 10 мл (ГОСТ 1770-64).

3.15. Стекла предметные 25 x 75 мм.

3.16. Стекла покровные 18 x 18, 24 x 24 мм (ГОСТ 6672-59).

3.17. Чашки биологические (Петри) по ГОСТу 25336-82.

3.18. Часы песочные на 3 - 5 мин. или часы сигнальные.

3.19. Штативы лабораторные для пробирок (ТУ 64-1-707-80).

3.20. 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.

3.21. Цилиндры измерительные с носиком 1-00, 1-25, 1-500 (ГОСТ 1770-74).

3.22. Колба 2-50-2, 2-100-2, 1-1000 (ГОСТ 1770-74).

3.23. Капельница для многократной дозировки по Манну (ГОСТ 9876-61).

3.24. Широкогорлые стеклянные или пластиковые флаконы емкостью 100 - 500 мл с притертыми или завинчивающимися крышками.

3.25. Спиртовка.

3.26. Иглы препаровальные.

4. Реактивы

4.1. Формальдегид 40-процентный (продажный).

4.2. Сульфат цинка семиводный (ZnSO₄ · 7H₂O), х.ч.

4.3. Сахароза, ч.д.а.

4.4. Сульфат магния (MgSO₄), ч.д.а.

4

4.5. Тиосульфат натрия по ГОСТу 244-76.

4.6. Вода дистиллированная по ГОСТу 6709-72.

4.7. Натрий хлористый, х.ч. (ГОСТ 4233-77).

4.8. Йод кристаллический, х.ч.

4.9. Калий йодистый (KI), х.ч.

4.10. Эозин сухой, х.ч.

4.11. Метиленовый синий сухой, х.ч.

4.12. Кислота молочная, х.ч.

4.13. Панкреатин.

4.14. Пепсин (возможен искусственный).

4.15. Трипсин.

4.16. Натрий двууглекислый, ч.д.а.

4.17. Спирт этиловый ректифицированный по ГОСТу 5962-67.

5. Приготовление рабочих растворов реактивов

5.1. Флотанты, любой из 3-х названных:

- 33-процентный водный раствор семиводного сульфата цинка:

331 г семиводного сульфата цинка (ZnSO₄ · 7H₂O) растворяют в

4 2

1 куб. дм кипящей дистиллированной воды;

- 30-процентный водный раствор сахарозы: 300 г сахарозы ч.д.а. растворяют в 1 дм горячей дистиллированной воды;

- раствор, состоящий из смеси насыщенных растворов сульфата магния, тиосульфата натрия и дистиллированной воды, соотношение компонентов 3:3:1.

После приготовления флотанта и снижения его температуры до 18 град. С контролируют его удельную плотность ареометром. Для выделения цист простейших и яиц гельминтов, представляющих непосредственную опасность заражения человека при заглатывании с водой, удельная плотность флотанта должна быть 1,3. Если величина этого показателя ниже, ее нужно откорректировать, добавляя более концентрированные растворы соответствующих веществ.

5.2. 2-процентный раствор Люголя: 1 г йода кристаллического и 2 г калия йодистого растворяют в 100 мл дистиллированной воды (первым растворяют калий йодистый), выдерживают в темноте при 37 град. С в течение 3 суток, после чего используют в работе.

5.3. 2-процентный водный раствор формалина: 1 часть продажного 40-процентного формальдегида растворяют в 20 частях дистиллированной воды.

5.4. Жидкость Барбагалло: готовят 3% формалина на физиологическом растворе (0,85%) хлорида натрия.

5.5. Приготавливают 1-процентный водный раствор эозина.

5.6. Приготавливают раствор, состоящий из 1 части метиленового синего и 50000 частей дистиллированной воды.

5.7. Приготавливают смесь, состоящую из 0,5 г панкреатина, двууглекислой соды - 0,9 г, дистиллированной воды - 5 мл.

6. Отбор и хранение проб

Отбор проб воды производится в чистые (желательно стерильные) емкости. Большие емкости - молочные фляги, металлические ведра и пр. могут быть предварительно обработаны путем обжига их внутренней поверхности с использованием этилового спирта.

Пробы необходимого объема могут доставляться в паразитологическую лабораторию без обработки или в целях облегчения их транспортирования - после предварительной обработки - концентрирования материала путем фильтрования на месте отбора проб, в лаборатории водопроводной станции и др. Пробы, не прошедшие предварительную обработку, могут храниться при температуре 15 - 20 град. С не более 2-х суток.

7. Ход исследования

Питьевая вода исследуется в объеме 50 куб. дм; вода водоисточников - в объеме 25 куб. дм.

Исследуемый объем воды с помощью фильтровального устройства пропускают через мембранные фильтры (см. п. 3.2). По мере замедления процесса фильтрации из-за загрязнения фильтра его заменяют новым, а использованные фильтры с осадком помещают в широкогорлую емкость (стаканчики ВН) с помощью стерильного пинцета и заливают исследуемой водой в количестве 10 - 50 мл для сохранения их во влажном состоянии.

По окончании фильтрации всей пробы осуществляется смыв осадка с фильтров. Каждый фильтр стерильным пинцетом опускается в стаканчик с дистиллированной водой; придерживая пинцетом фильтр, осторожно смывают осадок при помощи мягкой кисточки, затем фильтр еще раз прополаскивают в другой порции дистиллированной воды. По окончании отмытки всех фильтров кисточку также тщательно прополаскивают в небольшом объеме дистиллированной воды (5 - 10 мл). Процедура отмытки фильтров и кисточки требует особой тщательности во избежание возможных потерь цист простейших и яиц гельминтов.

Весь полученный смыв центрифугируют в пробирках емкостью 10 мл в течение 5 мин. при 1500 об./мин. (600 g). Надосадочную жидкость сливают. При отсутствии необходимости определения жизнеспособных цист и яиц гельминтов осадок ресуспендируют в 6 - 8 мл 2-процентного водного формалина. Если предполагается определение жизнеспособности паразитарных патогенов, к осадку добавляют воду. Суспензии вновь центрифугируют в прежнем режиме, после чего удаляют надосадочную жидкость, а к осадку добавляют 3 мл одного из флотантов (предпочтительнее 33-процентный водный раствор семиводного сульфата цинка). Центрифугируют 5 мин. при 2000 об./мин., после чего надосадочную жидкость переливают в центрифужную пробирку, разбавляют в 4 раза и более дистиллированной водой. Центрифугируют в прежнем режиме, удаляют надосадочную жидкость, а из осадка готовят препараты на предметных стеклах.

В зависимости от задач исследования препарат либо не окрашивают, либо подвергают окраске. Если нужно провести подсчет паразитарных агентов без определения их жизнеспособности или требуется визуальное определение вероятной жизнеспособности цист кишечных простейших и яиц гельминтов, препарат не окрашивается или его окрашивают 1 каплей 2-процентного раствора Люголя. Вероятную жизнеспособность цист лямблий можно определять, окрашивая препарат 1 каплей 1-процентного водного эозина.

Готовые препараты накрывают покровным стеклом и микроскопируют с использованием 100 - 600-кратного увеличения (объективы - 10x, 40x, окуляры - 10x, 15x) сухой оптической системы или водной иммерсии. Таким образом микроскопируется весь объем полученного осадка. При необходимости проводят визуальную оценку вероятной жизнеспособности цист лямблий и других простейших, а также яиц гельминтов.

8. Оценка результатов исследования

При микроскопии подсчитывают число паразитарных патогенов во всем объеме осадка, что соответствует их числу во всей исследованной пробе, пересчитывают на содержание их в 1 л (куб. дм), одновременно определяют систематическую принадлежность обнаруживаемых паразитических организмов; идентификация их проводится по следующим признакам.

Цисты лямблий - овальная форма, размеры 10 - 14 микрон в длину и 6 - 10 микрон в ширину; незрелые цисты содержат 2 ядра, зрелые - 4; ядра находятся у переднего полюса цисты. Оболочка цист 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.

Цисты амебы дизентерийной - округлая, редко овальная форма, размеры от 10 до 16 микрон; молодые цисты содержат 1 - 2 ядра с центрально расположенной звездчатой кариосомой, зрелые цисты содержат 4 - 6 ядер; в зрелых четырехядерных и незрелых двухядерных 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.

Цисты балантидия кишечного - правильная круглая форма. Плотная двухконтурная оболочка. Средний размер около 50 микрон. 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. Ниже приводятся признаки, по которым идентифицируются яйца гельминтов, представляющих непосредственную угрозу заражения человека при заглатывании их с водой.

Яйца аскариды человеческой (свиной) - оплодотворенные яйца овальной или шаровидной формы. Наружная оболочка крупнобугристая, толстая, коричневого цвета (иногда встречаются яйца без наружной бугристой оболочки). Размер яиц 50 - 70 x 40 - 50 микрон. Яйцеклетка мелкозернистая и шаровидная, расположена в центре яйца.

Инвазионное яйцо (способное заразить при заглатывании), находящееся на последней стадии созревания, содержит внутри живую подвижную личинку, свернувшуюся кольцевидно или перекрестно.

Яйца токсокары (аскариды собачьей) - почти круглые, 65 - 75 микрон 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.

Яйца власогиава - симметричные, имеют лимонобразную или бочонкообразную форму. Оболочка темно - коричневая, толстая. На обоих полюсах имеются светлоокрашенные пробковидные образования. Размеры яиц 50 - 54 x 23 - 26 микрон. В зрелых инвазионных яйцах видна подвижная личинка.

Яйца острицы - асимметричные. Одна сторона заметно уплощена, другая выпукла. Размеры 50 - 60 x 30 - 32 микрон. Оболочка тонкая, гладкая и бесцветная. Яйца могут быть на различных стадиях созревания, до головастикоподобной личинки включительно.

Яйца цепня карликового - оболочка яйца бесцветная, тонкая, гладкая. Форма овальная. Размер яиц 40 x 50 микрон, эмбриофора (зародыш) почти шаровидная (29 x 30 микрон), с длинными нитевидными придатками на полюсах.

Онкосферы тениид - овальная форма, размеры 31 - 40 x 2 - 30 микрон; имеют тонкую наружную оболочку и толстую радиально - исчерченную внутреннюю оболочку темно - коричневого цвета. Внутри онкосферы находится зародыш - эмбриофора с шестью зародышевыми крючьями.

Визуальная оценка вероятной жизнеспособности цист патогенных простейших кишечника и яиц гельминтов

Оценка вероятной жизнеспособности цист патогенных простейших и яиц гельминтов визуально проводится по следующим критериям, подтверждающим жизнеспособность:

- целостность наружной оболочки (отсутствие ее разрывов, вдавлений, вздутия, сморщивания);
- четкая внутренняя структура цисты или яйца: для цист - четко видны ядра, отсутствует зернистость (для цист лямблий дополнительно должны быть видны аксостили, жгутиковый аппарат, медиальное тело); для яиц гельминтов - наличие дробящейся зародышевой клетки или подвижной личинки (для аскарид, токсокар, власогиавов, остриц), попарное расположение зародышевых крючьев у живых и беспорядочное у мертвых онкосфер тениид и яиц карликового цепня;

- при окраске препарата 1-процентным водным раствором эозина жизнеспособные цисты лямблий не воспринимают окраску в течение первых 5 минут, мертвые окрашиваются сразу же в розовый цвет. Поэтому указанную окраску следует использовать до микроскопии только в том случае, когда на изучение препарата потребуется не более 5 минут. Часто просмотр мазка длится 15 - 30 минут, тогда 1-процентный водный эозин можно вводить аккуратно, не сдвигая препарат, под покровное стекло пипеткой в точку, где при предварительном просмотре уже обнаружены цисты лямблий;

- жизнеспособность онкосфер тениид и яиц аскарид, содержащих личинку, определяют путем окрашивания препарата смесью, содержащей метиленовый синий. Живые онкосферы и личинки, находящиеся внутри яиц аскарид, не окрашиваются в течение первых 15 минут. Мертвые окрашиваются сразу в синий цвет;

- жизнеспособность онкосфер тениид можно также определить по движению зародышей при воздействии на них пищеварительными ферментами. Для этого исследуемый осадок, содержащий онкосферы, помещают на часовое стекло в искусственный дуоденальный сок (см. п. 5.7). Стекло ставят в термостат при 36 - 38 град. С на 4 часа. Живые зародыши освобождаются от оболочек, а мертвые - нет.

Оболочки жизнеспособных онкосфер растворяются также в подкисленном пепсине и в щелочном растворе трипсина через 6 - 8 часов при температуре 38 град. С.

Дополнение к разделу 6. Отбор и хранение проб

В случае, если первичная обработка воды пробы (фильтрование) проводилась вне паразитологической лаборатории, использованные фильтры помещают в широкогорлый флакон, добавляют

10 - 15 мл исходной воды; закрывают флакон завинчивающейся или притертой крышкой, маркируют, указывая дату, место отбора, количество профильтрованной воды, и транспортируют в паразитологическую лабораторию для дальнейшего исследования. При невозможности исследования в день отбора материал хранят при 4 град. С не более суток; при отсутствии необходимости определения жизнеспособности цист кишечных простейших и яиц гельминтов материал хранят не более 3 - 4 суток после добавления в него формальдегида с таким расчетом, чтобы концентрация его в суспензии составила 2%.

Дополнение к разделу 7. Ход исследования

Перед началом фильтрации мембранные фильтры должны быть подвергнуты 10-минутному кипячению в дистиллированной воде для удаления посторонних частиц из пор фильтров, препятствующих оптимальному проведению процесса фильтрации.

Схема выполнения методики санитарно - паразитологического исследования воды и изображения, определяемых с ее помощью цист кишечных патогенных простейших и яиц гельминтов, представлены в приложениях 1, 2, 3 <*>.

<*> Не приводятся.
