ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 71328— 2024

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Санитарно-вирусологические методы исследования воды

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2024

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Российской ассоциацией водоснабжения и водоотведения совместно с Техническим комитетом по стандартизации ТК 343 «Качество воды», Федеральным государственным бюджетным учреждением «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России), Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи») Минздрава России, Федеральным бюджетным учреждением науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН РостовНИИМП Роспотребнадзора)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 343 «Качество воды»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 4 апреля 2024 г. № 414-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2024

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Сокращения 2
5 Общелабораторное оборудование, расходные материалы, реактивы, питательные среды 2
6 Общие требования 3
7 Подготовка к исследованию 3
8 Отбор, транспортирование, хранение проб 5
9 Концентрирование проб воды 6
10 Идентификация вирусов в воде 17
Приложение А (обязательное) Расчет титра вируса 28
Библиография 32

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Санитарно-вирусологические методы исследования воды

Water quality.
Sanitary-virological methods of water research

Дата введения — 2024—05—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на питьевую воду централизованного и нецентрализованного, в том числе горячего, хозяйственно-бытового водоснабжения, упакованную питьевую воду, включая природную минеральную воду, воду поверхностных пресноводных и морских водоемов, подземных источников водоснабжения, технического водоснабжения, воды бассейнов и аквапарков (кроме бассейнов, используемых в бальнеологических целях), сточную воду.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:
ГОСТ 25151 Водоснабжение. Термины и определения
ГОСТ 27065 Качество вод. Термины и определения
ГОСТ 30813 Вода и водоподготовка. Термины и определения
ГОСТ 31942—2012 (ISO 19458:2006) Вода. Отбор проб для микробиологического анализа
ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ Р 59053 Охрана и рациональное использование вод. Термины и определения
ГОСТ Р 70152 Качество воды. Методы внутреннего лабораторного контроля

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 59053, ГОСТ 25151, ГОСТ 27065 и ГОСТ 30813.

Издание официальное

4 Сокращения

В настоящем стандарте применены следующие сокращения:
БОЕ — бляшкообразующая единица;
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;
КРС — крупный рогатый скот;
МЕ — международная единица;
ос. ч. — особо чистый;
ПЦР — полимеразная цепная реакция;
ПЭГ — полиэтиленгликоль;
РНК — рибонуклеиновая кислота;
УМ — ультрафильтрационная мембрана;
$ТЦД_{50}$ — тканевая цитопатическая доза 50-процентная;
ч.д.а. — чистый для анализа;
ЦПЭ — цитопатогенный эффект;
ЦПА — цитопатогенный агент.

5 Общелабораторное оборудование, расходные материалы, реактивы, питательные среды

Реактивы, расходные материалы и питательные среды указаны в соответствующих разделах.

Необходимые реактивы или их аналоги могут быть приобретены в готовом виде или приготовлены из составляющих веществ в соответствии с методиками по классификации не ниже ч.д.а.

Допускается использование реактивов более высокой квалификации, а также материалов, оборудования, питательных сред, тест-систем с аналогичными или усовершенствованными характеристиками, чем у нижеуказанных.

5.1 Общелабораторное оборудование и расходные материалы:

стерилизатор суховоздушный;

стерилизатор паровой, режим работы от 0 до 2,5 кгс/см^3;

шкаф вытяжной;

бокс микробиологической безопасности (класс II);

весы с разрешающей способностью не более 1 % для обеспечения максимальной допустимой погрешности 5 % по массе.

Примеры

1 Для взвешивания 10 г весы должны обеспечить считывание до 0,1 г.

2 Для взвешивания 1 г весы должны обеспечить считывание до 0,01 г.

pH-метр, обеспечивающий измерение водородного показателя pH с допускаемой точностью ±0,1;

термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 °С до плюс 200 °С, с ценой деления шкалы 1 °С или логгер;

термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 °С до плюс 50 °С, с ценой деления шкалы 0,5 °С или логгер;

термометр спиртовой, позволяющий измерять температуру в диапазоне от 0 °С до плюс 50 °С, с ценой деления шкалы 1 °С (для измерения температуры в холодильниках) или логгеры;

дистиллятор или иное устройство, обеспечивающие получение воды, соответствующей требованиям ГОСТ Р 58144;

встряхиватель для пробирок объемом 15 см^3;

холодильники с температурой в камере плюс (6 ± 2) °С;

камера морозильная с температурой в камере минус 20 °С;

камера морозильная с температурой в камере минус 70 °С;

мешалка магнитная;

дозаторы автоматические различных объемов одноканальные и многоканальные;

горелки газовые или спиртовки;

груши, фингеры или дозаторы автоматические для серологических пипеток;

УФ-облучатели открытого и (или) закрытого типов;

насадки стерилизующие с фильтрами 0,22 и 0,45 мкм для селективной деконтаминации элюатов;

насос перистальтический со скоростью потока от 85 до 100 $см^3$/мин;
канистры полиэтиленовые объемом 5 и 10 $дм^3$;
воронки конические делительные ВД-1—1000 $см^3$;
колбы плоскодонные конические разной вместимости мерные;
пипетки серологические на 1; 5; 10; 25 $см^3$;
пробирки лабораторные 15 и 20 $см^3$;
штативы для пробирок;
цилиндры стеклянные объемом 100 $см^3$; 250 $см^3$; 1000 $см^3$;
штатив химический с держателями и зажимами;
емкость для дезинфицирующего раствора;
наконечники одноразовые для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером и без разных объемов;
шприцы трехкомпонентные стерильные объемом 20 $см^3$;
флаконы пенициллиновые;
пробки силиконовые разных размеров;
корнцанг;
вата;
марля;
пакеты стерилизационные;
стаканы мерные;
шпагат;
фольга алюминиевая.

6 Общие требования

6.1 Требования к квалификации исследователей

К выполнению всех технологических операций (отбор проб, транспортирование, хранение, подготовка проб, исследование и обработка результатов) допускаются лица с высшим или средним специальным образованием либо с иным образованием, прошедшие соответствующую специальную подготовку (обучение) по безопасности работы с микроорганизмами III—IV группы патогенности и по методам проведения санитарно-вирусологических исследований, имеющие навыки работы в области микробиологических или вирусологических исследований.

6.2 Внутренний контроль качества вирусологических исследований

Комплекс выполняемых лабораторией мероприятий и процедур, направленных на обеспечение стандартизации и контроля при проведении вирусологических исследований, изложен в ГОСТ Р 70152 и действующей методической документации [1], [2].

7 Подготовка к исследованию

7.1 Требования к емкостям для отбора проб

Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую стерильную посуду или стерильные или обеззараженные емкости многократного применения с притертыми или завинчивающимися крышками, изготовленными из материалов, не влияющих на жизнедеятельность, не оказывающих инактивирующего действия на микроорганизмы и обеспечивающих неизменность состава пробы. Посуда (емкости) многократного использования должна(ы) быть изготовлена(ы) из материалов, выдерживающих стерилизацию паром и давлением (например, стеклянные бутыли объемом 1 $дм^3$ или пластиковые канистры объемом от 10 до 20 $дм^3$), а также обработку химическими и (или) физическими методами.

Емкости должны быть оснащены плотно закрывающимися пробками (силиконовыми, резиновыми или из других материалов) и защитным колпачком (из алюминиевой фольги, плотной бумаги) или завинчивающимися крышками. Многоразовая посуда, в том числе пробки, должна выдерживать паровую или суховоздушную стерилизацию.

Стерильные емкости открывают непосредственно перед процедурой отбора проб, удаляя пробку вместе со стерильным колпачком. Во время отбора не допускается соприкосновение пробки и краев емкости с посторонними объектами окружающей среды (поверхностями и гранями). Перед проведением процедуры отбора проб ополаскивание посуды не допускается.

При заполнении емкостей должно оставаться пространство между пробкой и поверхностью воды, чтобы пробка не смачивалась при транспортировании.

После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой, обеспечивающей герметичность и не намокающей при транспортировании, и стерильным колпачком или герметично завинчивают крышку.

Вместимость бутыли для отбора проб должна соответствовать объему воды, необходимому для определения всех требуемых вирусологических показателей. Не допускаются отбор и доставка одной пробы для вирусологического исследования в нескольких стерильных емкостях.

При автоклавировании завинчивающиеся крышки не закручивают до конца для того, чтобы обеспечить замещение воздуха в бутыли паром во время повышения температуры. После стерилизации бутыли плотно закрывают завинчивающимися крышками.

Стерилизацию (обеззараживание) многоразовой посуды, которая не выдерживает автоклавирование, осуществляют химическим способом — средствами, разрешенными к применению согласно инструкции производителя.

7.2 Общие требования к подготовке лабораторной посуды для исследования

Лабораторная посуда, применяемая для вирусологических исследований, может быть одноразового и многоразового использования, должна обеспечивать удобство при применении, гарантировать стерильность и эпидемическую безопасность при работе по ГОСТ 31942—2012 (5.3).

Пипетки непосредственно после применения в работе погружают полностью в емкость с рабочим раствором дезинфицирующего средства. Через 30—60 мин экспозиции в дезинфицирующем средстве пипетки одноразового использования подвергают обеззараживанию; пипетки многоразового использования тщательно промывают вначале проточной водопроводной водой, затем дистиллированной водой, после чего высушивают и подвергают обеззараживанию.

После окончания вирусологического исследования использованную лабораторную посуду обеззараживают в автоклаве в соответствии с требованиями [3].

После обеззараживания лабораторную посуду одноразового использования утилизируют в соответствии с требованиями [3].

После обеззараживания лабораторную посуду многоразового использования обезжиривают (например, посредством дихромата калия), тщательно ополаскивают водопроводной водой, моют с применением соответствующих средств, не содержащих фосфаты, многократно промывают проточной водопроводной водой, а затем дистиллированной водой и высушивают.

После высушивания вирусологическую посуду многоразового использования укладывают в металлические пеналы или заворачивают в бумагу. Бумага, применяемая для обертывания лабораторной посуды, не должна разрушаться при стерилизации (например, самоклеящиеся пакеты из крафт-бумаги для паровой, воздушной, пароформальдегидной, этиленоксидной и радиационной стерилизации).

Стерилизацию лабораторной посуды сухим жаром проводят в суховоздушном шкафу одним из следующих способов:

- при температуре плюс (180 ± 3) °С — в течение 1 ч с момента достижения указанной температуры;
- при температуре плюс (160 ± 5) °С — в течение 2,5 ч с момента достижения указанной температуры.

Материалы и лабораторную посуду, разрушающиеся при температуре от 160 °С до 180 °С (резина и т. п.), следует стерилизовать в паровом стерилизаторе при температуре (126 ± 2) °С в течение 60 мин.

После окончания стерилизации лабораторную посуду маркируют с указанием даты стерилизации.

Срок хранения стерильной лабораторной посуды, укупоренной в бумагу или металлические пеналы, составляет не более 30 дней.

7.3 Инактивация дезинфектантов

При отборе проб воды, подвергнутой обеззараживанию химическими реагентами, необходимо проводить нейтрализацию дезинфектанта.

Для нейтрализации остаточного количества галоидактивных (хлор-, бром-, йодактивные) и кислородактивных (перекись водорода, ее комплексы с солями, надуксусная кислота, озон) дезинфектантов

в емкость, предназначенную для отбора проб воды, до стерилизации вносят натрий серноватисто-кислый (тиосульфат натрия) в виде кристаллов из расчета 10 мг на 500 $см^3$ воды.

Для нейтрализации четвертичных аммониевых солей, производных гуанидина, используют лаурилсульфат натрия (сульфонол): из расчета 1 г порошка на 100 $см^3$ воды вносят во флакон до стерилизации.

8 Отбор, транспортирование, хранение проб

8.1 Отбор проб

Отбор проб питьевой воды проводят в стерильные емкости одноразового или многоразового использования, а также специализированные емкости с сорбентом (ловушечные устройства).

Отбор проб проводят специалисты после прохождения инструктажа по технике безопасности и технике выполнения отбора проб конкретных типов вод.

8.1.1 Отбор проб воды централизованного и нецентрализованного питьевого водоснабжения

Пробы воды централизованного и нецентрализованного питьевого водоснабжения отбирают в стерильные емкости объемом 10 $дм^3$ в периоды наибольшего расхода воды при соблюдении правил стерильности, после предварительной стерилизации кранов фламбированием (обжиганием пламенем горящего тампона, смоченного спиртом) и последующего спуска воды в течение 10—15 мин при полностью открытом кране.

Отбор проб водопроводной воды для проведения микробиологических и паразитологических исследований из одной точки выполняют в следующем порядке: вначале для санитарно-паразитологического исследования, затем кран дезинфицируют и осуществляют отбор для санитарно-бактериологического анализа и в конце для санитарно-вирусологического исследования.

Для отбора проб воды из централизованного водоснабжения с помощью ловушечного устройства водопроводный кран обжигают и спускают воду в течение 15 мин. После этого устанавливают необходимую скорость протекания воды — 1 $дм^3$ в течение 1,5 мин, что составляет от 40 до 45 $дм^3$/ч. Ловушечное устройство извлекают из стерильной упаковки и устанавливают его на кран в соответствии с инструкцией к используемому прибору. Объем пропускаемой воды должен составить 1000 $дм^3$, что достигается при скорости тока воды от 40 до 45 $дм^3$/ч в течение 24 ч. Спустя 24 ч ловушечное устройство снимают с крана и помещают в стерильный пакет.

8.1.2 Отбор проб воды из поверхностных и подземных водоемов и морской воды

Отбор проб поверхностных вод следует проводить с использованием различных плавучих средств, с мостов, помостов и т. п. в тех местах, где глубина водоемов не менее 0,5 м. В случае отбора проб не из рекреационных вод отбор выполняют в потоке воды, осуществлять отбор проб с берега недопустимо.

При отборе проб с движущихся плавучих средств пробы вод следует проводить с подветренного борта; при отборе проб со стоящего на якоре плавучего средства пробы вод — с носа плавучего средства.

Пробы поверхностных и подземных вод с каждой точки обследуемого объекта отбирают в объеме 10 $дм^3$ с глубины от 10 до 15 см от поверхности воды или от нижней кромки льда с последующей доставкой воды для исследования в лабораторию.

Отбор проб рекреационных вод проводят у береговой линии ручным способом в объеме 10 $дм^3$ в местах, где глубина водоема не менее 1—1,5 м.

При мониторинге водных объектов отбор проб проводят в середине водотока с использованием плавучих средств (корабля, лодки, судна и т. п.) или с моста.

Отбор проб с использованием пакетов из флизелиновой ткани с макропористым стеклом проводят следующим образом: пакет с сорбентом опускают в воду в поток воды на глубину, не превышающую 5—10 см, закрепляют с помощью лески за неподвижный предмет и оставляют на промежуток от 3 до 7 сут. По истечении времени экспозиции пакет вынимают, помещают в отдельный полиэтиленовый мешок или стерильный флакон.

8.1.3 Отбор проб воды плавательных бассейнов и воды аквапарков

При использовании стерильных емкостей отбор проб в чаше плавательного бассейна или аквапарка отбирают в объемах по 10 $дм^3$ у края бассейна на расстоянии от 0,5 до 1,0 см от зеркала воды и в любой точке на глубине от 25 до 30 см от поверхности зеркала воды, в двух точках или более, а при рециркуляционной системе водоочистки, дополнительно перед поступлением воды на фильтр и после фильтра.

8.1.4 Отбор проб хозяйственно-бытовых сточных вод

Пробы хозяйственно-бытовых сточных вод, поступающих на очистные сооружения, отбирают из коллекторов на входе, а также на выходе после этапов очистки и обеззараживания в стерильную емкость объемом 1 дм^3 с помощью батометра с глубины от 25 до 30 см. После отбора сточной воды и плотного закрытия посуды необходимо незамедлительно обработать всю ее поверхность дезинфицирующим средством с широким спектром действия.

Отбор проб с использованием пакетов из флизелиновой ткани с макропористым стеклом проводят следующим образом: пакет с сорбентом опускают в воду, в поток воды на глубину, не превышающую 5—10 см, закрепляют с помощью лески за неподвижный предмет и оставляют на 2—3 сут. По истечении времени экспозиции пакет вынимают, помещают в отдельный полиэтиленовый мешок или стерильный флакон.

8.1.5 Отбор проб очищенных сточных вод

Пробы сточных вод отбирают с помощью стерильного батометра или другими устройствами либо непосредственно в стерильную одноразовую посуду.

При отборе одним батометром или другим устройством нескольких проб их каждый раз обеззараживают фламбированием перед отбором новой пробы.

Пробы очищенной сточной воды отбирают объемом не менее 10 дм^3.

8.2 Маркировка, хранение и транспортирование проб для санитарно-вирусологического исследования

Отобранную пробу маркируют в соответствии с актом отбора пробы, с указанием места, даты, времени забора, времени экспозиции специализированной емкости с сорбентом, фамилии специалиста, отбирающего пробу, и другой информации, влияющей на последующие исследования (температура, погодные условия и т. д.).

Доставку проб воды осуществляют в сумках-холодильниках, контейнерах-холодильниках при температуре плюс (6 ± 2) °С. В холодный период года контейнеры снабжают термоизолирующими прокладками, обеспечивающими предохранение проб от промерзания и повреждения.

Время транспортирования проб до их предварительной обработки (концентрирования) и вирусологического исследования не должно превышать 6 ч. Если пробу не представляется возможным охладить при транспортировании, анализ выполняют не позднее, чем через 2 ч от момента отбора проб. В случае превышения времени доставки пробы на санитарно-вирусологический анализ не принимают. Доставленные в лабораторию пробы регистрируют в рабочем журнале.

Допускается предварительное концентрирование отобранных проб воды на месте с использованием мобильных установок. Доставку проб воды осуществляют в сумках-, контейнерах-холодильниках при температуре плюс (6 ± 2) °С в течение 1 сут, при температуре минус (20 ± 1) °С — в течение 1 нед.

В лаборатории до этапа обработки (концентрирования) отобранные пробы хранят в холодильнике при температуре плюс (6 ± 2) °С не более суток.

9 Концентрирование проб воды

В связи с низкой концентрацией вирусных агентов в воде санитарно-вирусологические исследования воды на предмет наличия возбудителей инфекций вирусной природы состоят из двух этапов:

а) концентрирование вирусов из отобранных объемов проб воды;

б) выделение и последующая идентификация вирусов из элюата после этапа концентрирования.

Все работы, связанные с концентрированием и выделением вирусов, проводят с соблюдением правил эпидемической безопасности в соответствии с действующим санитарным законодательством.

Допускается концентрирование вирусов другими способами, например картриджной фильтрацией на стекловолокне или концентрированием с использованием подкисленного 5 %-ного молока, при условии, что доказанная эффективность метода не ниже, чем у методов, указанных в настоящем стандарте.

9.1 Концентрирование вирусов с использованием ионообменных смол

Метод рекомендуется для концентрирования вирусов из питьевой воды нецентрализованного и централизованного, в том числе горячего водоснабжения, воды технического водоснабжения, упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду, воды поверхностных пресных и морских водоемов, рекреационных вод, воды подземных источников водоснабжения, природной и сточной вод, вод бассейнов и аквапарков.

9.1.1 Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды и средства измерений

Для проведения метода рекомендуются приборы, оборудование и расходные материалы, указанные в разделе 5, а также следующие:

центрифуга лабораторная, минимум 2000 об/мин;
шланги стерильные гибкие, разной длины;
ткань флизелиновая;
колонки (бюретки) диаметром от 12 до 15 мм и длиной более 200 мм для загрузки сорбента;
шланги резиновые для колонок разных диаметров;
штатив для колонок (бюреток);
зажимы винтовые для шлангов;
0,5 М фосфатный буфер с pH 8,2;
калий фосфорнокислый однозамещенный, ч.д.а.,
натрий фосфорнокислый двузамещенный, ч.д.а.,
хлорид натрия,
кислота соляная;
10 %-ный раствор гидроксида натрия;
смола анионоактивная (анионит АВ-17-8; АВ-17-8-чс; АВ-17-ИК) или аналог;
вода дистиллированная стерильная;
спирт этиловый ректификационный 96 %;
перекись водорода 33 %;
хлороформ.

9.1.2 Приготовление суспензии анионоактивной смолы

Сухую смолу (аниониты АВ-17-8, АВ-17-8-чс, АВ-17-ИК) замачивают на 2—3 сут в дистиллированной воде. При этом вода должна полностью покрывать уровень смолы, превышая его на 2 см. После экспозиции воду сливают и смолу обрабатывают смесью равных объемов свежеприготовленных растворов 2 %-ной соляной кислоты и 10 %-ного хлорида натрия из расчета 1 дм^3 смеси на 100 г смолы в течение 24 ч. Затем смолу отмывают дистиллированной водой до нейтрального значения pH 7,0. До момента использования заливают стерильной дистиллированной водой с pH 7,0 на 2 см выше уровня смолы и хранят при температуре плюс (6 ± 2) °С.

9.1.3 Приготовление 0,5 М фосфатного буфера с pH 8,2

Готовят навески солей: Na_2HPO_4 — 89,0 г (раствор А) и KH_2PO_4 — 68,0 г (раствор Б). Каждую навеску вносят в отдельную мерную колбу, добавляют дистиллированную воду до объема 1 дм^3 и растворяют соли. Для получения буфера значением pH 8,2 смешивают 96,5 см^3 раствора А и 3,5 см^3 раствора Б и одним из этих растворов доводят pH буфера до 8,2.

9.1.4 Концентрирование вирусов из проб воды с использованием анионоактивной смолы

Для осуществления концентрирования к нижнему концу стерильной бюретки (колонки) присоединяют стерильный резиновый шланг с завинчивающимся зажимом, после чего ее строго вертикально устанавливают в штативе. На дно колонки помещают небольшой слой стекловаты или флизелина для удержания смолы.

В колонку вносят суспензию смолы, удаляя через нижний резиновый шланг избыток воды. При заполнении колонки следует избегать образования пузырьков воздуха в столбике смолы. Высота столбика смолы в колонке должна быть от 10 до 12 см.

Перед концентрированием исследуемую пробу воды доводят до значений pH 5,5—6,0 путем добавления концентрированной соляной кислоты или 10 %-ного раствора гидроксида натрия.

Емкость с пробой воды располагают выше колонок, в нее опускают стерильный резиновый шланг со стеклянной трубкой на конце. Другой конец шланга должен быть оснащен резиновой пробкой подходящего для колонок размера со вставленной в нее стеклянной трубкой для прохождения воды.

Допускается применение готовых наборов, предназначенных для концентрирования вирусов с использованием ионообменных смол, с аналогичными характеристиками, разрешенных к применению для этих целей в установленном действующим законодательством порядке.

Подачу воды осуществляют побудительным откачиванием стерильной резиновой грушей из тубуса с пробкой, после чего пробку с тубусом плотно вставляют в колонку. Винтовым зажимом на нижнем шланге колонки регулируют скорость подачи воды, создавая скорость от 10 до 12 см^3/мин. Необходимо, чтобы в процессе концентрирования проба воды в колонке полностью покрывала столбик смолы.

9.1.5 Элюция сконцентрированных вирусных частиц

После полного прохождения всего объема отобранной пробы воды (примерно через 12—14 ч, при исследовании объема воды 10 дм^3) осуществляют элюцию вирусов со смолы. Для этого колонку отключают от шланга подачи воды, зажим на нижнем шланге плотно заворачивают для предотвращения вытекания элюата. В колонку со смолой вносят 10 см^3 0,5 М раствора фосфатного буфера со значением pH 8,2, плотно закупоривают резиновой пробкой, интенсивно встряхивают для равномерного распределения жидкости и оставляют в горизонтальном положении в течение 1 ч при комнатной температуре или помещают в холодильник на 12 ч при температуре плюс (6 ± 2) °С. Затем элюат переносят в стерильный флакон, доводят pH до значения 7,2 1 М раствором соляной кислоты и подвергают антибактериальной обработке.

9.1.6 Антибактериальная обработка элюатов

а) Антибактериальная обработка элюатов с помощью хлороформа

Обработку хлороформом производят путем его добавления в стеклянный флакон с элюатом из расчета 3 см^3 хлороформа на 10 см^3 элюата, интенсивно встряхивают в течение 10 мин и центрифугируют в течение 10 мин при скорости 2000 об/мин для разделения фаз. Верхнюю жидкую фракцию отбирают пипеткой в стерильный флакон и добавляют в элюат из расчета 100 МЕ/см^3 пенициллина и 10,0 мг/см^3 стрептомицина.

Запрещается использовать пластиковые флаконы и пипетки для антибактериальной обработки с помощью хлороформа.

б) Антибактериальная обработка элюатов с помощью фильтрующих насадок

Полученный элюат отбирают в стерильный трехкомпонентный шприц объемом от 5 до 20 см^3, после чего элюат продавливают сквозь стерилизующую насадку с фильтрами 0,22 или 0,45 мкм в стерильный флакон.

9.1.7 Хранение элюата

Стерильные элюаты делят на две равные порции и хранят до проведения испытания при температуре плюс (4 ± 2) °С не более 24 ч.

При температуре минус 20 °С стерильные элюаты можно хранить в течение одного года. При необходимости многократного исследования элюат дополнительно делят на несколько порций для того, чтобы избежать повторного замораживания.

9.2 Двухэтапное концентрирование вирусов (сорбция на ионообменной смоле и осаждение с помощью сульфата аммония)

Метод рекомендуется для концентрирования вирусов из питьевой воды нецентрализованного и централизованного, в том числе горячего, водоснабжения, воды технического водоснабжения, упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду, воды поверхностных пресных и морских водоемов, рекреационных вод, воды подземных источников водоснабжения, природной и сточной вод, вод бассейнов и аквапарков.

9.2.1 Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды и средства измерений

Для проведения метода рекомендуются приборы, оборудование и расходные материалы, указанные в разделе 5, а также следующие:

центрифуга лабораторная со скоростью 2000 и 6000 об/мин;

шланги стерильные гибкие;

ткань флизелиновая;

колонки (бюретки) стеклянные для титрометрии диаметром от 36 до 38 мм и длиной от 250 до 300 мм;

шланги резиновые для колонок и компрессора разных диаметров;

буфер глициновый с pH 11,5;

кислота аминоуксусная;

гидроксид натрия;

насыщенный раствор сульфата аммония;

сульфат аммония;

вода дистиллированная;

хлорид натрия;

кислота соляная;

смола ионообменная — аниониты АВ-17-8, АВ-17-8-чс, АВ-17-ИК;

хлороформ;

раствор физиологический;

спирт этиловый ректификационный 96 %;

перекись водорода 33 %.

9.2.2 Приготовление суспензии ионообменной смолы

Сухую смолу (аниониты АВ-17-8, АВ-17-8-чс, АВ-17-ИК) замачивают на 2—3 сут в дистиллированной воде. При этом вода должна полностью покрывать уровень смолы, превышая его на 2 см. После экспозиции воду сливают и смолу обрабатывают смесью равных объемов свежеприготовленных растворов 2 %-ной соляной кислоты и 10 %-ного хлорида натрия из расчета 1 $дм^3$ смеси на 100 г смолы в течение 24 ч. Затем смолу отмывают дистиллированной водой до нейтрального значения pH 7,0. До использования заливают стерильной дистиллированной водой со значением pH 7,0 на 2 см выше уровня смолы и хранят при температуре плюс (6 ± 2) °С.

9.2.3 Приготовление глицинового буфера с pH 11,5

Навеску 0,385 г аминоуксусной кислоты растворяют в дистиллированной воде объемом 100 $см^3$ и получают глицин. К глицину объемом 50 $см^3$ добавляют 0,1 N раствора гидроксида натрия объемом 50 $см^3$ и получают глициновый буфер со значением pH 11,5.

Для приготовления глицинового буфера (pH = 1,5—1,6) к глицину объемом 38 $см^3$ добавляют 0,1 N раствор соляной кислоты объемом 62 $см^3$.

9.2.4 Приготовление насыщенного раствора сульфата аммония

В 1 $дм^3$ теплой стерильной дистиллированной воды при температуре от 30 до 35 °С растворяют 800 г $(NH_4)_2SO_4$ (сульфата аммония). Полученный раствор фильтруют, доводят до значения pH 7,2 и охлаждают в холодильнике.

9.2.5 Концентрирование вирусов из проб воды

Метод осуществляется в два этапа.

Этап I. Концентрирование и элюция вирусов из проб воды при помощи сорбции на ионообменной смоле

Стеклянные бюретки (колонки) устанавливают в штативе. В бюретки (колонки) поэтапно загружают ионообменную смолу, затем гидроксид алюминия. Высота столбика смолы должна составлять не менее 30—40 мм, навеска гидроксида алюминия — от 8 до 10 г.

Исследуемую пробу воды в бутылях или канистре подкисляют с помощью соляной кислоты до значения pH 3,0—4,5, устанавливают выше колонки и через резиновую трубку с пробкой для бюретки (колонки) подают воду в бюретку (колонку), регулируя скорость прохождения с помощью винта на зажиме на резиновой трубке, присоединенной к нижнему концу бюретки (колонки). Скорость прохождения воды через бюретку (колонку) должна составлять от 10 до 15 $см^3$/мин.

После прохождения объема исследуемой воды через бюретку (колонку) нижний резиновый шланг перекрывают и осуществляют элюцию вируса с адсорбента при помощи 0,05 М глицинового буфера со значением pH 11,5, который вносят в бюретку (колонку) в объеме 100 $см^3$. Адсорбент в бюретке (колонке) и элюент тщательно перемешивают покачиванием и выдерживают в течение 10—15 мин. Затем элюат удаляют из бюретки (колонки) через нижний резиновый шланг и с помощью глицинового буфера с pH 1,5 устанавливают pH элюата на уровне 7,0—8,0.

Этап II. Вторичное концентрирование — осаждение с помощью сульфата аммония

Вторичное концентрирование (осаждение) вирусов проводят в холодильнике при температуре плюс 4 °С. Для этого к элюату дробно (в течение 20—30 мин) добавляют 0,5 объема насыщенного раствора $(NH_4)_2SO_4$ (сульфата аммония), тщательно перемешивают и оставляют на ночь.

Утром смесь центрифугируют в течение 1 ч при скорости 6000 об/мин. Верхнюю жидкую фракцию удаляют, а осадок растворяют в 1—2 $см^3$ физиологического раствора со значением pH 7,2—7,4.

При необходимости концентрат делят на две части, одну из которых исследуют на наличие вирусной ДНК или РНК методом ПЦР, другую — подвергают антибактериальной обработке и используют для заражения тканевых культур.

9.2.6 Антибактериальная обработка элюатов

а) Антибактериальная обработка элюатов с помощью хлороформа

Обработку хлороформом производят путем его добавления в стеклянный флакон с элюатом из расчета 3 $см^3$ хлороформа на 10 $см^3$ элюата, интенсивно встряхивают в течение 10 мин и центрифугируют в течение 10 мин при скорости 2000 об/мин для разделения фаз. Верхнюю жидкую фракцию отбирают пипеткой в стерильный флакон и добавляют в элюат из расчета 100 МЕ/$см^3$ пенициллина и 10,0 мг/$см^3$ стрептомицина.

Запрещается использовать пластиковые флаконы и пипетки для антибактериальной обработки с помощью хлороформа.

б) Антибактериальная обработка элюатов с помощью фильтрующих насадок

Полученный элюат отбирают в стерильный трехкомпонентный шприц объемом от 5 до 20 $см^3$, после чего элюат продавливают сквозь стерилизующую насадку с фильтрами 0,22 или 0,45 мкм в стерильный флакон.

9.2.7 Хранение элюата

Стерильные элюаты делят на две равные порции и хранят до испытания при температуре плюс (4 ± 2) °С не более 24 ч.

При температуре минус 20 °С стерильные элюаты можно хранить в течение одного года. При необходимости многократного исследования элюат дополнительно делят на несколько порций для того, чтобы избежать повторного замораживания.

9.3 Концентрирование вирусов на проточном мембранном фильтрующем модуле с тангенциально-радиальным движением жидкости, с использованием позитивно заряженных микрофильтрационных полиамидных мембран в режиме микрофильтрации

Метод рекомендуется для концентрирования вирусов из питьевой воды нецентрализованного и централизованного, в том числе горячего, водоснабжения, воды технического водоснабжения, упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду, воды поверхностных пресных и морских водоемов, рекреационных вод, воды подземных источников водоснабжения, вод бассейнов и аквапарков.

9.3.1 Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды и средства измерений

Для проведения метода рекомендуются приборы, оборудование и расходные материалы, указанные в разделе 5, а также следующие:

центрифуга лабораторная со скоростью минимум 2000 об/мин;

центрифуга лабораторная рефрижераторная минимум с 6000 *g* и 10000 *g* и температурой плюс 4 °С;

модуль проточный, мембранный, фильтрующий (фильтродержатель), с тангенциально-радиальным движением жидкости МФМ-0142 или аналог;

шланги стерильные гибкие, разной длины, с переходниками;

насос, обеспечивающий давление не выше 3 бар;

емкость для фильтрования объемом 10 $дм^3$;

насадки шприцевые (штуцеры) для фильтрующего модуля;

мембрана позитивно заряженная микропористая капроновая с диаметром пор 0,2 мкм;

шланги резиновые для компрессора с металлической оплеткой разных диаметров;

пинцет анатомический;

насадка шприцевая с ультрафильтрационной мембраной;

раствор 3 %-ный бифэкстракта на трисбуфере с pH 9,1—9,5;

трис (гидроксиметил) аминометан;

экстракт мясной (бифэкстракт);

гидроксид натрия;

вода дистиллированная;

спирт этиловый ректификационный 96 %;

магний хлористый кристаллический, ч.д.а.;

хлороформ;

перекись водорода 33 %;

кислота соляная;

натрий хлористый;

ПЭГ 6000.

9.3.2 Приготовление 3 %-ного раствора бифэкстракта на трисбуфере с pH 9,1—9,5

Раствор готовят на дистиллированной воде. 30,3 г трис (гидроксиметил) аминометана растворяют в 300 $см^3$ воды, доводят значение pH до 9,1 концентрированной соляной кислотой и оставляют на 1 сут. Затем проверяют pH и при необходимости доводят значение pH повторно до 9,1. Конечный объем раствора получают добавлением дистиллированной воды до объема 500 $см^3$.

Рабочее разведение трисбуфера получают добавлением девяти частей стерильной дистиллированной воды к одной части концентрированного раствора.

К 100 см^3 рабочего 10-кратного раствора трисбуфера добавляют 3 г мясного экстракта (бифэкстракт) и доводят значение pH до 9,1—9,5 добавлением 1 N раствора гидроксида натрия.

9.3.3 Подготовка мембранных фильтров

Фильтрующие мембраны должны быть подготовлены к анализу в соответствии с указаниями организации-изготовителя (листовка-аннотация, сопровождающая фильтры).

9.3.4 Подготовка фильтровального аппарата

Для фильтрования исследуемой воды используют фильтрующую установку с тангенциально-радиальным движением жидкости, например типа МФМ-0142, или аналоги, которые состоят из фильтродержателя, перистальтического насоса и емкости объемом 10 л и более для исследуемой воды.

Перед фильтрацией фильтродержатель протирают ватным тампоном, смоченным спиртом, ректификованным 70 %, и обжигают. После охлаждения в ложу нижней тарелки фильтродержателя помещают стерильным пинцетом подготовленный мембранный фильтр и смачивают стерильной дистиллированной водой. При этом необходимо не допускать образования воздушных пузырей под мембраной. Затем фильтр прижимают обручем и верхней тарелкой фильтродержателя и закрепляют зажимами, равномерно завинчивая со всех сторон. К фильтровальной установке присоединяют шланги с помощью штуцеров: входящий, подающий исследуемую воду, и отводящий.

9.3.5 Концентрирование вирусов из проб воды

Перед концентрированием исследуемую пробу воды доводят до значения pH 5,5—6,0 путем добавления концентрированной соляной кислоты или 10 %-ным раствором гидроксида натрия.

Исследуемый объем воды со значением pH от 5,5 до 6,0 наливают в емкость фильтрующей установки, крышку емкости тщательно закрепляют зажимами и включают насос, в результате чего исследуемую воду подают на мембранный модуль давлением на уровне от 2 до 3 бар, которая проходит сквозь фильтр. Скорость прохождения воды через мембрану должна составлять 20 см^3/мин.

После окончания фильтрации насос отключают, сбрасывают давление из фильтровальной емкости, а входящий и отходящий шланги отсоединяют от фильтродержателя.

9.3.6 Элюция сконцентрированных вирусных частиц

Элюцию вирусов осуществляют закрытым способом, не вынимая мембранного фильтра из модуля. Для этого осуществляют смыв вирусов с фильтра путем продавливания через него 60 см^3 элюента (3 %-ного бифэкстракта на трисбуфере со значением pH 9,1—9,5) в три приема по 20 см^3 двумя одноразовыми трехкомпонентными шприцами объемом 20 см^3.

Шприц, содержащий 20 см^3 элюента, с помощью стыковочных штуцеров присоединяют к быстроразъемному соединению модуля в точке прикрепления шланга входящей воды, а пустой шприц прикрепляют к модулю в точке прикрепления шланга выходящей воды. Элюент многократно продавливают через фильтр из верхнего шприца в нижний и наоборот. Процедуру повторяют шесть — восемь раз. Каждую порцию получаемого элюата переносят в стерильный флакон и pH полученного элюата доводят до 7,0—7,5 1 N раствором соляной кислоты. Собранный элюат подвергают вторичному концентрированию при помощи ПЭГ 6000 или ультрафильтрации.

9.3.7 Вторичное концентрирование элюата

а) С использованием ПЭГ 6000

Полученный элюат переносят в центрифужный стакан и добавляют в него ПЭГ 6000 и хлористый натрий до конечных концентраций 10 % и 0,6М соответственно. Смесь тщательно перемешивают до растворения ПЭГ и хлористого натрия и выдерживают в течение 10—12 ч при температуре 4 °С. Полученную суспензию центрифугируют при 10000 *g* в течение 1 ч или при 6000 *g* в течение 2 ч. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок растворяют в 6 см^3 стерильной дистиллированной воды и подвергают антибактериальной обработке.

б) С использованием метода ультрафильтрации

Ультрафильтрацию первичного элюата проводят с использованием стерильных шприцевых насадок, в которые помещают УМ. Насадку с УМ крепят на шприц, заполняют первичным элюатом. После прохождения всего объема первичного элюата для снятия вируса с мембраны в шприц вносят от 6 до 10 см^3 элюента (3 %-ный раствор бифэкстракта на трисбуфере со значением pH 9,1—9,5), который продавливают через мембрану с адсорбированным вирусом в стерильный флакон, после чего полученный элюат доводят до нейтральных значений pH (7,0) 1 М раствором соляной кислоты и подвергают антибактериальной обработке.

9.3.8 Антибактериальная обработка элюатов

а) Антибактериальная обработка элюатов с помощью хлороформа

Обработку хлороформом проводят путем его добавления в стеклянный флакон с элюатом из расчета 3 $см^3$ хлороформа на 10 $см^3$ элюата, интенсивно встряхивают в течение 10 мин и центрифугируют в течение 10 мин при 2000 об/мин для разделения фаз. Верхнюю жидкую фракцию отбирают пипеткой в стерильный флакон и добавляют в элюат из расчета 100 МЕ/$см^3$ пенициллина и 10,0 мг/$см^3$ стрептомицина.

Запрещается использовать пластиковые флаконы и пипетки для антибактериальной обработки с помощью хлороформа.

б) Антибактериальная обработка элюатов с помощью фильтрующих насадок

Полученный элюат отбирают в стерильный трехкомпонентный шприц объемом от 5 до 20 $см^3$, после чего элюат продавливают сквозь стерилизующую насадку с фильтрами 0,22 или 0,45 мкм в стерильный флакон.

9.3.9 Хранение элюата

Стерильные элюаты делят на две равные порции и хранят до проведения испытания при температуре плюс (4 ± 2) °С не более 24 ч.

При температуре минус 20 °С стерильные элюаты можно хранить в течение одного года. При необходимости многократного исследования элюат дополнительно делят на несколько порций для того, чтобы избежать повторного замораживания.

9.3.10 Обеззараживание и контроль стерильности фильтровального модуля

После проведенного концентрирования проводят обеззараживание установки и контроль стерильности фильтровального модуля. Для этого через шланги и установку предварительно со скоростью 20 $см^3$/мин пропускают 100 $см^3$ РНК-содержащего фага MS2 в концентрации 10^2 БОЕ/мл в качестве непатогенного биологического трейсера для оценки эффективности обеззараживания шлангов и фильтродержателя. После чего проводят непосредственно обеззараживание.

Для этого в емкости объемом 1 $дм^3$ готовят 6 %-ный раствор перекиси водорода и через подающий шланг установки со скоростью 20 $см^3$/мин пропускают дезинфицирующий раствор через фильтрующий модуль, останавливая обработку на 15 мин контакта в середине процесса. После обеззараживания проводят промывку установки от дезинфицирующего раствора водопроводной водой объемом 1 $дм^3$, а затем стерильной дистиллированной водой объемом 500 $см^3$.

Для оценки стерильности фильтровальной установки и ее готовности для концентрирования каждой новой пробы воды проводят посев 10 мл полученного смыва дистиллированной водой шлангов и фильтродержателя в трех повторностях на предмет наличия фага MS2. В случае обнаружения фагов MS2 в смыве результат концентрирования вирусов из последующей пробы воды считают недействительным.

9.4 Концентрирование вирусов с использованием двухфазного разделения

Метод концентрирования двухфазным разделением используют для индикации вирусов из очищенных и неочищенных хозяйственно-бытовых сточных вод объемом 1 $дм^3$. Метод рекомендован Всемирной организацией здравоохранения [4].

9.4.1 Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды и средства измерений

Для проведения метода рекомендуются приборы, оборудование и расходные материалы, указанные в разделе 5, а также следующие:

центрифуга лабораторная с ускорением минимум 1000 *g* и ротором под объем минимум 0,5 $дм^3$;
шланги стерильные гибкие, разной длины, с переходниками для закрепления к водопроводам;
колба Эрленмейера;
чашки Петри диаметром 142 мм;
шланги резиновые для колонок и компрессора разных диаметров;
декстран Т-40;
гидроксид натрия;
ПЭГ 6000;
вода дистиллированная;
хлорид натрия;
хлороформ;
пенициллин G или аналог;

стрептомицин;

спирт этиловый ректификационный 96 %.

9.4.2 Приготовление 22 %-ного декстрана (по весу)

К 40 г декстрана Т 40 добавляют 142 $см^3$ стерильной дистиллированной воды. Для растворения используют магнитную мешалку. Готовый раствор можно хранить 2 нед при температуре плюс 4 °С.

9.4.3 Приготовление 29 %-ного ПЭГ 6000 (по весу)

К 363 г ПЭГ 6000 добавляют 888 $см^3$ стерильной дистиллированной воды. Для растворения используют магнитную мешалку. Готовый раствор можно хранить 2 нед при температуре плюс 4 °С. Раствор можно автоклавировать 15 мин при температуре 45 °С.

9.4.4 Концентрирование вирусов из проб воды

Пробу в объемах 0,5 $дм^3$ центрифугируют в течение 10 мин при 1000 *g*. Надосадочную жидкость переносят из пробирок в колбу Эрленмейера емкостью 1 л, осадок хранят при температуре плюс 4 °С.

Доводят pH надосадочной жидкости до нейтрального уровня (7,0—7,5) 1 N раствором NaOH и измеряют конечный объем надосадочной жидкости.

К 500 $см^3$ надосадочной жидкости добавляют 39,5 $см^3$ 22 %-ного раствора декстрана, 287 $см^3$ 29 %-ного раствора ПЭГ 6000 и 35 $см^3$ 5N раствора NaCl. Тщательно перемешивают и выдерживают 1 ч при температуре плюс 4 °С при непрерывном встряхивании или перемешивании, используя прибор горизонтального встряхивания или магнитную мешалку.

Для каждой пробы подготавливают стерильную коническую делительную воронку и закрепляют ее в штативе. Смазывают скользящие поверхности кранов, но так, чтобы не закрыть в них отверстие. Проверяют плотность кранов небольшим количеством воды.

Смесь надосадочной жидкости, декстрана, ПЭГ 6000 и NaCl переливают в воронку и оставляют на 12—18 ч при температуре плюс 4 °С.

Через 12—18 ч осторожно открывают кран воронки, медленно выпускают жидкость и собирают ее нижний слой и промежуточную фазу в стерильную пробирку (обычно 5—10 $см^3$ от каждой пробы объемом 0,5 $дм^3$).

В полученную жидкость вносят осадок после первичного центрифугирования, добавляют хлороформ (20 % от объема образовавшейся взвеси) и встряхивают в течение 1 мин. Центрифугируют, отбирают верхнюю жидкую фракцию, переносят ее в стерильную пробирку и добавляют антибиотики (пенициллин G или аналог и стрептомицин до конечной концентрации 100 МЕ/$см^3$ и 100 мг/$см^3$ соответственно).

9.4.5 Хранение элюата

Стерильные элюаты делят на две равные порции и хранят до проведения испытания при температуре плюс (4 ± 2) °С не более 24 ч.

При температуре минус 20 °С стерильные элюаты можно хранить в течение одного года. При необходимости многократного исследования элюат дополнительно делят на несколько порций для того, чтобы избежать повторного замораживания.

9.5 Концентрирование вирусов с использованием набора для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды с помощью ловушечного устройства

Метод рекомендуется для концентрирования вирусов из питьевой воды централизованного, в том числе горячего, водоснабжения и из воды технического водоснабжения.

9.5.1 Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды и средства измерений

Для проведения метода рекомендуются приборы, оборудование и расходные материалы, указанные в разделе 5, а также следующие:

центрифуга лабораторная со скоростью минимум 2000 об/мин;

центрифуга лабораторная рефрижераторная при ускорении минимум 6000 *g* и 10000 *g* и с температурой плюс 4 °С;

ультрацентрифуга со скоростью минимум 50000 об/мин;

набор для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды в системе централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения с помощью ловушечного устройства;

чашки Петри диаметром 142 мм;

пинцет анатомический;

ножницы;

вода дистиллированная;

перекись водорода 33 %;

раствор сахарозы от 10 % до 20 %;

буфер фосфатно-солевой твинсодержащий (pH 7,2);
ПЭГ 6000;
хлороформ;
спирт этиловый ректификационный 96 %.

9.5.2 Подготовка ловушечного устройства к отбору проб

Перед использованием в ловушечное устройство вставляют ловушку, после чего его заворачивают в бумагу для стерилизации и стерилизуют сухим жаром при температуре 80 °С в течение 45 мин.

9.5.3 Элюция сконцентрированных вирусных частиц

Отбор проб проводят в соответствии с 8.1.1.

Ловушку с адсорбентом в стерильных условиях извлекают из ловушечного устройства и помещают в чашку Петри. Ловушку вскрывают ножницами, содержащийся внутри адсорбент вымывают в чашку Петри стерильной дистиллированной водой в объеме от 5 до 10 $см^3$.

Полученную водную взвесь адсорбента переносят в стеклянную колонку, нижний конец которой предварительно перекрывают зажимным винтом на коротком шланге. Элюцию вирусов осуществляют с помощью специального элюента, содержащегося в наборе. Для получения рабочего раствора концентрат разводят стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:10 (объем элюента/объем воды). Вирус элюируют путем пропускания 3 $см^3$ полученного элюента через колонку с адсорбентом. Элюат собирают в стерильный пенициллиновый флакон.

Использованный адсорбент заливают 3 %-ным раствором перекиси водорода для обеззараживания на 12 ч.

С целью увеличения эффективности обнаружения вирусов в элюатах проб воды при исследовании методом ПЦР проводят дополнительное вторичное концентрирование элюатов с помощью ультрацентрифугирования либо обрабатывают элюаты ПЭГ 6000.

9.5.4 Вторичное концентрирование элюата

а) Ультрацентрифугирование элюата

Ультрацентрифугирование проводят со скоростью 50000 об/мин в течение 2 ч с использованием угловых или бакет-роторов. В стерильную центрифужную пробирку наливают вируссодержащий элюат, а затем с помощью шприца на дно пробирки наслаивают 10—20 %-ный раствор сахарозы так, чтобы она занимала от 5 % до 10 % от объема пробирки. После центрифугирования супернатант удаляют. Осадок ресуспендируют в стерильной дистиллированной воде (объем 0,5 $см^3$) для проведения ПЦР-исследований.

б) Обработка элюата ПЭГ 6000

В элюат добавляют ПЭГ 6000 и хлористый натрий, находящийся непосредственно в пробирках для центрифугирования, до конечных концентраций 10 % и 0,5 М соответственно. Смесь тщательно перемешивают до растворения ПЭГ и затем выдерживают в течение 10—12 ч при температуре плюс 4 °С. Образовавшуюся суспензию центрифугируют при ускорении 10000 *g* в течение 1 ч или при ускорении 6000 *g* в течение 2 ч. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в стерильной дистиллированной воде объемом 0,5 $см^3$ для проведения ПЦР-исследований.

9.5.5 Антибактериальная обработка элюатов

а) Антибактериальная обработка элюатов с помощью хлороформа

Обработку хлороформом проводят путем его добавления в стеклянный флакон с элюатом из расчета 3 $см^3$ хлороформа на 10 $см^3$ элюата, интенсивно встряхивают в течение 10 мин и центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 2000 об/мин для разделения фаз. Верхнюю жидкую фракцию отбирают пипеткой в стерильный флакон и добавляют в элюат из расчета 100 МЕ/$см^3$ пенициллина и 10,0 мг/$см^3$ стрептомицина.

Запрещается использовать пластиковые флаконы и пипетки для антибактериальной обработки с помощью хлороформа.

б) Антибактериальная обработка элюатов с помощью фильтрующих насадок

Полученный элюат отбирают в стерильный трехкомпонентный шприц объемом от 5 до 20 $см^3$, после чего элюат продавливают сквозь стерилизующую насадку с фильтрами 0,22 или 0,45 мкм в стерильный флакон.

9.5.6 Хранение элюата

Стерильные элюаты делят на две равные порции и хранят до проведения испытания при температуре плюс (4 ± 2) °С не более 24 ч.

При температуре минус 20 °С стерильные элюаты можно хранить в течение одного года. При необходимости многократного исследования элюат дополнительно делят на несколько порций для того, чтобы избежать повторного замораживания.

9.6 Концентрирование вирусов с использованием сернокислого алюминия

Метод рекомендуется для концентрирования вирусов из питьевой воды нецентрализованного и централизованного, в том числе горячего, водоснабжения, из воды технического водоснабжения, упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду, из воды поверхностных пресных и морских водоемов, рекреационных вод, воды подземных источников водоснабжения, из природной и сточной воды, вод бассейнов и аквапарков.

9.6.1 Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды и средства измерений

Для проведения метода рекомендуются приборы, оборудование и расходные материалы, указанные в разделе 5, а также следующие:

центрифуга лабораторная со скоростью 2000 об/мин;

устройство для перемешивания воды (шейкер орбитальный, блендер, миксер);

денситометр или стандарт мутности оптический на 10 ед.;

баня водяная;

алюминий сернокислый;

гидроокись натрия;

кислота соляная;

калий фосфорнокислый однозамещенный, ч.д.а.;

натрий фосфорнокислый двузамещенный, ч.д.а.;

хлороформ;

раствор Хенкса;

спирт этиловый ректификационный 96 %.

9.6.2 Концентрирование вирусов из проб воды

Пробу воды объемом 10 дм^3 осторожно нагревают на водяной бане до температуры от 18 °С до 20 °С. Затем добавляют в нее 20 см^3 10 %-ного раствора $Al_2(SO_4)_3$, который при помощи устройства для перемешивания воды в течение 20 мин равномерно распределяют по всей пробе. После этого значение pH пробы доводят до 5,4—5,8 с помощью 0,1 N раствором NaOH или 0,1 N раствором HCl.

Воду оставляют при комнатной температуре на 4 ч или в холодильнике при температуре плюс 4 °С на 18 ч для осаждения образовавшихся хлопьев. Затем надосадочную жидкость осторожно сливают через край или при помощи водоструйного насоса. Оставшийся рыхлый осадок переносят в центрифужный стакан и центрифугируют со скоростью 2000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость удаляют, осадок ресуспендируют в растворе Хенкса со значением pH 7,4 объемом 3—5 см^3.

В качестве элюентов кроме раствора Хенкса может быть использован 0,5 М раствор фосфатного буфера со значением pH 8,2.

Перед проведением исследований на клеточных культурах или в ПЦР суспензию снова центрифугируют со скоростью 2000 об/мин в течение 30 мин, надосадочную жидкость сбрасывают и осадок ресуспендируют в растворе Хенкса (pH 7,4) объемом 4 см^3.

9.6.3 Антибактериальная обработка элюатов

а) Антибактериальная обработка элюатов с помощью хлороформа

Обработку хлороформом проводят путем его добавления в стеклянный флакон с элюатом из расчета 3 см^3 хлороформа на 10 см^3 элюата, интенсивно встряхивают в течение 10 мин и центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 2000 об/мин для разделения фаз. Верхнюю жидкую фракцию отбирают пипеткой в стерильный флакон и добавляют в элюат из расчета 100 МЕ/см^3 пенициллина и 10,0 мг/см^3 стрептомицина.

Запрещается использовать пластиковые флаконы и пипетки для антибактериальной обработки с помощью хлороформа.

б) Антибактериальная обработка элюатов с помощью фильтрующих насадок

Полученный элюат отбирают в стерильный трехкомпонентный шприц объемом от 5 до 20 см^3, после чего элюат продавливают сквозь стерилизующую насадку с фильтрами 0,22 или 0,45 мкм в стерильный флакон.

9.6.4 Хранение элюата

Стерильные элюаты делят на две равные порции и хранят до проведения испытания при температуре плюс (4 ± 2) °С не более 24 ч.

При температуре минус 20 °С стерильные элюаты можно хранить в течение одного года. При необходимости многократного исследования элюат дополнительно делят на несколько порций для того, чтобы избежать повторного замораживания.

9.7 Концентрирование вирусов с использованием макропористого стекла

Метод рекомендуется для концентрирования вирусов из хозяйственно-бытовых сточных вод, а также из поверхностных пресных и морских водоемов в местах выпуска хозяйственно-бытовых сточных вод.

9.7.1 Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды и средства измерений

Для проведения метода рекомендуются приборы, оборудование и расходные материалы, указанные в разделе 5, а также следующие:

центрифуга лабораторная со скоростью 2000 об/мин;
ткань флизелиновая;
колонки (бюретки) для загрузки сорбента;
экстракт мясной (бифэкстракт);
жидкость силиконовая;
вода дистиллированная;
натрий хлористый;
кислота соляная;
перекись водорода 33 %;
спирт этиловый ректификационный 96 %;
хлороформ.

9.7.2 Приготовление раствора 0,05 М трис-HCL со значением pH 9,1

Раствор готовят на дистиллированной воде. 30,3 г трис (гидроксиметил) аминометан растворяют в 300 $см^3$ воды, доводят значение pH до 9,1 концентрированной соляной кислотой и оставляют на 1 сут. Затем проверяют значение pH и, при необходимости, доводят значение pH повторно до 9,1. Конечный объем раствора получают добавлением дистиллированной воды до объема 500 $см^3$.

Раствор автоклавируют 15 мин при давлении 1 бар.

Рабочие разведения получают добавлением девяти частей стерильной дистиллированной воды к одной части концентрированного раствора.

9.7.3 Приготовление раствора 0,05 М трис-HCL со значением pH 9,1 с добавлением 0,5 М NaCl

Раствор готовят на дистиллированной воде. 30,3 г трис (гидроксиметил) аминометан и 145 г NaCl растворяют в 500 $см^3$ воды, доводят значение pH до 9,1 концентрированной соляной кислотой и оставляют на 1 сут. Затем проверяют значение pH и, при необходимости, доводят значение pH повторно до 9,1.

Растворы автоклавируют 15 мин при давлении 1 бар.

Рабочие разведения получают добавлением девяти частей стерильной дистиллированной воды к одной части концентрированного раствора.

9.7.4 Приготовление раствора 3 %-ного мясного экстракта (бифэкстракта) на 0,05 М трис-HCL со значением pH 9,1

150 г мясного экстракта (бифэкстракта) добавляют в 350 $см^3$ трис-HCL с pH 9,1 и тщательно размешивают.

Раствор автоклавируют 15 мин при давлении 1 бар.

Рабочие разведения получают добавлением девяти частей стерильной дистиллированной воды к одной части концентрированного раствора.

9.7.5 Подготовка макропористого стекла

Один объем макропористого стекла заливают в колбе одним объемом смеси (в соотношении 1:1) 3 %-ного раствора перекиси водорода и 6 М раствора HCL и кипятят в вытяжном шкафу в течение 1 ч (без пробки), соблюдая меры безопасности. Отмывают большим количеством дистиллированной воды до нейтрального значения pH. Высушивают при температуре плюс 100 °С.

В пакет из флизелиновой ткани размером 5 × 7 см помещают 3,0 см подготовленного сорбента.

9.7.6 Подготовка колонок с целью предотвращения адсорбции вирусов

Силиконовую жидкость используют для предварительной обработки колонок с целью предотвращения адсорбции вирусов. Для этого смачивают внутреннюю поверхность колонок жидкостью, сливают ее и выдерживают колонки 1 ч при температуре плюс 100 °С.

Силиконовую жидкость используют многократно.

На дно колонки помещают небольшой слой стекловаты или флизелиновой ткани для удержания сорбента.

9.7.7 Обработка проб

Отбор проб с использованием пакетов из флизелиновой ткани с макропористым стеклом для поверхностных источников проводят в соответствии с 8.1.2 и 8.1.4.

Пакет с сорбентом извлекают из транспортировочной емкости и помещают в стерильную чашку Петри. Обрезают край пакета, вымывают макропористое стекло 5 мл дистиллированной воды в ту же чашку Петри. Затем той же пипеткой переносят данную взвесь макропористого стекла из чашки Петри в стеклянную колонку объемом от 5 до 10 $см^3$. Вирусы элюируют ступенчато тремя растворами объемом по 3 $см^3$, собирая фракции в отдельные стерильные флаконы с последующим вирусологическим исследованием каждой фракции по отдельности.

В качестве элюирующих растворов используют:

а) 0,05 М трис-HCL pH 9,1;

б) 0,05 М трис-HCL с pH 9,1 с добавлением 0,5 М NaCl;

в) 3 %-ный раствор мясного экстракта (бифэкстракта) на 0,05 М трис-HCL со значением pH 9,1.

9.7.8 Антибактериальная обработка элюатов

а) Антибактериальная обработка элюатов с помощью хлороформа

Обработку хлороформом проводят путем его добавления в стеклянный флакон с элюатом из расчета 3 $см^3$ хлороформа на 10 $см^3$ элюата, интенсивно встряхивают в течение 10 мин и центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 2000 об/мин для разделения фаз. Верхнюю жидкую фракцию отбирают пипеткой в стерильный флакон и добавляют в элюат из расчета 100 МЕ/$см^3$ пенициллина и 10,0 мг/$см^3$ стрептомицина.

Запрещается использовать пластиковые флаконы и пипетки для антибактериальной обработки с помощью хлороформа.

б) Антибактериальная обработка элюатов с помощью фильтрующих насадок

Полученный элюат отбирают в стерильный трехкомпонентный шприц объемом от 5 до 20 $см^3$, после чего элюат продавливают сквозь стерилизующую насадку с фильтрами 0,22 или 0,45 мкм в стерильный флакон.

9.7.9 Хранение элюата

Стерильные элюаты делят на две равные порции и хранят до проведения испытания при температуре плюс (4 ± 2) °С не более 24 ч.

При температуре минус 20 °С стерильные элюаты можно хранить в течение одного года. При необходимости многократного исследования элюат дополнительно делят на несколько порций для того, чтобы избежать повторного замораживания.

10 Идентификация вирусов в воде

10.1 Общие сведения об идентификации энтеровирусов в культурах клеток

Для проведения исследований полученных элюатов на наличие энтеровирусов используют различные культуры клеток, первично-трипсинизированные, диплоидные или перевиваемые, обладающие восприимчивостью ко всем или к большинству из известных цитопатогенных энтеровирусов. Перевиваемые культуры клеток RD, Hep-2 (Cincinnatti), BGM, Vero, Hela, BS-C-1, L20B наиболее пригодны для проведения лабораторных исследований и позволяют выделять достаточно широкий спектр энтеровирусов, которые могут присутствовать в водных объектах окружающей среды.

Культуры перевиваемых клеточных штаммов обладают различной чувствительностью к отдельным энтеровирусам и имеют более узкий спектр восприимчивости, чем первичные или диплоидные культуры. Поэтому при выделении энтеровирусов наибольший эффект достигается при использовании нескольких перевиваемых линий. Чувствительность культур клеток к различным энтеровирусам представлена в таблице 1.

10.1.1 Культуры клеток для проведения лабораторного исследования следует получать из аттестованного источника, например из лаборатории, обладающей банком клеток. Культура клеток должна сопровождаться паспортом, в котором должны быть представлены следующие сведения:

а) наименование клеточной культуры, коллекционный шифр;

б) происхождение клеточной культуры;

в) количество клеток в емкости;

г) номер пассажа и дата закладки клеток на хранение;

д) условия, режим хранения и жизнеспособность клеток после размораживания;

е) ростовые свойства (способ культивирования, питательная среда, посевная концентрация, метод снятия клеток, кратность рассева, температура культивирования, частота пассирования);

ж) подлинность (морфология, кариологическая характеристика, молекулярно-генетические методы исследования);

и) стерильность;

к) присутствие посторонних вирусов, в том числе эндогенных;

л) туморогенность;

м) онкогенность;

н) количество рекомендованных пассажей;

п) чувствительность к штаммам вируса.

Таблица 1 — Чувствительность культур клеток к различным энтеровирусам

Вирусы	Проявления ЦПЭ на культуре клеток			
	RD	Hep-2	BGM	L20B
Вирусы полиомиелита 1—3 типа	+	+	+	+
Вирус ECHO	+	±	±	–
Вирус Коксаки А	±, за исключением А1, А19, А22	–	–	± (Коксаки А 2–6, 8, 10, 14)
Вирус Коксаки В	±	+	+	–
Энтеровирусы 68–71 типа	±	–	–	–
Примечание — «+» — наличие ЦПЭ; «–» — отсутствие ЦПЭ; «±» — невозможно дать однозначный ответ.				

10.1.2 Культуры клеток для проведения лабораторного исследования следует получать из аттестованного источника, например из лаборатории, обладающей банком клеток. Культура клеток должна сопровождаться паспортом, в котором должны быть представлены следующие сведения:

а) наименование клеточной культуры, коллекционный шифр;

б) происхождение клеточной культуры;

в) количество клеток в емкости;

г) номер пассажа и дата закладки клеток на хранение;

д) условия, режим хранения и жизнеспособность клеток после размораживания;

е) ростовые свойства (способ культивирования, питательная среда, посевная концентрация, метод снятия клеток, кратность рассева, температура культивирования, частота пассирования);

ж) подлинность (морфология, кариологическая характеристика, молекулярно-генетические методы исследования);

и) стерильность;

к) присутствие посторонних вирусов, в том числе эндогенных;

л) туморогенность;

м) онкогенность;

н) количество рекомендованных пассажей;

п) чувствительность к штаммам вируса.

10.1.3 В качестве контрольных (эталонных) референс-штаммов используют тест-штаммы из официально признанных коллекций микроорганизмов, имеющих паспорт и хранящихся в соответствии с действующими санитарными правилами таким образом, чтобы возможность мутаций и контаминации культур была минимальной. В паспорте референс-штамма вируса должны содержаться следующие сведения:

а) наименование ведомства, учреждения, подразделения (отдела, отделения, лаборатории), откуда получен референс-штамм;

б) инвентарный номер штамма в коллекции организации;

в) наименование штамма в латинской транскрипции;

г) особое обозначение штамма, присвоенное коллекцией;

д) концентрация штамма;
е) дата выделения (год, месяц, число);
ж) объект выделения;
и) место выделения;
к) кем выделен;
л) кем подтвержден;
м) характеристика штамма [в т. ч. патогенность, данные о первичной структуре генома и (или) отдельных генов (ссылки на базы данных или другие источники, где хранится информация о последовательностях];
н) перечень клеточных культур, чувствительных к данному штамму.

Перевиваемые линии клеток, как нормальные, так и опухолеродные, поддерживают путем последовательных пассажей.

Все этапы работы с культурой клеток требуют соблюдения стерильных условий: выполнения всех процедур в ламинарном шкафу в пламени горелки, использования стерильных инструментов, посуды, питательных сред и т. д.

10.2 Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды и средства измерений

Для проведения идентификации рекомендуются приборы, оборудование и расходные материалы, указанные в разделе 5, а также следующие:

микроскоп инвертированный с увеличением $10^{\times}$; $40^{\times}$; $60^{\times}$; $100^{\times}$;
центрифуга лабораторная со скоростью минимум 1000 об/мин;
анализатор иммуноферментный;
CO_2 инкубатор, обеспечивающий температуру до плюс 50 °С;
лупа;
оборудование для подсчета культуральных клеток;
посуда для культур клеток — стерильные культуральные флаконы с площадью поверхности роста 25; 75 $см^2$; планшеты культуральные, пробирки культуральные;
пинцет анатомический;
вода дистиллированная стерильная;
спирт этиловый ректификационный 96 %;
перекись водорода 33 %;
раствор Версена;
раствор Хенкса;
раствор трипсина 0,25 %;
среда 199 на растворе Хенкса;
среда «Игла МЕМ», значение pH 7,2 с двойным набором аминокислот;
L-глютамин;
сыворотка КРС;
сыворотка стерильная эмбриональная КРС;
соль бензилпенициллина натриевая;
стрептомицина сульфат;
линии клеток перевиваемые;
раствор Эрла 10-кратный;
нейтральный красный в соотношении 1:1000;
сода одноосновная 7,5 % ($NaHCO_3$);
агар «Дифко» бактериологический 1,5 %.

10.3 Приготовление агарового покрытия для культуры клеток (по Уоллис и Мелник)

Смешивают в одном объеме следующие ингредиенты: 18,0 $см^3$ 10-кратного раствора Эрла; 59,4 $см^3$ дистиллированной воды; 4,0 $см^3$ сыворотки КРС, 3,0 $см^3$ нейтрального красного в соотношении 1:1000; 10,8 $см^3$ соды одноосновной 7,5 % ($NaHCO_3$); 90,0 $см^3$ агара «Дифко» 1,5 %.

10.4 Подготовка клеточных линий

10.4.1 Классическая процедура перевивания клеточной линии

Клетки однослойной культуры диспергируют раствором Версена. Для этого удаляют из флакона ростовую среду, на которой клетки выращены, промывают клеточный слой раствором Версена два

раза. Версен добавляют так, чтобы все участки клеточного слоя были покрыты жидкостью. Культуру инкубируют при температуре плюс (36 ± 1) °С в течение 15—20 мин.

Встряхивают флакон, тем самым снимают клетки со стекла, пипетируют клеточную взвесь, добиваясь получения однородной суспензии.

Суспензию клеток центрифугируют со скоростью 1000 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость удаляют, осадок ресуспендируют в среде для выращивания клеток до концентрации 200 тыс. клеток в объеме 1,0 $см^3$.

В качестве среды для выращивания клеток используют среду «Игла МЕМ» для культуры клеток (pH 7,2), среду с 0,5 % гидролизата лактальбумина на растворе Хенкса (pH 7,0) и на растворе Эрла (pH 7,15), в каждую из которых добавляют стерильную эмбриональную сыворотку КРС в объеме из расчета 10 % от конечного объема смеси жидкой среды и антибиотики из расчета по 25 тыс. ед. пенициллина и 25 мг стрептомицина на 100,0 $см^3$ среды.

Суспензию клеток разливают в посуду для выращивания монослоя клеток из расчета 1:5 (суспензия клеток/объем посуды), например: по 2,0 $см^3$ в культуральные пробирки емкостью 10,0 $см^3$; по 10,0 $см^3$ в плоскостенные флаконы емкостью 50,0 $см^3$.

Через четыре-пять дней культивирования клеток в термостате при температуре (36 ± 1) °С на стекле образуется сливной слой клеток.

10.4.2 Упрощенная процедура перевивания клеточной линии

Флакон с культурой клеток микроскопируют и, в зависимости от качества монослоя, намечают пропорцию разведения клеток при процедуре перевивания. При плотном монослое клетки перевивают из расчета 1:4 или 1:5. Это значит, что клетки, снятые с одного флакона, перевивают на четыре или пять таких же флаконов после разведения клеточной взвеси в соответствующем объеме среды. Если во флаконе, с которого идет перевивание клеток, содержится 10,0 $см^3$ среды, то эти же клетки после диспергирования ресуспендируют в 40,0 $см^3$ или 50,0 $см^3$ среды для выращивания клеток.

Клетки однослойной культуры снимают со стекла раствором трипсина с раствором Версена. Для этого приготавливают смесь равных объемов 0,25 % раствора трипсина и раствора Версена, подогревают ее в водяной бане до температуры от 30 °С до 35 °С и теплой смесью заливают монослой культуры клеток так, чтобы все участки были покрыты жидкостью. Через 2—5 мин визуально устанавливают появление небольших разрушений монослоя на стекле в виде «проплешин», «окошек», «дорожек». Раствор из Трипсина и Версена осторожно сливают из флакона, флакон помещают на горизонтальную поверхность монослоем клеток вниз. Через 3—5 мин флакон энергично встряхивают вручную, при этом клетки отторгаются от стекла. Во флакон вносят 10,0 $см^3$ среды для выращивания клеток, клетки диспергируют, тщательно пипетируя клеточную взвесь. Затем вносят дополнительное количество питательной среды до расчетного объема.

В качестве среды для выращивания клеток используют среду «Игла МЕМ» (pH 7,2) с добавлением стерильной эмбриональной сыворотки КРС в объеме из расчета 10 % от конечного объема смеси жидкой среды и антибиотики из расчета по 25 тыс. ед. пенициллина и 25 мг стрептомицина на 100,0 $см^3$ среды.

Суспензию клеток разливают в посуду для выращивания монослоя клеток из расчета 1:5 (суспензия клеток/объем посуды), например: по 2,0 $см^3$ в культуральные пробирки емкостью 10,0 $см^3$; и примерно по 7,5 $см^3$ (или иной объем, достаточный для образования монослоя) в плоскостенные флаконы емкостью 50,0 $см^3$.

Через 2—4 сут культивирования клеток при температуре (36 ± 1) °С проводят смену ростовой среды на поддерживающую. В качестве среды для поддержания роста клеток используют:

- среду с 0,5 %-ным раствором гидролизата лактальбумина на растворе Эрла, pH 7,6;
- среду 199 на растворе Эрла;
- среду «Игла МЕМ» с глютамином (L-глютамин в замороженном состоянии хранят в отдельной расфасовке и добавляют непосредственно перед работой).

Через 4—5 сут культивирования клеток в термостате при температуре (36 ± 1) °С на стекле образуется сплошной монослой клеток.

10.5 Проведение качественного исследования на культуре клеток

10.5.1 Первичное заражение

Для исследования одной пробы используют не менее двух культур клеток площадью не менее 75 $см^2$. Это соответствует трем флаконам емкостью 50,0 $см^3$ (поверхность каждого флакона составляет

25 $см^2$). Два из этих флаконов должны быть с культурой клеток RD, один — с любой другой из рекомендованных культур.

Предварительно флаконы со свежеобразованным монослоем клеток микроскопируют для того, чтобы убедиться в здоровом состоянии клеток.

После замены ростовой среды на поддерживающую среду (без сыворотки) объемом 4,5 $см^3$ флаконы маркируют (указывают номер пробы, дату заражения, номер пассажа). С выросшего монослоя в пробирках или флаконах сливают ростовую питательную среду, клеточный слой ополаскивают раствором Хенкса для удаления белка питательной среды и продуктов клеточного обмена. В каждый флакон вносят примерно по 7,5 $см^3$ поддерживающей среды, затем по 0,5 $см^3$ обработанного элюата. Все используемые клеточные линии следует инокулировать одновременно.

В качестве контроля исходной культуры клеток обязательно оставляют по одному незараженному флакону каждой культуры.

Флаконы инкубируют в термостате при температуре плюс (36 ± 1) °С. Ежедневно в течение не более 10 дней культуры проверяют на наличие ЦПЭ. Все признаки ЦПЭ, токсичности, контаминации посторонними микроорганизмами регистрируют в лабораторном журнале. При появлении ЦПЭ (при охвате изменениями 75 % клеточного монослоя) прекращают инкубацию флаконов и сохраняют культуральную жидкость при температуре минус 20 °С для следующего пассажа на той же культуре клеток.

10.5.2 Пассирование культур после первичного заражения

Содержимое каждого флакона с культурой клеток пассируют индивидуально, флаконы не допускается объединять и (или) сливать.

Если при первичном заражении не наблюдали ЦПЭ, то делают так называемый «слепой» пассаж. Культуры, в которых не проявлялся ЦПЭ, инкубируют и наблюдают в течение не менее 14 дней. При отсутствии ЦПЭ на протяжении этого срока культуры отбрасывают как негативные. При надлежащем состоянии культуры клеток первичное заражение и один пассаж вместе составляют период наблюдения 14 дней. В ряде случаев (например, при выделении агента с низкой цитопатогенной активностью или при наличии в пробе вируса в небольшом количестве) необходимо сделать последующие пассажи. При этом следует помнить о том, что каждый последующий пассаж увеличивает риск перекрестной контаминации.

Пассирование проводят следующим образом: отобранные флаконы с культурой клеток после первичного заражения или предыдущего пассажа подвергают тройному циклу «заморозки-разморозки» (примерно минус 20 °С для заморозки и примерно плюс 36 °С для разморозки) для разрушения оставшихся после культивирования клеток. Затем осуществляют заражение новых флаконов с чистой культурой полученных суспензий в соответствии с 10.5.1.

10.5.3 Метод адсорбции исследуемого материала на клеточном монослое

При использовании этого метода из посуды для выращивания монослоя клеток удаляют ростовую среду, вносят исследуемую пробу и инкубируют флакон при температуре плюс (36 ± 1) °С в течение 1 ч. Таким образом, создают наиболее подходящие условия для адсорбции вируса клетками, если он присутствует в пробе. После истечения срока инкубации в каждую единицу посуды для выращивания монослоя клеток вносят необходимое количество поддерживающей среды. Применение этого метода может способствовать выявлению вируса при его незначительных количествах в исследуемом материале, а также ускорять проявление ЦПЭ по крайней мере на 1 сут. При использовании этого метода в результате дополнительных открываний крышек во много раз возрастает вероятность контаминации (перекрестной вирусной или бактериальной). Ввиду высокого риска контаминации этот метод не следует использовать для пассирования или инокуляции изолятов вирусов.

10.5.4 Идентификация цитопатических агентов в реакции нейтрализации

В основе идентификации выделенных ЦПА в реакции нейтрализации лежит взаимодействие исследуемого вируса с гомологичной антисывороткой (или смесью антисывороток), которая нейтрализует вирус, что проявляется в виде отсутствия ЦПЭ на культуре клеток. Обычно в опыте нейтрализации вирусную суспензию, содержащую 100 тканевых цитопатогенных доз, вызывающих гибель 50 % клеток монослоя ($ТЦД_{50}$), смешивают с равным объемом диагностических сывороток.

После инкубации в течение 1 ч при температуре плюс (36 ± 1) °С проводят заражение культуры клеток смесью вируса и сыворотки во флаконах, пробирках или планшетах. Опыт ежедневно просматривают под микроскопом в течение не менее трех дней. Иммунная сыворотка, которая предотвращает развитие ЦПЭ, указывает тип вируса.

При постановке реакции нейтрализации необходимо соблюдать несколько наиболее значимых положений.

Для идентификации ЦПА неизменно используют ту культуру клеток, на которой они были выделены. Если ЦПА выделен в нескольких культурах клеток, то следует провести идентификацию каждого штамма. Это связано с тем, что в пробах воды могут содержаться различные энтеровирусы, а чувствительность клеточных культур к разным энтеровирусам различная.

При проведении опыта необходимо использовать разведение испытуемого изолята, содержащее 100 $ТЦД_{50}$. Для того чтобы определить необходимое разведение, проводят предварительное титрование выделенного ЦПА. Опытные лаборатории, использующие культуры клеток со стабильной чувствительностью, могут избежать этой процедуры. Установлено, что суспензия вируса, полученная на культуре, где цитопатогенные изменения поражают от 75 % до 100 % клеточного монослоя, содержит примерно 10^6 $ТЦД_{50}$, поэтому в процессе опыта используют разведения 10^{-3} и 10^{-4}. Это экономит время исследования и материалы, необходимые для предварительного титрования. Однако контрольное титрование исследуемого изолята рекомендуется включать в каждый опыт по идентификации. Это позволяет рассчитать титр вируса в условиях данного опыта.

Реакцию нейтрализации проводят в культуральных планшетах с плоским дном (микрометод). Микрометод позволяет экономить все компоненты, необходимые для проведения опыта, однако при недостаточном опыте возникает опасность перекрестной лабораторной контаминации.

10.5.5 Идентификация цитопатических агентов методом ПЦР/ОТ-ПЦР

Отобранные флаконы с культурой клеток после первичного заражения или проведенного пассажа подвергают тройному циклу «заморозки-разморозки» (примерно минус 20 °С для заморозки и примерно 36 °С для разморозки) для разрушения оставшихся после культивирования клеток. Использованную суспензию исследуют для идентификации ЦПА методом ПЦР/ОТ-ПЦР.

Необходимое оборудование, расходные материалы и реактивы используют в соответствии с инструкцией к применяемому зарегистрированному коммерческому набору, предназначенному для выделения искомой вирусной ДНК или РНК, к набору для проведения обратной транскрипции, а также ПЦР тест-систем, зарегистрированных в России.

Экстракцию (выделение), обратную транскрипцию, амплификацию, идентификацию и хранение вирусных ДНК и РНК проводят в соответствии с инструкцией к применяемому зарегистрированному коммерческому набору.

10.5.6 Нежелательные явления при выделении вирусов из проб воды различного происхождения

Если при первичном заражении в культуре клеток развивается быстрая (в течение одного — двух дней после внесения исследуемого субстрата) дегенерация клеток, то, вероятнее, это связано с неспецифической токсичностью пробы. Такие культуры нужно заморозить при температуре минус 20 °С, оттаять и выполнить пассаж. Если признаки токсичности обнаружатся вновь, то следует возвратиться к исходной пробе, развести ее в питательной среде в соотношении 1:10 и повторить заражение.

Бактериальная контаминация, которая проявляется в виде помутнения среды, приводит к гибели клеток и делает выявление вирусного ЦПЭ затруднительным или невозможным. В этом случае следует возвратиться к исходной пробе, подвергнуть антибактериальной обработке и повторить процедуры заражения.

Особое внимание следует уделять предупреждению перекрестной вирусной контаминации во время процедур заражения и пассирования. Не допускается сливать среду через край флакона или пробирки, в которые вносилась исследуемая проба, даже если ЦПЭ отсутствует. Удаление среды проводят пипеткой, которую меняют после каждой процедуры. При заражении с помощью автоматических дозаторов используют только наконечники с фильтрами. Следует избегать процедур, при которых образуются аэрозоли (например, энергичное пипетирование). По возможности не рекомендуется использование посуды с силиконовыми пробками, которые помещаются внутрь горлышка флакона или пробирки, целесообразно применять посуду с внешней резьбой на горлышке, которая закрывается завинчивающимися крышками.

10.6 Проведение количественного исследования на культуре клеток

10.6.1 Метод конечного разведения для определения количества вирусов в вируссодержащем материале на культуре клеток

Для получения данных о количестве цитопатогенных энтеровирусов в материале чаще всего используют метод конечного разведения, основанный на цитопатогенном действии вирусных частиц на культуру клеток.

При использовании метода конечного разведения определяют наибольшее разведение вируссодержащего материала, при котором возникает дегенерация в 50 % пробирок с зараженной культурой клеток. Количество вируса в этом разведении называют 50 %-ной тканевой цитопатогенной дозой. При использовании метода конечного разведения единицей измерения количества вируса в образце является 50 %-ная тканевая цитопатогенная доза — $ТЦД_{50}$.

Для проведения исследования готовят серию последовательных десятикратных разведений вируссодержащего материала. Каждое разведение вируссодержащей жидкости в объеме 0,1 или 0,2 $см^3$ вносят в четыре, пять или шесть пробирок с культурой клеток. Допускается использование культуральных планшетов с соблюдением процентных соотношений вируссодержащей жидкости к конечному объему культуральной жидкости. Процедуру заражения проводят согласно указаниям 9.5.1. Состояние культур периодически проверяют под микроскопом, отмечая на 4-е и 7-е сутки пробирки/ячейки планшета с дегенерацией клеток.

Титр вируса в $ТЦД_{50}$ определяют методом пробитов или методом Рида и Менча.

а) Расчет титра вируса методом пробитов

При титровании десятикратных разведений вируссодержащего материала на четырех, пяти, шести пробирках/ячейках планшета (n = 4, 5, 6) используют данные из таблиц А.6—А.9. Полученные результаты сопоставляют с данными левой части используемой для расчета таблицы, где указано количество пробирок/ячеек планшета, в которых наступила дегенерация клеток в четырех последних разведениях вируссодержащего материала. В правой части таблицы находят соответствующий им титр вируса в $ТЦД_{50}$, выраженных в lg, с ошибкой титрования m. Истинный титр определяют, суммируя найденные по таблице значение и логарифм разведения, с которого начали определять титр.

Пример — Определяют значение титра вируса в $ТЦД_{50}$ результатах титрования, приведенных в таблице 2, каждого разведения в четырех пробирках и объеме заражающей дозы 0,2 $см^3$.

Таблица 2 — Пример полученных результатов титрования

Разведение вируссодержащего материала	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Число пробирок с культурой клеток, в которых наступила дегенерация	*4*	*4*	*3*	*1*	*0*

По таблице 2, где n = 4, находят строку, соответствующую результатам титрования в четырех последних разведениях, т. е. 4, 3, 1, 0. Определяют lg титра и ошибку титрования (1,5 ± 0,2). К найденному значению прибавляют десятичный логарифм разведения, с которого начали определять титр, в данном случае — 2. Титр вируса вируссодержащей жидкости в объеме 0,2 $см^3$ равен 2 + 1,5 ± 0,2 = (3,5 ± 0,2) lg. Очевидно, что в объеме 0,2 $см^3$ содержится (3200 ± 0,2) $ТЦД_{50}$; в вируссодержащей жидкости объемом 1,0 $см^3$ вируса будет в пять раз больше, т. е. 3,5 + lg 5 ± 0,2 = 3,5 + + 0,7 ± 0,2 lg или (104,2 ± 2,0) $ТЦД_{50}$ в 1,0 $см^3$, или (4,2 ± 0,2) $ТЦД_{50}$, выраженных в lg.

б) Расчет титра вируса по методу Рида и Менча

Метод основан на логической предпосылке, что тканевая культура или животное, погибшие при их заражении каким-либо разведением вируса, погибнут и при заражении любым более низким разведением.

Расчет $ТЦД_{50}$ в lg проводят по следующей формуле:

$$ТЦД_{50} = N + \frac{A - 50}{A - B}, \quad (1)$$

где N — номер разведения, ниже которого гибель культуры в тест-объектах более 50 %;

A — процент гибели при разведении, непосредственно ниже искомой 50 %-ной дозы;

B — процент гибели при разведении непосредственно выше искомой 50 %-ной дозы.

Для вычисления $ТЦД_{50}$ вируса в объеме 1,0 $см^3$ исследуемой жидкости к показателю величины титра вируса, выраженного в lg, прибавляют в зависимости от количества вируссодержащего материала, взятого для заражения одной культуры, соответствующую ее величину поправки (см. таблицу 3).

Таблица 3 — Поправка для подсчета количества вируса в $ТЦД_{50}$ в объеме 1,0 $см^3$ исследуемой жидкости

Объем материала, $см^3$, изъятого для заражения одной культуры	Значение поправки в единицах десятичного логарифма
0,10	1,00
0,20	0,70
0,25	0,60
0,30	0,52
0,40	0,40
0,50	0,30
0,60	0,22
0,70	0,16
0,80	0,10

Пример — Определяют значение титра вируса в $ТЦД_{50}$ при следующих результатах титрования (см. таблицу 4) каждого разведения на четырех пробирках и в объеме заражающей дозы 0,2 $см^3$.

Таблица 4 — Пример подсчета $ТЦД_{50}$ по методу Рида и Менча

Разведение вируса	*Количество тест-объектов*	*Исходные данные*		*Кумулятивные данные*		*Процент гибели*
		Погибло	*Выжило*	*Погибло*	*Выжило*	
10^{-5}	4	4	0	7	0	100
10^{-6}	4	2	2	3	2	60
10^{-7}	4	1	1	1	5	17
10^{-8}	4	0	0	0	9	0

Согласно таблице 4 50 %-ная доза находится между разведениями вируса 10^{-6} и 10^{-7}.

Проводят расчет:

$$ТЦД_{50} = 6 + \frac{60 - 50}{60 - 17} = 6,23. \quad (2)$$

Таким образом, в исследуемой жидкости объемом 0,2 $см^3$ титр вируса равен 6,23 lg $ТЦД_{50}$.

Для подсчета титра вируса в 1,0 $см^3$ ищем поправку для 0,2 $см^3$, взятых для заражения одного тест-объекта. В данном примере поправка равна 0,7.

Таким образом, в исследуемой жидкости объемом 1 $см^3$ титр вируса равен 6,93 lg $ТЦД_{50}$.

10.6.2 Метод бляшек для определения количества определяемого вируса в вируссодержащем материале на культуре клеток

а) Проведение метода

Готовят серию последовательных 10-кратных разведений вируссодержащей жидкости. Отмывают культуру клеток согласно 10.5.1 Каждое разведение вируссодержащей жидкости в объеме 0,1 или 0,2 $см^3$ вносят в два-четыре плоскостенных флакона с культурой клеток, выпуская жидкость из пипетки легкой струйкой, чтобы не повредить монослой. Флаконы слегка покачивают, чтобы равномерно распределить вируссодержащую жидкость по монослою. Зараженные флаконы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 60 мин, а затем заливают агаровым покрытием.

Количество бляшек подсчитывают на 3, 4, 5, 7-е сутки. Разведение вируссодержащей жидкости, при котором на монослое 50,0 $см^3$ плоскостенного флакона появилось 15—20 бляшек, считают оптимальным для определения титра вируса.

б) Расчет титра вируса в БОЕ

При определении титра вируса для повышения точности в расчетах используют результаты, получаемые в двух разведениях:

1) в разведении, при котором появилось оптимальное для подсчета количество бляшек;
2) последующего за ним разведения, при котором появились единичные бляшки.

Пример — При титровании вируссодержащего материала методом бляшек использовали по три флакона с культурой клеток для заражения материалом каждого разведения. Объем заражающей дозы — 0,2 см^3. На флаконах, зараженных материалом в разведении 10^{-6}, появилось 15, 16, 20 бляшек; на флаконах, зараженных материалом в разведении 10^{-7} — 2, 3, 1 бляшка.

По данным титрования проводят расчет титра определяемого вируса.

в) Определение среднеарифметического числа бляшек во флаконах

Среднеарифметическое количество X бляшек во флаконах, зараженных вируссодержащей жидкостью каждого из указанных разведений, определяют по формуле

$$X = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}, \quad (3)$$

где X — среднеарифметическое количество бляшек во флаконах, зараженных материалом из того разведения, при котором появились единичные бляшки;

x_i — количество бляшек во флаконе с номером i данного разведения;

n — количество зараженных флаконов данного разведения.

Пример — В разведении 10^{-7} появилось 1, 2, 3 бляшки, в разведении 10^{-6} — 15, 16, 20 бляшек.

$$X_1 = \frac{1+2+3}{3} = 2; \quad (4)$$

$$X_2 = \frac{15+16+20}{3} = 17. \quad (5)$$

г) Определение среднеквадратического отклонения

Среднеквадратическое отклонение S определяют по формуле:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i - n \cdot X^2}{n-1}, \quad (6)$$

где x_i — количество бляшек во флаконе с номером i данного разведения;

n — количество зараженных флаконов данного разведения.

Например:

$$S_1 = \frac{(1^2 + 2^2 + 3^2) - 3 \cdot 2^2}{3-1} = 1; \quad (7)$$

$$S_2 = \frac{(15^2 + 16^2 + 20^2) - 3 \cdot 17^2}{3-1} = 7. \quad (8)$$

д) Определение значения весов и ошибки титрования

По данным таблиц А.1—А.5 определяют значение весов W. Для проведения всех последующих вычислений подбирают таблицу в зависимости от n, т. е. от количества флаконов, которые использованы для заражения одним разведением.

Пример — $S_1 = 1$; $S_2 = 7$; $n = 3$.

По данным таблицы 3, при $n = 3$ от обозначения S_1 продолжают горизонтальную линию и находят цифру, равную 1,0 или близкую к ней по значению. В данном примере найденное значение равно 1,00. Под этой цифрой находят значение W_1, равное 3,00.

По данным таблицы 3, при $n = 3$ под обозначением S_2 продолжают вертикальную линию и находят цифру 7,0 или наиболее близкую к ней. В данном примере найденное значение равно 5,00. Рядом с этой цифрой справа находят значение W_2, равное 60,00.

е) Определение ошибки титрования

По приложению А определяют ошибку титрования m на пересечении вертикальной линии, идущей от значения W_1, и горизонтальной линии, идущей от значения W_2.

Пример — В данном примере значение ошибки титрования m = 0,54.

ж) Определение средневзвешенного титра определяемых вирусов

Средневзвешенный титр вируса Z определяют по формуле

$$Z = \frac{X_1 \cdot W_1 + \frac{X_2}{10} \cdot W_1}{W_1 + W_2}. \quad (9)$$

Пример — В данном примере проводят следующий расчет:

$$Z = \frac{2 \cdot 3 + \frac{17}{10} \cdot 60}{3 + 60} = 1{,}71. \quad (10)$$

Значение среднего титра в данном примере 1,71 · 10^7 БОЕ в объеме 0,2 $см^3$ при ошибке m = 0,54 или (107,93 ± 0,54) БОЕ/$см^3$ или (7,93 ± 0,54) БОЕ/$см^3$, выраженное в lg.

и) Условия, необходимые для учета результатов титрования определяемых вирусов

Результаты титрования не учитывают, если нарушены следующие условия:

- отношение количества бляшек в двух соседних разведениях должно быть равно 10;
- отношение размаха выборки (максимальное число бляшек на флаконе минус минимальное количество бляшек на флаконе среди параллельных флаконов одного разведения) к среднему числу бляшек на флаконе должно быть менее 3.

10.7 Выявление искомой вирусной ДНК и РНК из проб воды

Необходимое оборудование, расходные материалы и реактивы используют в соответствии с инструкцией к применяемому зарегистрированному коммерческому набору, предназначенному для выделения искомой вирусной ДНК или РНК, а также ПЦР тест-систем, зарегистрированных в России.

Идентификация искомых вирусов методом ПЦР по определению ДНК и РНК из проб вод, обработанных ультрафиолетовым облучением, проводят только в качестве скрининга с последующим определением инфекционности выделенных вирусов на культуре клеток.

Экстракцию (выделение), обратную транскрипцию, амплификацию, идентификацию и хранение вирусной ДНК и РНК проводят в соответствии с инструкцией к применяемому зарегистрированному коммерческому набору, предназначенному для выделения искомой вирусной ДНК или РНК, к набору для выполнения обратной транскрипции, а также ПЦР тест-систем, зарегистрированных в России.

10.8 Электронно-микроскопическое изучение элюатов и других проб при вирусологическом анализе воды

Метод прямой просвечивающей электронной микроскопии можно отнести к экспресс-методам, поскольку при наличии электронного микроскопа весь анализ, включая приготовление сеток электронно-микроскопических, занимает от 10 до 20 мин. Многие вирусы имеют уникальный внешний вид, поэтому данный метод позволяет незамедлительно идентифицировать обнаруженные вирионы до семейства и даже до родов по вирусной классификации, что выгодно отличает его от других методов.

10.8.1 Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды и средства измерений

Для проведения метода рекомендованы приборы, оборудование и расходные материалы, указанные в разделе 5, а также:

микроскоп электронный;

материал, не смачивающийся водой (например, фторопласт);

сетка медная электронно-микроскопическая (150 меш);

бумага фильтровальная;

вода дистиллированная;

раствор, контрастный для электронов (например, 1 %-ный раствор уранилацетата или 2 % — 5 %-ный раствор солей свинца).

10.8.2 Приготовление электронно-микроскопических сеток

10.8.2.1 На ленту из несмачивающегося водой материала (например, фторопласта) наносят одну каплю элюата или другой суспензии, предположительно содержащей вирусы.

10.8.2.2 Сверху на каплю элюата или суспензии осторожно накладывают электронно-микроскопическую медную сетку (150 меш) пленкой подложкой вниз на 10 мин.

10.8.2.3 Сетку аккуратно переносят для промывки в одну каплю дистиллированной воды на 5 с, после чего воду удаляют промакиванием кусочком фильтровальной бумаги.

10.8.2.4 Сетку переносят в каплю какого-либо контрастного для электронов раствора, например 1 %-ного раствора уранилацетата или 5 %-ного раствора солей свинца на 30 с.

10.8.2.5 После удаления контрастера фильтровальной бумагой препарат готов для исследования под электронным микроскопом.

Приложение А
(обязательное)

Расчет титра вируса

В таблицах А.1—А.8 приведен расчет титра вируса.

Таблица А.1 — Расчет титра вируса, БОЕ/см^3, при n = 2

	*S*1	0,50	1,00	2,00	5,00	10,00	15,00	20,00	25,00	30,00	35,00	40,00
*S*2	*W*1 / *W*2	4,00	2,00	1,00	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08	0,06	0,05	0,05
5,00	40,00	2,08	2,10	2,07	2,04	2,02	2,02	2,01	2,01	2,01	2,01	2,01
10,00	20,00	2,63	2,94	2,98	2,92	2,88	2,87	2,86	2,86	2,85	2,85	2,85
15,00	13,00	2,70	3,45	3,65	3,61	3,56	3,53	3,52	3,51	3,51	3,50	3,50
20,00	10,00	2,53	3,72	4,17	4,20	4,13	4,10	4,08	4,07	4,06	4,05	4,05
25,00	8,00	2,28	3,83	4,57	4,71	4,64	4,60	5,58	4,56	4,55	5,54	5,54
30,00	6,66	2,04	3,82	4,88	5,17	5,11	5,06	5,03	5,01	5,00	4,99	4,98
35,00	5,71	1,85	3,73	5,10	5,58	5,54	5,49	5,45	5,43	5,41	5,40	5,39
40,00	5,00	1,73	3,58	5,26	5,95	5,94	5,89	5,85	5,80	5,78	5,78	5,77
60,00	3,33	1,87	2,89	5,40	7,11	7,31	7,28	7,23	7,19	7,16	7,14	7,12
80,00	2,50	2,51	2,44	5,07	7,87	8,42	8,44	8,40	8,36	8,33	8,30	8,27
100,00	2,00	3,23	3,72	4,57	8,32	9,32	9,44	9,43	9,39	9,36	9,32	9,29
120,00	1,66	3,87	2,64	4,08	8,54	10,06	10,31	10,34	10,32	10,29	10,26	10,23

Таблица А.2 — Расчет титра вируса, БОЕ/см^3, при n = 3

	*S*1	0,50	1,00	2,00	5,00	10,00	15,00	20,00	25,00	30,00	35,00	40,00
*S*2	*W*1 / *W*2	6,00	3,00	1,50	0,60	0,30	0,20	0,15	0,12	0,10	0,08	0,07
5,00	60,00	0,51	0,54	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
10,00	30,00	0,61	0,72	0,76	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78
15,00	20,00	0,79	0,82	0,91	0,95	0,95	0,95	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96
20,00	15,00	0,85	0,87	1,02	1,09	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
25,00	12,00	0,88	0,88	1,10	1,21	1,23	1,23	1,23	1,23	1,23	1,23	1,24
30,00	10,00	0,91	1,12	1,16	1,31	1,34	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35
35,00	8,57	0,93	1,17	1,20	1,40	1,44	1,45	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46
40,00	7,50	0,95	1,20	1,23	1,48	1,54	1,55	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56
60,00	5,00	1,05	1,28	1,59	1,72	1,85	1,89	1,90	1,90	1,91	1,91	1,91
80,00	3,75	1,15	1,34	1,70	1,87	2,10	2,16	2,18	2,18	2,20	2,20	2,20
100,00	3,00	1,25	1,59	1,77	1,95	2,29	2,33	2,42	2,44	2,45	2,45	2,46
120,00	2,50	1,33	1,48	1,82	1,97	2,44	2,57	2,63	2,65	2,67	2,68	2,69

Таблица А.3 — Расчет титра вируса, БОЕ/см^3, при n = 4

S2 \ S1	0,50	1,00	2,00	5,00	10,00	15,00	20,00	25,00	30,00	35,00	40,00
W2 \ W1	8,00	4,00	2,00	0,80	0,40	0,26	0,20	0,16	0,13	0,11	0,10
5,00	80,00	0,32	0,34	0,34	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
10,00	40,00	0,45	0,45	0,48	0,49	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
15,00	26,66	0,51	0,52	0,57	0,60	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
20,00	20,00	0,59	0,64	0,64	0,69	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
25,00	16,00	0,63	0,69	0,69	0,76	0,78	0,78	0,78	0,79	0,79	0,79	0,79
30,00	13,33	0,66	0,73	0,73	0,82	0,85	0,85	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
35,00	11,42	0,68	0,75	0,87	0,88	0,91	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
40,00	10,00	0,70	0,84	0,91	0,93	0,97	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
60,00	6,66	0,78	0,93	1,03	1,09	1,17	1,19	1,20	1,21	1,21	1,21	1,22
80,00	5,00	0,84	0,99	1,19	1,18	1,32	1,36	1,38	1,39	1,39	1,40	1,40
100,00	4,00	0,89	1,11	1,26	1,44	1,44	1,50	1,52	1,54	1,55	1,55	1,66
120,00	3,33	0,93	1,10	1,32	1,53	1,53	1,62	1,65	1,67	1,69	1,69	1,70

Таблица А.4 — Расчет титра вируса, БОЕ/см^3, при n = 5

S2 \ S1	0,50	1,00	2,00	5,00	10,00	15,00	20,00	25,00	30,00	35,00	40,00
W2 \ W1	10,00	5,00	2,50	1,00	0,50	0,33	0,25	0,20	0,16	0,14	0,12
5,00	100,00	0,25	0,26	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
10,00	50,00	0,35	0,35	0,37	0,38	0,38	0,38	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
15,00	33,33	0,42	0,44	0,45	0,46	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47
20,00	25,00	0,46	0,50	0,50	0,53	0,54	0,54	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
25,00	20,00	0,51	0,53	0,54	0,59	0,60	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
30,00	16,66	0,53	0,60	0,63	0,64	0,66	0,66	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67
35,00	14,28	0,55	0,63	0,67	0,68	0,71	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72
40,00	12,50	0,57	0,65	0,70	0,72	0,75	0,76	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77
60,00	8,33	0,63	0,76	0,85	0,85	0,91	0,92	0,93	0,94	0,94	0,94	0,94
80,00	6,25	0,68	0,81	0,92	1,03	1,03	1,05	1,07	1,08	1,08	1,08	1,09
100,00	5,00	0,72	0,89	1,02	1,12	1,12	1,16	1,18	1,20	1,20	1,21	1,21
120,00	4,16	0,72	0,90	1,07	1,18	1,20	1,26	1,28	1,30	1,31	1,32	1,32

Таблица А.5 — Расчет титра вируса, БОЕ/см^3, при n = 6

S2 \ S1	W2 \ W1	0,50	1,00	2,00	5,00	10,00	15,00	20,00	25,00	30,00	35,00	40,00
		12,00	6,00	3,00	1,20	0,60	0,40	0,30	0,24	0,20	0,17	0,15
5,00	120,00	0,21	0,22	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
10,00	60,00	0,29	0,30	0,31	0,32	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
15,00	40,00	0,35	0,37	0,38	0,39	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
20,00	30,00	0,40	0,41	0,42	0,45	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46
25,00	24,00	0,43	0,47	0,49	0,50	0,51	0,51	0,51	0,52	0,52	0,52	0,52
30,00	20,00	0,46	0,50	0,53	0,54	0,56	0,56	0,56	0,56	0,57	0,57	0,57
35,00	17,14	0,48	0,54	0,56	0,58	0,60	0,60	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
40,00	15,00	0,49	0,56	0,59	0,61	0,64	0,64	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
60,00	10,00	0,55	0,65	0,71	0,77	0,77	0,78	0,78	0,79	0,80	0,80	0,80
80,00	7,50	0,59	0,70	0,80	0,86	0,87	0,89	0,90	0,91	0,91	0,92	0,92
100,00	6,00	0,62	0,76	0,87	0,93	0,95	0,98	1,01	1,01	1,02	1,02	1,02
120,00	5,00	0,62	0,77	0,92	1,04	1,09	1,06	1,09	1,10	1,11	1,11	1,12

Таблица А.6 — Расчет титра вируса в $ТЦД_{50}$ при $n = 4$

$n = 4$	$ТЦД_{50}$, lg	M
4 4 3 0	1,94	0,25
4 4 2 0	1,85	0,23
4 4 1 0	1,77	0,22
4 3 3 2	2,47	0,31
4 3 3 1	2,20	0,24
4 3 3 0	1,66	0,20
4 3 2 2	2,29	0,27
4 3 2 0	1,58	0,20
4 3 1 1	1,92	0,21
4 2 2 1	1,92	0,22
4 2 1 0	1,40	0,20
4 2 0 0	1,14	0,23
3 3 2 0	1,17	0,21
4 3 2 1	1,50	0,20
4 3 1 0	1,50	0,20
4 2 2 0	1,50	0,21

Таблица А.7 — Расчет титра вируса в $ТЦД_{50}$ при $n = 5$

$n = 5$	$ТЦД_{50}$, lg	M
5 5 3 0	1,89	0,23
5 5 2 0	1,82	0,22
5 5 1 0	1,75	0,21
5 4 3 1	2,09	0,21
5 4 3 0	1,64	0,19
5 4 2 1	1,98	0,20
5 4 2 0	1,57	0,18
5 3 2 1	1,88	0,19
5 3 1 0	1,41	0,18
5 2 2 0	1,43	0,19
5 2 1 0	1,35	0,19
4 4 2 1	1,63	0,06
4 4 2 0	1,19	0,19
4 3 1 0	0,98	0,20
5 3 2 0	1,50	0,18
4 3 2 1	1,50	0,19

Таблица А.8 — Расчет титра вируса в $ТЦД_{50}$ при $n = 6$

$n = 6$	$ТЦД_{50}$, lg	M
6 5 3 1	2,03	0,19
6 5 3 0	1,62	0,18
6 5 2 1	1,93	0,18
6 5 2 0	1,56	0,17
6 4 3 2	2,09	0,21
6 4 3 1	1,92	0,18
6 4 3 0	1,55	0,18
6 4 2 1	1,83	0,18
6 3 2 1	1,76	0,18
6 3 2 0	1,44	0,18
5 4 2 1	1,48	0,06
5 4 2 0	1,13	0,18
5 3 2 1	1,36	0,06
5 3 2 0	1,05	0,18
6 4 3 1	1,92	0,18
6 5 1 0	1,50	0,19

Библиография

[1] МУ 2.1.4.1057-01 Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологического исследования воды

[2] МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред

[3] СанПиН 2.1.3684-21 Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий

[4] Рекомендации по надзору за вирусом полиомиелита в окружающей среде — ВОЗ, 2003

УДК 614.78:578.432:578.242.2 ОКС 7.100.20

Ключевые слова: вода питьевая, вода бассейнов и аквапарков, сточная вода, санитарно-вирусологический контроль, вирусология

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 08.04.2024. Подписано в печать 12.04.2024. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 4,18. Уч.-изд. л. 3,76.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru