ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 71327— 2024

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Методы определения санитарно-микробиологических и санитарно-паразитологических показателей при оценке воды поверхностных водных объектов и сточных вод

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2024

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Российской ассоциацией водоснабжения и водоотведения (РАВВ) 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), 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), Федеральным бюджетным учреждением науки «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» 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. № 413-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 2
4 Сокращения 3
5 Оборудование, расходные материалы, стандартные образцы 3
6 Приготовление и контроль питательных сред 6
7 Общие требования к отбору, транспортированию, хранению проб 6
8 Методы посева 8
9 Методы определения санитарно-микробиологических показателей 9
10 Определение патогенных бактерий рода *Salmonella* и рода *Shigella* 17
11 Определение колифагов в воде методом прямого посева 22
12 Санитарно-паразитологические методы исследований 24
13 Исследование воды на цисты лямблий и ооцисты криптоспоридий методом иммуномагнитного разделения и мечения флуоресцирующими антителами 28
14 Обнаружение цистных форм криптоспоридий и лямблий методом полимеразной цепной реакции 31
Приложение А (рекомендуемое) Схема посева воды из различных объектов 34
Приложение Б (рекомендуемое) Определение наиболее вероятного числа бактерий при титрационном методе посева 35
Приложение В (рекомендуемое) Постановка оксидазного теста, определение грам-принадлежности 37
Приложение Г (рекомендуемое) Растворы и методы приготовления для проведения санитарно-паразитологических методов исследования 39
Приложение Д (рекомендуемое) Определение наиболее вероятного числа колифагов при титрационном методе посева 40
Приложение Е (рекомендуемое) Эмпирическая оценка неопределенности при внедрении метода, связанная с исследованиями проб на наличие санитарно-показательных микроорганизмов в поверхностных и сточных водах 41
Библиография 43

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Методы определения санитарно-микробиологических и санитарно-паразитологических показателей при оценке воды поверхностных водных объектов и сточных вод

Water quality. Methods for determining sanitary-microbiological and sanitary-parasitological indicators for assessing water in surface water bodies and wastewater

Дата введения — 2024—05—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на поверхностные воды, воды поверхностных водоисточников, используемых для централизованного водоснабжения населения, воды водоисточников хозяйственно-бытового и рекреационного водопользования, воды поверхностных пресноводных и морских водоемов в местах водозаборов и в зонах рекреации в черте населенных пунктов, и на другие типы поверхностных вод, сточные воды, в том числе сточные, поступающие на очистные сооружения, сточные воды, допустимые к сбросу в поверхностные водные объекты вне черты населенных мест, на сточные воды, допустимые к сбросу в поверхностные водные объекты, на сточные воды, допустимые к сбросу в объекты рыбохозяйственного значения и на иные, а также на технические воды открытой и закрытой системы водоснабжения.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4159 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4232 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233 Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6824 Глицерин дистиллированный. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 17299 Спирт этиловый технический. Технические условия

ГОСТ 23519 Фенол синтетический технический. Технические условия

ГОСТ 23932 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24849 Вода. Методы санитарно-бактериологического анализа для полевых условий

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25794.1 Реактивы. Методы приготовления титрованных растворов для кислотно-основного титрования

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 30813 Вода и водоподготовка. Термины и определения

ГОСТ 31942 (ISO 19458:2006) Вода. Отбор проб для микробиологического анализа

Издание официальное

ГОСТ 31955.1 (ISO 9308-1:2000) Вода питьевая. Обнаружение и количественный учет Escherichia coli и колиформных бактерий. Часть 1. Метод мембранной фильтрации

ГОСТ 32010 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Shigella*

ГОСТ 34786 Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa и энтерококков

ГОСТ ISO 7899-2 Качество воды. Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков. Часть 2. Метод мембранной фильтрации

ГОСТ ISO 15553 Качество воды. Выделение из воды и идентификация ооцист криптоспоридий и цист лямблий

ГОСТ ISO 16266 Качество воды. Обнаружение и подсчет *Pseudomonas aeruginosa*. Метод мембранной фильтрации

ГОСТ ISO 20838—2014 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Требования к амплификации и обнаружению для качественного анализа

ГОСТ ISO 21570—2009 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Количественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте

ГОСТ ISO/TS 13136—2016 Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени для определения патогенных микроорганизмов. Горизонтальный метод определения бактерий *Escherichia coli*, продуцирующих Шига-токсин, в том числе серогрупп O157, O111, O26, O103 и O145

ГОСТ Р 59024—2020 Вода. Общие требования к отбору проб

ГОСТ Р 51232 Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества

ГОСТ Р 54502/ISO/TS 19036:2006 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по оценке неопределенности измерений при количественных определениях

ГОСТ Р 70151—2022 Качество воды. Отбор проб для проведения паразитологических исследований

ГОСТ Р 70152—2022 Качество воды. Методы внутреннего лабораторного контроля качества проведения микробиологических и паразитологических исследований

ГОСТ Р ИСО 21748 Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений

ГОСТ Р ИСО 21571—2014 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот

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 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 30813, ГОСТ 34786, ГОСТ Р 70151, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **сточные воды:** Воды, отводимые после использования в хозяйственно-бытовой и производственной деятельности человека, включая поверхностный сток с территорий поселений и объектов производственной деятельности.

3.2 **поверхностные воды:** Постоянное или временное сосредоточение вод на поверхности суши в формах ее рельефа, имеющее: границы, объем и черты водного режима [моря или их отдельные части (проливы, заливы, в т. ч. бухты, лиманы и др.); водотоки (реки, ручьи, каналы); водоемы (озера,

пруды, обводненные карьеры, водохранилища); болота; природные выходы подземных вод (родники, гейзеры): ледники, снежники].

3.3 **обобщенные колиформные бактерии:** Грамотрицательные, оксидазоотрицательные, лактозоположительные и лактозоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие глюкозу до кислоты и газа при температуре (37 ± 1) °С, в течение 24 ч.

3.4 **общие колиформные бактерии:** Оксидазоотрицательные, грамотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч и до 48 ч при отсутствии газа.

3.5 **колифаги:** Бактериальные вирусы, способные лизировать кишечную палочку и формировать зоны лизиса (бляшки) через (18 ± 2) ч при температуре (37 ± 1) °С на ее газоне на питательном агаре.

3.6 **криптоспоридии (лат. *Cryptosporidium*):** Род простейших одноклеточных организмов, паразитирующих в тонком кишечнике и дыхательных путях человека, других млекопитающих и птиц и вызывающих заболевание криптоспоридиоз.

3.7 **лямблии (жиáрдии) (лат. *Lamblia* или *Giardia*):** Род простейших одноклеточных организмов, паразитирующих в тонком кишечнике человека, других млекопитающих и птиц и вызывающих заболевание лямблиоз.

3.8 **гельминты:** Общее наименование паразитических червей, обитающих на разных стадиях жизненного цикла в организме человека, животных и растений, вызывая гельминтозы.

4 Сокращения

В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

АТМ — аналитические трековые мембраны;

БОЕ — количество бляшкообразующих единиц;

ДСН — дуплекс-специфическая нуклеаза;

ИМС — иммуномагнитная сепарация;

КОЕ — колонии образующие единицы;

МИС — молочно-ингибиторная среда;

НВЧ — наиболее вероятное число;

ПВА — поливинилацетат;

ПЦР — полимеразная цепная реакция;

ТТХ — трифенилтетразолий хлорид;

ЦТАБ — цетилтриметиламмония бромид;

ЭКД — экстракт кормовых дрожжей.

5 Оборудование, расходные материалы, стандартные образцы

5.1 Для реализации методов проведения санитарно-микробиологических исследований/испытаний используют следующую аппаратуру:

- стерилизатор паровой;
- стерилизатор суховоздушный;
- горелки газовые или спиртовки по ГОСТ 25336;
- термостат, обеспечивающий поддержание температуры (37 ± 1) °С;
- термостат, обеспечивающий поддержание температуры (44,0 ± 0,5) °С;
- термостат, обеспечивающий поддержание температуры (42 ± 1) °С;
- pH-метр, обеспечивающий измерение водородного показателя pH с допускаемой точностью ± 0,1;
- холодильник, обеспечивающий температуру плюс (6,0 ± 2) °С;
- аппарат для мембранной фильтрации под вакуумом с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм.

Примечание — Допускается использовать одноразовые стерильные фильтровальные аппараты;

- устройство электрическое или ручное для создания разрежения или насос водоструйный;
- емкости из нержавеющей стали или эмалированные с крышкой для стерилизации мембранных фильтров методом кипячения;
- фильтры мембранные из эфиров целлюлозы (нитрата или ацетата целлюлозы) или их смеси, трековые мембраны диаметром от 35 до 47 мм, номинальным диаметром пор 0,45 мкм, стерильные от производителя или простерилизованные и упакованные в лаборатории;
- пипетки стеклянные вместимостью 1,0; 5,0; 10,0 мл с ценой деления 0,1 мл многоразового использования по ГОСТ 29227 или пластиковые одноразового использования;
- пробирки лабораторные многоразового или одноразового использования;
- посуда мерная лабораторная стеклянная 2-го класса точности по ГОСТ 1770: цилиндры вместимостью от 100 до 2000 мл;
- чашки бактериологические (Петри) стеклянные по ГОСТ 23932 или пластмассовые однократного применения, диаметром 60 и 90 мм;
- петли бактериологические одноразового или многоразового применения;
- пробки силиконовые, выдерживающие стерилизацию сухим жаром;
- стандарт мутности оптический бактериальных взвесей 10МЕ;
- средства защиты (очки, резиновые перчатки, халаты, бахилы, шапочки, маски);
- микроскопы световые, оснащенные окулярами с увеличением 10× (дополнительно могут быть 7× и 5×), объективами 10×, 25×, 40×, 100×;
- бокс биологической безопасности не ниже II класса (типа А или Б);
- дозатор механический одноканальный не более 200; 1000 мкл;
- наконечники для механического дозатора 200, 1000 мкл;
- весы с разрешающей способностью не более 1 % для обеспечения максимальной допустимой погрешности 5 % по массе.

Примеры

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

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

Допускается для идентификации микроорганизмов использование тест-систем биохимической идентификации ручного исполнения или автоматических анализаторов с набором реагентов и расходных материалов в соответствии с методическими документами или инструкцией производителя [например, микробиологический анализатор для качественного и количественного определения микроорганизмов БакТрак 4300[1)], масс-спектрометр на основе времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) и др.].

5.2 Для проведения санитарно-паразитологических исследований/испытаний применяют аппаратуру, включая средства измерения, реактивы, расходные материалы, посуду по ГОСТ Р 70151—2022 (раздел 4), включая нижеприведенные:

5.2.1 Приборы мембранного фильтрования для санитарно-паразитологического исследования воды: вакуумные фильтровальные установки типа ПВФ-142, ПВФ-142Б, ПВФ-142Б(К), ПВФ-142Б (ДК), ПВФ-142ПБ, УППВ; комплект ЗИП (фритта, трубопроводы, фильтры к заборнофильтровальному устройству размером 220×220 мм).

5.2.2 Микроскопы световые для медико-биологических исследований препаратов в проходящем свете, светлом поле, по методу фазового контраста, косого освещения и темного поля, оснащенные окулярами с увеличением 10× (дополнительно могут быть 5×, 7×, 15×, 16× и др.), объективами 10×, 20× или 25×, 40×, 100×.

5.2.3 Микроскопы флуоресцентные (люминесцентные) с УФ-фильтром (длина волны возбуждения — 350 нм; длина волны эмиссии — 450 нм), фильтром FITC (длина волны возбуждения — 480 нм; длина волны эмиссии — 520 нм) или флуоресцентная насадка к микроскопу, например «ОптиЛюм», или аналогичные.

5.2.4 Фильтры мембранные для санитарно-паразитологических исследований на основе ацетатов целлюлозы типа: МФАС-СПА размерами пор от 1,5 до 3,0 мкм; МФАС-П-4 размерами пор от 2,4 до 4,5 мкм или прозрачные аналитические трековые мембраны АТМ на основе полиэтилентерефталата размерами пор от 2,5 до 4,0 мкм. Основной рекомендуемый диаметр фильтровальных дисков для ис-

[1)] Не является рекламой. Приведено для удобства пользователей (здесь и далее).

следования, применяемых в паразитологических лабораториях 142 мм, в зависимости от диаметра фритты фильтродержателя используемого фильтровального оборудования. Уплотнительные кольца в комплекте фильтров АТМ.

5.2.5 Предфильтры — капроновая сетка с ячейками 25 мкм, от 60 до 70 мкм.

5.2.6 Центрифуга лабораторная типа ОПН-3, ОПН-8, ЦЛС-31М, ОС-6М со сменным ротором или другие марки с аналогичными параметрами, обеспечивающие от 1500 до 3000 об/мин, позволяющие центрифугировать пробы воды в месте отбора в пробирках различного объема (10, 50, 150 $см^3$).

5.2.7 Посуда лабораторная стеклянная или пластиковая одноразового использования (химические стаканы, колбы, чашки Петри, цилиндры измерительные, ковши градуированные, пробирки центрифужные градуированные):

- воронки конические стеклянные разных объемов;
- пипетки стеклянные или одноразовые (типа Пастера);
- стекла покровные размером 24 × 24;
- кюветы из нержавеющей стали;
- горелка газовая или спиртовки;
- штативы лабораторные для пробирок и микропробирок;
- пластинки (диски) тонкие пластмассовые квадратные или круглые для переноса мембраны на лоток собственного или заводского изготовления;
- слайды типа SuperStick (предметные стекла): S100-1 (одно окно), S100-2 (два окна), S100-3 (три окна);
- буфер фосфатно-солевой моющий PBS 20× (pH = 7,4);
- флюорокраситель Стейн — 0,1 %-ный водный раствор калькофлюора белого;
- наборы готовые по Циль-Нильсену;
- ячейка влажности;
- термостат, поддерживающий рабочую температуру 37 °С и обеспечивающий градиент температуры в камере минус 1 °С;
- штатив наклонный для слайдов;
- наконечники для автоматических пипеток;
- пипетка градуированная от 1 до 5 $см^3$;
- вортекс лабораторный;
- ротатор лабораторный;
- таймер лабораторный;
- пробирки микроцентрифужные от 1,5 до 2,0 $см^3$ типа Eppendorf;
- штативы лабораторные для пробирок и микропробирок;
- штатив для микроцентрифужных пробирок;
- бальзам канадский (лак бесцветный);
- дозаторы пипеточные полуавтоматические с наконечниками.

5.2.8 Инструментарий металлический: пинцеты для работы с мембранными фильтрами.

Оборудование, необходимое для экстракции нуклеиновых кислот, описано в ГОСТ Р ИСО 21571—2014 (пункт А.3.1.6).

Для реализации метода с использованием ПЦР (и флуоресцентной детекции) помимо иного лабораторного оборудования необходимо оборудование, приведенное в ГОСТ ISO 20838—2014 (раздел 6); при флуоресцентной детекции результатов ПЦР применяют амплификатор с возможностью такой детекции (работе в режиме реального времени).

Оборудование для проведения электрофореза описано в ГОСТ ISO/TS 13136—2016 (пункт С.3.5).

Для реализации флотационного метода применяют насыщенный водный раствор семиводного сульфата цинка ($ZnSO_4$ $7H_2O$) или 30 %-ный водный раствор сахарозы.

Ареометры типа АОН с пределами измерения от 1,000 до 1,600 $кг/м^3$.

Кисти жесткие (из щетины) и мягкие (из волоса белки, колонка или соболя) для живописи № 12 — № 18.

Реактив Ковача коммерческий.

3 %-ная перекись водорода.

3 %-ный раствор КОН.

Реактивы или коммерческие наборы для определения цитохромоксидазы.

Реагенты, материалы расходные и реактивы химические диагностического набора для реализации метода иммуномагнитной сепарации в соответствии с инструкцией производителя.

Реагенты для экстракции нуклеиновых кислот описаны в ГОСТ Р ИСО 21571—2014 (пункты А.3.1.5.2—А.3.5.12, А.3.1.5.14—А.3.1.5.20, А.4.1.5, А.5.1.5).

Реагенты и расходные материалы для проведения ПЦР описаны в ГОСТ ИСО 21570—2009 (пункт А.1.5), за исключением того, что олигонуклеотиды должны соответствовать указанным в разделе 14 параметрам, и ГОСТ ISO 20838—2014 (раздел 5). Пробирки для проведения реакции должны соответствовать используемой модели амплификатора.

Реагенты и расходные материалы для электрофореза описаны в ГОСТ ISO/TS 13136—2016 (пункты С.3.5.12—С.3.5.14 и С.3.6.2—С.3.6.9).

Примечание — Допускается применение реагентов, реактивов, приготовленных согласно приведенной в настоящем стандарте рецептуре и расходных материалов, тест-систем и тест-наборов промышленного производства с аналогичными характеристиками, а также готовых реактивов и наборов промышленного производства, зарегистрированных и разрешенных к использованию в установленном порядке.

6 Приготовление и контроль питательных сред [1]

Для определения показателей микробиологического загрязнения воды при воспроизведении методов, указанных в настоящем стандарте используют следующие питательные среды: среда Эндо; полужидкая или жидкая с поплавком среда Гисса с глюкозой, полужидкая или жидкая с поплавком среда Гисса с лактозой, среда Эйкмана с глюкозой, среда Эйкмана с лактозой, лактозо-пептонная среда с борной кислотой, бульон Макконки, среда Кесслера, среда с Тергитолом 7 (лактозная среда с ТТХ и гептадецилсульфатом натрия), висмут-сульфит агар, среда Бонде; триптофановый бульон (среда 15), среда № 9 (Кинг А), цетримидный агар, азидная среда Сланец-Бартли, энтерококкагар, желчно-эскулин-азидная среда, селенитовый бульон, селенит-цистиновый бульон, щелочно-полимиксиновая среда, среда Раппапорта-Вассилиадиса, среда Мюллера—Кауфмана, хромогенные среды для определения колиформ, энтерококков и сальмонелл, ксилозо-лизин-дезоксихолатный (XLD) агар, XLT-4 агар, SS-агар, дезоксихолатный цитратный агар (Гинса), агар Плоскирева, висмут-сульфит агар, среды Ольксеницкого, Клиглера и Ресселя, мясо-пептонный агар, цетримидный агар, и другие среды, разрешенные к применению в установленном порядке.

Примечания

1 Допускается для повышения дифференцирующих свойств среды Эндо в готовую и охлажденную до температуры от 60 °С до 70 °С среду перед разливкой в чашки добавлять на 100 мл среды 0,2 мл 5 %-ного спиртового раствора основного фуксина. Срок хранения раствора фуксина — не более 1 мес.

2 Допускается в тех случаях, когда мембранные фильтры зарастают микрофлорой, не относящейся к бактериям кишечной группы, помимо фуксина добавлять на 100 мл среды Эндо 0,2 мл 5 %-ного спиртового раствора розоловой кислоты. Срок хранения раствора розоловой кислоты — не более 1 мес.

Допускается применение питательных сред, приготовленных согласно рецептуре и приведенных в ГОСТ 34786, ГОСТ 31955.1, ГОСТ 24849, а также применение коммерческих сухих и готовых питательных сред промышленного производства, зарегистрированных и разрешенных к использованию в установленном порядке.

При использовании коммерческих готовых или сухих питательных сред следует соблюдать способ приготовления, применения и сроки хранения, указанные изготовителем.

В качестве контрольных (эталонных) штаммов для проверки ростовых свойств и качества питательных сред используют тест-штаммы с типичными биохимическими свойствами из официально признанных коллекций микроорганизмов, отличающиеся генетической стабильностью и изученными фенотипическими характеристиками, в том числе чувствительностью к антибактериальным препаратам. В условиях лаборатории штаммы должны сопровождаться паспортом и храниться в соответствии с действующими санитарными правилами таким образом, чтобы возможность мутаций и контаминации культур была минимальной.

7 Общие требования к отбору, транспортированию, хранению проб

Санитарно-микробиологические и паразитологические исследования должны быть проведены в соответствии с требованиями санитарного законодательства по организации безопасности выполнения работ с патогенными биологическими агентами [2]. Отбор проб проводят специалисты, прошедшие обу-

чение на рабочем месте, которое включает ознакомление с инструкцией по отбору проб и практические занятия по отбору проб конкретных типов вод в соответствии с ГОСТ Р 59024—2020 (4.7).

7.1 Отбор проб на санитарно-микробиологические виды исследования

Посуда, применяемая для микробиологического исследования (пробирки, колбы, флаконы, чашки), в том числе для отбора проб, должна проходить соответствующую подготовку по ГОСТ Р 70152—2022 (6.1). Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую или многократного применения (предварительно обеззараженную) посуду с притертыми или завинчивающимися крышками. Посуда (емкости) для многократного использования должна быть изготовлена из материалов, выдерживающих обработку дезинфицирующими средствами.

Отбор и хранение проб проводят в соответствии с ГОСТ 31942 со следующими дополнениями:

- отбор проб в рекреационных и поверхностных водах, в местах купания допускается проводить у береговой линии ручным способом или с применением мобильных приборов с вакуумным фильтрованием в объеме 1 дм^3 в тех местах, где глубина водоема не менее 1—1,5 м;
- пробы сточной воды, допустимой к сбросу в поверхностные водные объекты, отбирают с соблюдением правил асептики в стерильную посуду стерильными средствами в специализированной одежде (в перчатках, масках, халатах или костюмах), обеспечивающей безопасность пробоотборщика. Допускается использовать любые устройства для отбора поверхностных и глубинных проб, за исключением тех приспособлений, которые не пригодны для стерилизации или фламбирования;
- при наличии плавучих средств (корабля, лодки, судна и т. п.) отбор проб проводят в середине водотока с подветренного борта, со стоящего на якоре плавучего средства — с носа;
- при отборе нескольких проб одним пробоотборным устройством (батометром) его каждый раз стерилизуют фламбированием;
- любые возможности загрязнения стерильных устройств для отбора проб за счет средств крепления (веревки, канаты, тросы) должны быть сведены к минимуму, например, при использовании проволоки из нержавеющей стали или цепочки на нижнем конце троса. После наполнения стерильные емкости закрывают пробкой и стерильным колпачком;
- при необходимости установления влияния глубоководного выпуска сточных вод на зону водопользования следует отбирать пробы с учетом того течения, которое определяют по направлению движения поплавка от места выпуска сточных вод.

Транспортировать пробы следует в сумках-холодильниках или в ящиках с термоизолирующей прокладкой при температуре от 4 °С до 8 °С, предохраняя от резких толчков, замерзания, действия солнечных лучей в течение 6 ч с момента отбора пробы. Если не представляется возможным создать условия транспортирования с охлаждением, то анализ проб следует провести в течение 2 ч после отбора.

7.2 Отбор проб на санитарно-паразитологические виды исследований

Отбор проб при проведении исследований данного вида выполняют в соответствии с ГОСТ Р 70151—2022 (5.7, 5.8, 5.9).

7.2.1 Отбор проб поверхностных и сточных вод с помощью фильтровальных приборов в полевых условиях непосредственно в точке забора

Отбор происходит в месте забора проб под вакуумом, создаваемым электронасосом. В качестве источника электропитания используют портативные электростанции-бензогенераторы. Все части фильтровальных приборов типа ПВФ (кроме электростанции) размещены на переносной раме. Объем воды, прошедшей через фильтровальный прибор типа ПВФ, контролируют с помощью стандартного механического счетчика воды. Перед началом фильтрации на фильтровальную ячейку укладывают мембранный фильтр типа АТМ или МФАС-СПА, предфильтр закрепляют в заборно-фильтровальном устройстве, подключают фильтровальную ячейку к электронасосу и водосчетчику, опускают заборно-фильтровальное устройство непосредственно в водоисточник. После прохождения 25 дм^3 воды через фильтровальный прибор электронасос отключают. Показания водосчетчика фиксируют в акте отбора; фильтры, через которые проводилось фильтрование исходной воды с помощью фильтровальных приборов непосредственно в месте отбора, помещают в широкогорлый флакон или стеклянную лабораторную емкость, добавляют исходной (исследуемой) воды с таким расчетом, чтобы вода покрывала поверхность фильтра, закрывают флакон или стеклянную лабораторную емкость с завинчивающейся или притертой крышкой.

8 Методы посева

Надлежащие условия проведения микробиологических и паразитологических исследований должны быть обеспечены проведением внутреннего лабораторного контроля в соответствии с ГОСТ Р 70152.

Для определения санитарно-микробиологических показателей в пробах поверхностных и сточных вод используют нижеприведенные методы исследований.

Перед посевом пробу тщательно перемешивают (стараясь не намочить пробку), край емкости фламбируют открытым пламенем, пробирки и чашки, подготовленные для посева, маркируют.

Посев осуществляют методом прямого поверхностного посева на агаризованные среды по 8.1, методом мембранной фильтрации по 8.2 и титрационным методом по 8.3. Рекомендуемые объемы для посева всех перечисленных санитарно-микробиологических показателей в зависимости от типа исследуемой воды представлены в приложении А.

8.1 Метод прямого поверхностного посева на агаризованные среды

Метод прямого поверхностного посева может применяться при определении нормируемых показателей в сточных водах и сильно загрязненной воде водоемов. На чашки с агаризованной питательной средой засевают пробы воды объемом 0,1 или 0,25 $см^3$, тщательно втирают шпателем до его полного впитывания.

При неизвестном уровне загрязнения исследуемой пробы следует использовать метод десятичных разведений. Разведения исследуемого образца пробы готовят непосредственно перед анализом в соответствии с ГОСТ Р 70152—2022 (12.1, 12.2).

Процедуру приготовления разведений продолжают по описанной схеме до получения суспензии с необходимой концентрацией исходного образца.

8.2 Метод мембранной фильтрации

8.2.1 Подготовка аппарата для фильтрования и фильтрация

Перед началом исследований фильтровальный аппарат и воронку смачивают 96 %-ным спиртом и фламбируют. После охлаждения воронку снимают, а на фритту кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр, поверх которого закрепляют воронку фильтровальной установки.

В воронку для фильтрования наливают отмеренный объем воды, затем создают разрежение и отфильтровывают содержимое воронки.

При фильтровании 1 $см^3$ пробы воды в воронку до внесения проб воды сначала наливают около 15 $см^3$ стерильной дистиллированной или водопроводной воды, а затем вносят анализируемую воду.

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

На одну чашку допускается помещать от двух до четырех фильтров (в зависимости от диаметра фильтров и чашки Петри) с условием, чтобы фильтры не соприкасались. Под каждым фильтром на дне чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, номера пробы и даты посева.

Оптимальным является использование фильтров диаметром 35 и 47 мм и чашек Петри диаметром 60 и 90 мм.

При посеве нескольких объемов из одной пробы воды фильтрование проводят через один аппарат для фильтрования без фламбирования. Вначале фильтруют меньшие, а затем большие объемы воды, используя для каждого объема отдельный фильтр.

8.2.2 Подготовка мембранных фильтров

Подготовку мембранных фильтров проводят в соответствии с рекомендациями производителя.

Проверяют мембранные фильтры в соответствии с ГОСТ Р 70152—2022 (5.12).

Рекомендуемые схемы посева воды из различных объектов при работе методом мембранной фильтрации приведены в приложении А.

8.3 Титрационный метод

Метод основан на посеве нескольких десятичных разбавлений пробы, в двух- или трехкратной повторности каждого разбавления, в жидкую среду обогащения, с последующим высевом из проби-

рок, где был отмечен положительный рост, на плотные дифференциальные среды. При необходимости выполняют дальнейшую идентификацию. Расчет результата проводят статистически по совокупности положительных посевов в жидкой среде по специальным таблицам НВЧ (наиболее вероятного числа), приведенным в приложении Б.

Рекомендуемые объемы для посева в зависимости от типа исследуемой воды представлены в приложении А.

При исследовании других объемов воды помимо 1; 0,1 и 0,01 $см^3$ для получения результата соответственно уменьшают или увеличивают НВЧ, указанное в таблице Б.1. Например, при исследовании объемов 10; 1 и 0,1 $см^3$ НВЧ уменьшают в 10 раз; при исследовании объемов 0,1; 0,01 и 0,001 $см^3$ НВЧ увеличивают в 10 раз; при исследовании объемов 0,01; 0,001 и 0,0001 $см^3$ НВЧ увеличивают в 100 раз и т. д. Результаты НВЧ, обозначенные в таблице Б.1 звездочками, не подлежат учету из-за того, что их вероятность ниже допустимого уровня. Такое исследование необходимо повторить.

Если при исследовании воды сделан посев более чем трех десятикратных объемов воды или разбавлений, то учитывают три таких последовательных объема, в последнем из которых получен один или несколько отрицательных результатов, например: 10 $см^3$ — в трех пробирках положительный результат; 1 $см^3$ — аналогично; 0,1 $см^3$ — положительный результат только в двух пробирках; 0,01 $см^3$ — отрицательный результат во всех трех пробирках. Учитывают объемы 1; 0,1 и 0,01 $см^3$.

Титрационный метод может быть использован:

- при отсутствии материалов и оборудования, необходимых для выполнения исследования методом мембранной фильтрации;
- при анализе воды с большим содержанием взвешенных веществ;
- в случае высокого бактериального загрязнения воды, препятствующего получению на фильтрах изолированных колоний.

Рекомендуемая схема посева воды из различных объектов при работе титрационным методом приведена в приложении А. Посев проводят в двух-трех параллельных рядах, учитывая при этом, что чем больше повторностей, тем выше точность получаемых результатов (см. приложение Б).

Использованные пипетки и наконечники погружают в рабочий раствор дезинфицирующего средства. Через требуемое время экспозиции согласно инструкции применяемого средства после обеззараживания многоразовые пипетки тщательно промывают проточной водопроводной водой, после чего промывают дистиллированной водой и высушивают.

После окончания исследования использованную лабораторную посуду с отработанным материалом обеззараживают.

После обеззараживания лабораторную посуду многократного применения моют с использованием соответствующих средств, не содержащих фосфаты, после чего тщательно промывают проточной водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают.

9 Методы определения санитарно-микробиологических показателей

9.1 Определение обобщенных колиформных бактерий в воде методом мембранной фильтрации [3]

В индикаторную группу обобщенных колиформных бактерий входят помимо общих колиформных бактерий еще и лактозоотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие глюкозу до кислоты и газа при температуре (37 ± 1) °С, в течение 24 ч.

Определение обобщенных колиформных бактерий выполняют на среде Эндо.

Примечание — При исследовании проб, содержащих большое количество посторонней микрофлоры, допускается использовать среду Эндо с селективными добавками в соответствии с примечаниями, приведенными в разделе 6.

Если на фильтрах выросли темно-красные, красные, с металлическим блеском или без него, с отпечатком на среде или без него, розовые, бордовые, а также бесцветные колонии, бесцветные колонии с розовым или красным центром, характерных для обобщенных колиформных бактерий выполняют оксидазный тест и делают окраску по Граму в соответствии с приложением В. Подсчитывают число колоний каждого типа, не изменивших цвет (оксидазоотрицательных), проводят пересев в полужидкие/жидкие среды Гисса с глюкозой. Исследуют не менее двух-трех колоний каждого типа. Инкубируют

посевы при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. Первичный учет возможен через 4 ч от момента посева. Учитывают в сумме те колонии, которые способны ферментировать глюкозу и образовывать кислоту и газ. При признаках проявления реакции, но не позднее чем 5 мин фильтр переносят обратно на среду Эндо и учитывают результат после четкого проявления реакции.

Допускается для соблюдения чистоты культуры перед пересевом в полужидкие/жидкие среды с глюкозой по две-три отобранные для идентификации колонии каждого морфологического типа рассеять методом истощающего штриха на сектора чашки со средой Эндо с дальнейшей инкубацией в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч. После оценки чистоты культуры выполняют тест на наличие цитохромоксидазы (см. В.3), а также выполняют окраску по Граму (см. В.4) или тест Грегерсена (см. В.5). Грамотрицательные, оксидазоотрицательные колонии пересевают в пробирки с жидкой или полужидкой средой Гисса с глюкозой. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч. Предварительный учет сбраживания глюкозы можно проводить через 4—5 ч от момента посева.

Изменение цвета среды и наличие признаков газообразования свидетельствуют о положительном результате.

Учету не подлежат пленчатые, губчатые колонии, с неровной поверхностью и краями, плесневые и другие колонии, не характерные для обобщенных колиформных бактерий.

Обобщенные колиформные бактерии можно определять также на хромогенных средах без дальнейшей идентификации бактерий.

В случае обнаружения оксидазаотрицательных, грамотрицательных, лактозоотрицательных розовых, бесцветных или бесцветных колоний с розовым или красным центром, ферментирующих глюкозу только до кислоты или до кислоты и газа, рекомендуется проверить их на принадлежность к патогенным бактериям рода *Salmonella* и *Shigella*.

Если все колонии оксидазоположительные или грамположительные, дают отрицательный ответ.

При необходимости посев на среде Эндо для определения обобщенных колиформных бактерии можно использовать для определения показателя *E.coli.*

Определение обобщенных колиформных бактерий может быть выполнено с применением сред на подложке (например, Петри-тесты или аналогичные) или метода время пролетной масс-спектрометрии с матрично ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) или с использованием автоматического бактериологического анализаторов в соответствии с инструкцией производителя.

Учет и выдачу результатов проводят согласно 9.4.

9.2 Определение общих колиформных бактерий в воде методом мембранной фильтрации

Определение общих колиформных бактерий выполняют на среде Эндо.

Примечание — При исследовании проб, содержащих большое количество посторонней микрофлоры, допускается использовать среду Эндо с селективными добавками в соответствии с примечаниями, приведенными в разделе 6.

Общие колиформные бактерии можно определять также на среде Тергитол-7, хромогенных или других аналогичных средах, разрешенных к применению в установленном порядке.

Учету на среде Эндо подлежат колонии типичные бордовые, темно-красные, красные, с металлическим блеском или без него, с отпечатком на обратной стороне фильтра и на среде. Выполняют оксидазный тест и тест на грам-принадлежность в соответствии с приложением В. Подсчитывают число оксидазоотрицательных, грамотрицательных колоний и производят их пересев в полужидкие/жидкие среды с лактозой. Исследуют не менее двух-трех колоний каждого типа. Инкубируют посевы при температуре (37 ± 1) °С в течение 44—48 ч. Первичный учет возможен через 24 ч. Суммируют колонии, которые способны ферментировать лактозу и образовывать кислоту и газ.

Учету не подлежат бесцветные, пленчатые, губчатые колонии, с неровной поверхностью и краями, плесневые и другие колонии, не характерные для общих колиформных бактерий.

Допускается перед началом постановки всех тестов для оценки чистоты культуры по две-три отобранные для идентификации колонии рассевать до отдельных колоний методом истощающего штриха на сектора чашки со средой Эндо и в пробирку или на чашку с питательным агаром с дальнейшей инкубацией в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч. После оценки чистоты культуры на среде Эндо выполняют тест с культурой на питательном агаре на наличие цитохромоксидазы (см. В.3), а также выполняют окраску по Граму (см. В.4) или тест Грегерсена (см. В.5). Грамотрицательные, оксидазоотрицательные колонии пересевают в пробирки с жидкой или полужидкой средой Гисса с лактозой.

Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 44—48 ч. Изменение цвета среды и наличие признаков газообразования свидетельствуют о положительном результате. Первичный учет возможен через 24 ч.

Все оксидазо- и грамотрицательные колонии, утилизирующие лактозу при температуре (37 ± 1) °С в течение 44—48 ч до кислоты и газа, относятся к общим колиформным бактериям.

Определение общих колиформных бактерий может быть выполнено с применением сред на подложке (например, Петри-тесты или аналогичные) или метода время пролетной масс-спектрометрии с матрично ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) или с использованием автоматического бактериологического анализаторов в соответствии с инструкцией производителя.

Учет и выдачу результатов проводят согласно 9.4.

9.3 Определение *E.coli* в воде методом мембранной фильтрации

К *E.coli* относятся грамотрицательные, оксидазоотрицательные палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах и ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре (44,0 ± 0,5) °С в течение 24 ч и образующие индол из триптофана на триптофановом бульоне при температуре (44 ± 0,5) °С в течение 24 ч. Также для *E.coli* характерно наличие фермента β-глюкуронидазы.

Определение *E.coli* выполняют на одной из селективных дифференцирующих лактозных средах (например, Эндо, Тергитол-7) или на хромогенных средах.

Мембранный фильтр помещают на одну из выбранных сред и инкубируют посевы при температуре (37 ± 1) °С в течение (21 ± 3) ч. При использовании среды Тергитол-7 для повышения селективных свойств среды инкубирование можно осуществлять при температуре (44 ± 0,5) °С в течение 18—24 ч.

На среде Эндо учету подлежат характерные темно-красные колонии с металлическим блеском или без него, с отпечатком на среде под фильтром. На среде Тергитол-7 подсчитывают колонии с желто-оранжевой, кирпично-красной окраской, иногда с ржаво-окрашенным центром, образующие желтый отпечаток на среде под мембраной.

Отбирают по две-три колонии каждого морфологического типа. проводят их дальнейшее подтверждение на принадлежность к бактериям *E.coli*. Определяют наличие цитохромоксидазы и грам-принадлежности (см. приложение В). Оксидазо- и грамотрицательные колонии пересевают в триптофановый бульон (среда № 15) и полужидкую среду Гисса с лактозой или лактозо-пептонную среду с борной кислотой с поплавком, инкубируют в термостате при температуре (44 ± 0,5) °С в течение 18—24 ч. После инкубации в пробирки с триптофановым бульоном добавляют две-три капли реактива Ковача для определения индола.

Допускается перед началом постановки всех тестов для оценки чистоты культуры отобранные для идентификации колонии рассеивать до отдельных колоний методом истощающего штриха на сектора чашки со средой Эндо и в пробирку или на чашку с питательным агаром с дальнейшей инкубацией в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч. После оценки чистоты культуры на среде Эндо или на питательном агаре выполняют тест на наличие цитохромоксидазы (см. В.3), окраску по Граму (см. В.4) или тест Грегерсена (см. Г.1) и другие подтверждающие тесты.

При использовании хромогенных сред цвет колоний *E.coli* будет соответствовать описанию производителя среды. Например, на среде Chromocult Coliformen Agar колонии *E.coli* будут фиолетового цвета, на среде HiChrome Coliform agar колонии *E.coli* будут бирюзового цвета.

При необходимости определение индола на хромогенных средах большинства производителей можно выполнять путем накапывания реактива Ковача непосредственно на колонию. Исключением являются среды усиленной формулы, ингибирующие аэромонады, такие как Chromocult Coliformen agar ES. На таких средах определение индола следует выполнять традиционным способом на средах с триптофаном.

Если на мембранном фильтре в течение (21 ± 3) ч и при инкубации не более 48 ч не обнаружен рост колоний или выросли нетипичные колонии, то в протоколе испытаний регистрируют следующее: «*E.coli* не обнаружена в 100 $см^3$».

Определение *E.coli* может быть выполнено с применением сред на подложке (например, Петритесты или аналогичные) или метода время пролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) или с использованием автоматического бактериологического анализатора в соответствии с инструкцией производителя.

Учет и выдачу результатов проводят согласно 9.4.

9.4 Учет результатов

В случаях исследования нормируемого объема и при отсутствии роста во всех посевах результат представляется как «не обнаружены в нормируемом объеме».

Когда в двух последовательных разведениях (при наличии серии разведений) получены значения, доступные для подсчета, вычисление результата проводят по формуле расчета средневзвешенной величины

$$C = \frac{Z}{V_s} \cdot V_n, \quad (1)$$

где C — количество КОЕ в объеме, регламентируемом нормативными документами для выдачи протокола;

Z — суммарное количество колоний, просчитанное в посевах во всех исследованных объемах, подлежащих учету;

V_s — суммарный исследованный объем, в котором проведен учет колоний;

V_n — объем, регламентированный нормативными документами для выдачи протокола.

9.4.1 Округление результата

Когда исследован весь нормируемый объем, результат представляется фактически полученной цифрой. При получении цифрового значения менее 1 результат округляется до первого знака после запятой.

При учете нескольких посеянных объемов и при вычислении среднего значения или исследовании объемов, меньше нормированных и при необходимости выполнения пересчета на определенную нормативным документом единицу измерения полученный результат округляют до второй значащей цифры. Если третье число менее 5, его заменяют нулем. Если последняя цифра равна или более 5, то ее заменяют нулем, а предшествующую цифру увеличивают на единицу.

9.4.2 Вычисление результата при проведении идентификации

При наличии колоний разного морфологического типа выполняют их идентификацию согласно используемой методике. После идентификации рассчитывают отдельно по каждому типу колоний количество целевых микроорганизмов из их общего числа на чашке по формуле

$$a = \frac{в}{A} \cdot C, \quad (2)$$

где a — рассчитанное количество микроорганизмов конкретного морфологического типа на чашке, идентифицированных как целевые;

$в$ — количество колоний, подтвержденных как целевые, из числа отобранных на идентификацию;

A — количество типичных колоний, отобранных на идентификацию;

C — общее количество типичных колоний данного морфологического типа на чашке.

Например, $в = 3$, $A = 5$, $C = 20$, тогда $a = 3/5 \cdot 20 = 12$.

Затем вычисляют суммарное количество целевых микроорганизмов всех морфологических типов на основе описанного расчета в исследованном объеме/на чашке.

Результат пересчитывают на нормируемый объем.

9.5 Титрационный метод определения в воде обобщенных и общих колиформных бактерий

Для определения в воде обобщенных колиформных бактерий титрационным методом нескольких децимальных разбавлений пробы (см. 8.3) в трехкратной повторности засевают в накопительную глюкозо-пептонную среду. Для определения в воде общих колиформных бактерий посев проводят в лактозо-пептонную среду, или среду Кесслера, или в бульон Макконки с поплавком. Например, анализируемую воду в объеме 100 см^3 вносят в объем 10 см^3 концентрированной глюкозо (лактозо)-пептонной среды; 10 см^3 анализируемой воды — в пробирки с 1 см^3 концентрированной глюкозо (лактозо)-пептонной среды; 1 см^3 пробы воды и 1 см^3 из разведений — в пробирки с 9 см^3 среды нормальной концентрации. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

Из посевов в среду накопления, в которых отмечены помутнение, образование кислоты и газа или только помутнение, проводят высев петлей на сектора среды Эндо, или хромогенные среды, или на поверхность сред на подложке с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии. Посевы на среде инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

Результат считают положительным при наличии в среде накопления помутнения и газообразования (при изменении цвета среды), а при высеве на подтверждающую среду рост типичных колоний.

Примечание — На среде Кесслера признаки образования кислоты отсутствуют. Среда не содержит индикатора и не меняет цвет. Рост общих колиформных бактерий, ферментирующих лактозу, сопровождается помутнением и газообразованием, о степени которого судят по подъему пузырька газа в поплавке. Рост бактерий, не ферментирующих лактозу, вызывает слабое помутнение среды без газообразования.

Идентификацию обобщенных или общих колиформных бактерий в высевах на плотные дифференциальные среды проводят:

- если в среде накопления имеет место сомнительная реакция (небольшое газообразование или только помутнение);
- если на плотных средах выросли колонии с недостаточно четкими дифференциальными признаками. В этом случае после снятия петлей подозрительных колоний подтверждают принадлежность этих колоний к грамотрицательным бактериям, выполняя окраску по Граму или тест Грегерсена, оксидазный тест и способность к образованию кислоты и газа при посеве 1—2 изолированных колоний каждого типа с каждого сектора на полужидкую среду с глюкозой с последующей инкубацией посевов при температуре (37 ± 1) °С в течение (21 ± 3) ч при определении обобщенных колиформных бактерий или в среду Гиса с лактозой при определении общих колиформных бактерий. Отрицательный ответ дают в том случае, если:
- в среде накопления отсутствуют признаки роста;
- на секторах среды Эндо (хромогенных средах или на поверхности сред на подложке) отсутствует рост;
- на секторах среды Эндо или на других использованных питательных средах (например, хромогенных средах или на поверхности сред на подложке) выросли не характерные для колиформных бактерий колонии (прозрачные, с неровными краями, расплывчатые);
- все колонии оказались оксидазоположительными;
- в подтверждающем тесте на среде с углеводом не отмечено газообразования.

В протоколе исследования записывают следующее: «не обнаружены в нормируемом объеме».

После определения положительных и отрицательных результатов на наличие обобщенных колиформных бактерий или общих колиформных бактерий в посевах исследуемых объемов воды в среду накопления вычисляют НВЧ КОЕ в объеме 100 см^3 по таблице Б.1 по соответствующей схеме посева (см. 8.3).

Допускается для реализации титрационного метода использовать тест-системы, основанные на технологии обнаружения бактериальных ферментов со специфическими субстратами (например, Colilert-18, системы Quanti-Tray 96 и 2000 или аналогичные) в соответствии с инструкцией производителя, разрешенных к применению в установленном порядке.

9.6 Титрационный метод определения в воде *E.coli*

Для определения в воде *E.coli* титрационным методом каждый объем воды или ее разведения засевают в накопительную среду (например, лактозо-пептонную среду с поплавком, среду Кесслера с поплавком, среду Макконки с поплавком или другие среды, разрешенные к применению) в трех повторностях (см. 9.6).

Учету подлежат те посевы в накопительной среде, в которых обнаружены помутнение/изменение цвета, кислота и газ, а при последующем высеве на среду Эндо (в т. ч. в среду Эндо с модификациями, см. примечания к разделу 6) выросли типичные, характерные для *E.coli*, темно-красные колонии с металлическим блеском и отпечатком на обратной стороне среды. Для подтверждения выбирают 2—3 типичные колонии с каждого сектора плотной среды, проводят для каждой среды окраску по Граму (можно использовать также тест Грегерсена по В.5) и оксидазный тест, засевают в пробирки со средой, содержащей триптофан для установления способности продуцировать индол, и на полужидкую среду с лактозой или в лактозный бульон с борной кислотой, посевы инкубируют при температуре (44 ± 0,5) °С. Положительный ответ на наличие в среде *E.coli* дают после инкубации посевов при помутнении и обра-

зовании газа. Подтверждение наличия продукции индола определяют одним из общепринятых методов (реактивом Ковача или Эрлиха, индикаторной полоской).

Оптимальным является высев на чашки с хромогенными средами или на среды подложки, что позволяет сократить исследование на 24 ч.

Допускается для реализации титрационного метода использовать тест-системы, основанные на технологии обнаружения бактериальных ферментов со специфическими субстратами (например, Colilert-18, системы Quanti-Tray 96 и 2000 или аналогичные) в соответствии с инструкцией производителя, разрешенных к использованию в установленном порядке.

9.7 Определение энтерококков [3]

9.7.1 Определение энтерококков в воде методом мембранной фильтрации

Определение энтерококков в воде может быть выполнено на среде Сланеца-Бартли, энтерококкагаре (среды с ТТХ и азидом натрия) или на аналогичных средах.

Посев осуществляют методом мембранной фильтрации по 8.2. Рекомендуемые объемы для посева в зависимости от типа исследуемой воды представлены в приложении А.

Учету подлежат розовые или бордовые колонии различных оттенков, равномерно окрашенные или с более темным центром.

Идентификация типичных колоний может быть осуществлена двумя способами:

а) мембранный фильтр с посевом перекладывают на поверхность желчно-эскулинового агара с азидом натрия для определения гидролиза эскулина в присутствии азида и инкубируют в термостате при температуре (44 ± 0,5) °С в течение 2 ч. После инкубации учитывают результат путем подсчета колоний, под которыми среда приобрела коричнево-черный оттенок;

б) выбирают по две-три колонии каждого типа; для каждой из выбранных колоний:

1) выполняют окраску по Граму (см. приложение Д) и микроскопируют. При обнаружении в мазках грамположительных полиморфных, как правило, слегка вытянутых с заостренными концами диплококков дают положительный ответ,

2) делают пересев на секторы на солевой агар с ТТХ и инкубируют посевы в течение 24—48 ч при температуре (37 ± 1) °С; кишечные энтерококки на среде дают равномерный нежный рост на протяжении всего штриха. Другие бактерии на этой подтверждающей среде не растут,

3) выполняют каталазный тест. Для этого петлей наносят каплю дистиллированной воды на предметное стекло, в котором растирают исследуемую культуру. После подсушивания на воздухе добавляют каплю 3 %-ной перекиси водорода. При отсутствии пузырьков газа считают тест каталазаотрицательным. В качестве контрольной каталазаположительной культуры используют любой вид стафилококков.

9.7.2 Определение энтерококков в воде методом мембранной фильтрации на хромогенных средах

Определение энтерококков в воде может быть выполнено на плотных хромогенных средах, представленных в таблице 1, или на аналогичных средах.

После инкубации проводят подсчет типичных колоний.

При необходимости подтверждения выросших колоний подсчет осуществляют по 9.7.1.

Таблица 1 — Параметры инкубации и характеристика колоний фекальных кишечных энтерококков на хромогенных питательных средах

Питательная среда	Инкубация посевов	Характер роста Колоний кишечных энтерококков	Рост посторонних бактерий (не учитывают)
Энтерококковый агар Chromocult	При температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч	Красные, темно-бордовые, диаметром от 0,5 до 2 мм и розовые	Бесцветные, сине-фиолетовые или бирюзовые колонии. Грамотрицательные бактерии не растут
KF Стрептококковый агар (KF Streptococcus Agar)	При температуре (37 ± 1) °С в течение 46—48 ч	Красные, розовые	Оранжевые, желтые, белые. Грамотрицательные бактерии ингибируются
Основа хромогенного агара для кишечных энтерококков (m-EI Chromogenic Agar Base)	При температуре (42 ± 1) °С в течение 18—24 ч	Синие, при добавлении в среду ТТХ красные	Колонии другого цвета не учитывают

Учет результатов проводят по 9.4.

9.7.3 Определение энтерококков в воде титрационным методом

Анализируемый объем воды и ее разведения засевают параллельно в три ряда накопительной щелочно-полимиксиновой среды или жидкой хромогенной среды. Рекомендуемые объемы для посева в зависимости от типа исследуемой воды представлены в приложении А.

Объемы 100 и 10 $см^3$ засевают в равные объемы среды двойной концентрации; 1 $см^3$ исследуемой воды или ее разбавления — в 10 $см^3$ среды нормальной концентрации. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С. Через 48 ч из тех посевов, в которых отмечены признаки роста (помутнение или помутнение и изменение цвета среды), проводят пересев на четыре—шесть секторов одной из плотных питательных сред МИС, энтерококкагар, среду Сланеца-Бартли или желчно-эскулиновый агар с азидом натрия. Плотные питательные среды инкубируют в течение 24—48 ч при температуре (37 ± 1) °С.

В качестве положительных результатов отмечают наличие аспидно-черных, выпуклых колоний с металлическим блеском, ровными краями (*Enterococcus faecalis*), а также мелких сероватых колоний (*Enterococcus faecium, Enterococcus durans*). На азидной среде Сланеца—Бартли и энтерококкагаре энтерококки образуют крупные выпуклые, темно-малиновые, розовые, светло-розовые, равномерно окрашенные или с темно-красным нечетко оформленным центром. Для подтверждения наличия энтерококков по две-три колонии каждого типа микроскопируют, выполняют каталазный тест и проверяют способность роста на солевом агаре с ТТХ.

Альтернативным способом подтверждения является пересев типичных колоний на желчно-эскулиновый агар с азидом натрия в виде макроколоний для определения гидролиза эскулина в присутствии азида. О гидролизе эскулина будет свидетельствовать потемнение среды под посевом и вокруг макроколонии.

При использовании жидких хромогенных сред проводят учет положительных результатов в соответствии с инструкцией производителя.

Вычисляют НВЧ в объеме 100 $см^3$ по таблице Б.1. В протоколе исследования указывают число НВЧ энтерококков в объеме 100 $см^3$ воды.

9.7.4 Ускоренный метод определения энтерококков в воде титрационным методом

Для накопления общих и обобщенных колиформных бактерий и одновременно энтерококков титрационным методом при анализе воды используют глюкозо-лактозо-пептонную среду. Сначала делают высев из глюкозо-лактозо-пептонной среды для определения общих и обобщенных колиформных бактерий, затем энтерококков. Из всех емкостей с глюкозо-лактозо-пептонной средой, в которых имелось помутнение, независимо от наличия или отсутствия газа делают высев со дна пробирки на сектора одной из сред (МИС, азидной среды или энтерококкагара) путем троекратного нанесения материала бактериологической петлей диаметром от 2 до 3 мм для посева штрихом. Среды инкубируют в течение 24 ч при температуре (37 ± 1) °С. Посев штрихом делают с таким расчетом, чтобы к концу штриха получить изолированные колонии, и оценивают результат по наличию роста характерного для каждой среды цвета колоний энтерококков, указанных в 9.7.1.

Вычисляют НВЧ КОЕ в объеме 100 $см^3$ по таблице Б.1. В протоколе исследования указывают НВЧ энтерококков в объеме 100 $см^3$ воды.

Допускается для определения энтерококков использование тест-систем, основанных на технологии обнаружения бактериальных ферментов со специфическими субстратами (например, Enterolert-DW, системы Quanti-Tray 96 и 2000 или аналогичные), которые применяют в соответствии с инструкцией производителя.

9.7.5 Качественный метод определения кишечных энтерококков с использованием селективных питательных сред (например, Readycult Enterococci 100) или хромогенных сред (качественный метод)

Анализ с использованием хромогенных сред (например, Readycult Enterococci 100 — селективная питательная среда для определения наличия/отсутствия кишечных энтерококков и D-стрептококков в 100 $см^3$ воды) проводят в соответствии с инструкцией производителя.

Посевы инкубируют в течение 18—24 ч при температуре (37 ± 1) °С.

После инкубации посевов проводят учет результатов следующим образом:

- бактерии кишечных энтерококков отсутствуют, если цвет среды не изменился или отмечено помутнение среды без изменения цвета;
- кишечные энтерококки обнаружены, если цвет среды изменился;

- при перемешивании цвет среды не должен изменяться. Изменение цвета среды даже в верхней части флакона также подтверждает наличие кишечных энтерококков в пробе воды (реакция с хромогенным субстратом X-GLU).

9.8 Определение бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

Рекомендуемые объемы для посева в зависимости от типа исследуемой воды представлены в приложении А.

9.8.1 Определение методом обогащения (качественный метод)

Качественный метод обнаружения *P.aeruginosa* основан на культивировании исследуемого образца в среде обогащения с дальнейшим высевом обогащенной смеси на селективные и/или дифференциально-диагностические плотные питательные среды, с последующей идентификацией выделенных штаммов по культуральным и биохимическим свойствам. Принцип обогащения основан на росте псевдомонад на средах с минимальной концентрацией питательных веществ.

В качестве среды накопления используют цитратную среду Бонде с кристаллическим фиолетовым, или среду Дрейка, или аналогичные. Среда Дрейка предпочтительнее для посева проб с низким содержанием биологического загрязнения, тогда как среда Бонде — для воды с более высоким уровнем биологического загрязнения. Допускается использование тест-наборов (например, Pseudolert), основанных на технологии обнаружения бактериальных ферментов со специфическими субстратами в соответствии с инструкцией производителя.

Перед посевом в жидкую среду обогащения образцы подвергают концентрированию методом мембранной фильтрации. Количество мембранных фильтров зависит от степени загрязненности образца. Фильтры со сконцентрированной пробой помещают в колбу, содержащую 100 $см^3$ выбранной среды обогащения.

Посев может быть осуществлен без использования мембранной фильтрации. Для этого в объемы пробы от 10 до 500 $см^3$ вносят от 1 до 50 $см^3$ десятикратного концентрата среды обогащения соответственно. Объемы от 1 $см^3$ и менее вносят в 10 $см^3$ среды однократной концентрации.

Инкубацию посевов осуществляют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч. Допустимо инкубировать посев сточных вод при температуре (42 ± 1) °С. Первичный учет проводят в течение (24 ± 2) ч.

При отсутствии помутнения и пленки на поверхности среды посевы инкубируют не более 48 ч.

Примечания

1 Высев на плотные селективные среды выполняют вне зависимости от наличия или отсутствия признаков роста, поскольку видимое помутнение появляется при концентрации бактерий, превышающей 10^7 КОЕ/мл.

2 Перед высевом на плотные селективные среды емкость с посевом не следует встряхивать. Посев выполняют из верхнего слоя среды.

При помутнении среды накопления и/или при образовании на поверхности тонкой прозрачной пленки проводят пересев на сектора цетримидного агара. Петлей забирают пленку с поверхности, посев проводят методом истощающего штриха для получения изолированных колоний. Посевы помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С на 48 ч, первичный учет — через 24 ч.

На цетримидном агаре бактерии вида *P.aeruginosa* могут образовывать плоские или плоско-выпуклые блестящие, или матовые колонии цвета среды (светло-салатные) или разных оттенков зеленого цвета с ровными или мелко-иссеченными краями. Под скоплениями колоний среда часто окрашивается в зеленый, салатовый или желтый цвета из-за образования пигментов феназинового ряда: пиоцианина и (или) флюоресцеина. Образование пигментов и степень их выраженности зависит от производителя и серии среды и может варьироваться в значительных пределах. Подтвердить образование флюоресцеина можно путем кратковременного облучения посевов ультрафиолетовой лампой Вуда с максимальным излучением на длине волны (360 ± 20) нм. Определение флюоресцеина носит вспомогательный характер, так как его образование не является видоспецифичным и выполняется в случае отсутствия пигмента пиоцианина.

Если на цетримидном агаре отмечается рост колоний, образующих сине-зеленый пигмент пиоцианин, результат анализа считают положительным.

Если отмечается рост только колоний, образующих пигмент флюоресцеин (определяется с использованием УФ-лампы), или колоний без пигмента, то по две-три колонии каждого морфологического типа пересевают в две пробирки: в одну — со скошенным питательным агаром, в другую — со скошен-

ной средой № 9. При большом количестве колоний, требующих идентификации, допускается их пересев на поверхность чашек Петри тех же сред, однако при таком способе посева пигментообразование может быть выражено хуже. На одной чашке Петри размещают не более 9—12 колоний. Посевы на среде № 9 инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч. Посевы на питательном агаре инкубируют при температуре (42 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

После инкубации вначале учитывают колонии, образующие сине-зеленый пигмент пиоцианин на среде № 9, проводят оксидазный тест и тест Грегерсена для определения грам-принадлежности (см. приложение Д).

Оксидазоположительные, грамотрицательные колонии, образующие пигмент пиоцианин, относят к виду *P.aeruginosa*.

При отсутствии пигментообразующих колоний для идентификации отбирают колонии, способные расти при температуре (42 ± 1) °С, для которых проводят оксидазный тест, тест Грегерсена, и определяют биохимические свойства, используя тест-системы для выявления неферментирующих бактерий (миниатюрные биохимические ряды, например API-системы) или аналогичные, предназначенные для ручной или автоматической идентификации.

Допускается использование тест-систем на основе колориметрического и флуоресцентного методов анализа с использованием тест-наборов, основанных на технологии обнаружения бактериальных ферментов со специфическими субстратами (например, Pseudalertt, системы Quanti-Tray 96 и 2000 или аналогичные) в соответствии с инструкцией производителя.

9.8.2 Определение методом мембранной фильтрации

Исследование, идентификацию и учет результатов проводят в соответствии с ГОСТ ISO 16266.

10 Определение патогенных бактерий рода *Salmonella* и рода *Shigella*

Для идентификации патогенных бактерий необходимо иметь набор сывороток Н-, О-антигенов для идентификации бактерии рода *Salmonella* и рода *Shigella*.

10.1 Определение патогенных бактерий рода *Salmonella* [3]

10.1.1 Качественный метод

Для определения *Salmonella* в пробах воды (кроме сточных вод до обеззараживания) качественным методом исследуют 1000 см^3 (1 дм^3) воды вне зависимости от степени ее бактериального загрязнения. Для этого засевают по 500 см^3 в две емкости с одной из сред накопления: среда с хлоридом магния (магниевую, магниевую в полевой модификации или среда Раппапорта—Вассилиадиса), селенитовый бульон, среда Мюллера—Кауфмана, среда РНС. Допускается использование стандартизованных коммерческих сред (например, среда Раппопорт—Вассилиадиса, селенит-цистиновый бульон или аналогичные), разрешенных к применению.

Примечания

1 Для приготовления магниевой среды накопления для выделения *Salmonella* в полевой модификации в стеклянную емкость, содержащую 500 см^3 анализируемой воды, вносят последовательно каждый ингредиент после полного растворения предыдущего: 19,5 г магния хлористого кристаллического; 4,0 г натрия хлористого; 0,8 г калия фосфорнокислого однозамещенного безводного; 25,0 см^3 10 %-ного раствора пептона; 11,0 см^3 жидкого дрожжевого экстракта; 2,5 см^3 бриллиантового зеленого 0,1 %-ного водного раствора.

2 Для выделения и идентификации *Salmonella* в 1000 дм^3 дистиллированной воды растворяют компоненты среды РНС: 5 г ЭКД (ФСП 42-0010-5883-04) или другого экстракта, соответствующего требованиям ФСП 42-0010-5883-04; 8,8 г калия фосфорнокислого однозамещенного; (1,4 ± 0,1) г натрия гидроксида; 0,005 г водорастворимого бриллиантового зеленого; 0,001 г водорастворимого кристаллического фиолетового. Готовую среду разливают во флаконы, стерилизуют при температуре 112 °С в течение 15 мин. Питательная среда представляет собой стерильную прозрачную жидкость зеленого цвета, pH среды от 6,4 до 6,8, содержание аминного азота должно быть в пределах от 0,05 % до 0,1 % согласно 6.9 [4]. Хранят среду РНС в холодильнике при температуре от 4 °С до 8 °С в течение 14 сут.

Качественный анализ сточной воды до очистки ввиду ее высокого бактериального антагонизма проводить не рекомендуется.

При исследовании проб с низкими уровнями контаминации возможно применение дополнительного этапа неселективного обогащения в забуференной пептонной воде.

Посев воды в магниевую среду накопления выполняют следующим образом: к 500 $см^3$ исследуемой воды прибавляют 500 $см^3$ магниевой среды обычной концентрации. При использовании в полевых условиях навески ингредиентов магниевой среды по одной вносят в исследуемый объем воды и тщательно взбалтывают до полного растворения солей.

При посеве воды в среду Раппапорта—Вассилиадиса в зависимости от степени бактериального загрязнения к 500 $см^3$ исследуемой воды прибавляют 500 $см^3$ среды обычной или двойной концентрации.

При посеве воды в среду Мюллера—Кауфмана 500 $см^3$ исследуемой воды вносят в среду приготовленной обычной концентрации.

При посеве воды в селенит-цистиновый бульон (приготовленной в соответствии с инструкцией производителя) к 500 $см^3$ воды добавляют 500 $см^3$ среды двойной концентрации.

При посеве воды в среду РНС 500 $см^3$ воды засевают в емкость, содержащую 500 $см^3$ питательной среды для накопления *Salmonella* или два объема по 250 $см^3$ — во флаконы объемом 250 $см^3$ питательной среды.

Качественный анализ можно выполнять с использованием метода мембранной фильтрации в среду селективного или неселективного обогащения. Требуемый объем пробы (500 $см^3$ для сред селективного обогащения и 1000 $см^3$ для среды неселективного обогащения) фильтруют через мембранные фильтры, количество которых зависит от степени загрязненности образца. Фильтры с концентрированной пробой, содержащие по 100 $см^3$ среды обогащения, помещают в колбу. При затрудненной фильтрации большого объема пробы воды на фильтр с диаметром пор 0,45 мкм следует наложить фильтр с большим диаметром пор для задержания взвешенных частиц. После окончания фильтрации оба фильтра помещают в среду накопления.

Посевы воды в среде накопления инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч. Для повышения селективности допускается инкубация в средах селективного обогащения при температуре (42 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

При использовании этапа предобогащения в неселективной среде после инкубации в забуференной пептонной воде делают пересев по 1 $см^3$ в две пробирки, содержащие 10 $см^3$ выбранных сред селективного обогащения.

Инкубацию посевов в селективных средах выполняют согласно требованиям настоящего пункта.

10.1.2 Количественный метод бактерий рода *Salmonella*

Количественный анализ *Salmonella* проводят титрационным методом, который основан на накоплении бактерий при посеве определенного объема воды в питательную среду, в соответствии с объемами, необходимыми для расчета по таблицам Хоскинса-Мура (см. приложение Б).

Объем исследуемой пробы для посева и количество повторов выбирают в зависимости от предполагаемой степени ее бактериального загрязнения.

Для обнаружения *Salmonella* используют не менее двух сред накопления по нижеприведенным схемам (целесообразно использовать РНС- и магниевую среду).

Допускается использование стандартизованных коммерческих сред (RVS broth, Selenite cystyne broth или аналогичных), разрешенных к применению в установленном порядке.

При исследовании воды поверхностных водоемов проводят посев двух объемов по 100 $см^3$, двух объемов по 10 $см^3$, двух объемов по 1 $см^3$ и по два объема из разведений от 10^{-1} до 10^{-3}. Если предполагается значительное загрязнение водоема, ряд разведений может быть продолжен до 10^{-4}.

При исследовании воды поверхностных водоисточников, используемых для централизованного водоснабжения населения, можно производить посев следующим образом: один объем по 500 $см^3$; один объем по 50 $см^3$; пять объемов по 5 $см^3$; пять объемов по 0,5 $см^3$ в одну среду накопления и аналогичные объемы в другую. Если предполагается значительное загрязнение водоема, ряд разведений может быть продолжен до 10^{-4}. НВЧ рассчитывают в соответствии с таблицей Б.1.

При этом 100 $см^3$ воды засевают во флаконы со 100 $см^3$ среды двойной концентрации, 10 $см^3$ в пробирки с 10 $см^3$ среды двойной концентрации, 1 $см^3$ и разведения в пробирки с объемом 9 $см^3$ среды накопления нормальной концентрации.

Для обнаружения *Salmonella* в сточных водах используют не менее двух сред накопления по следующим схемам:

- при исследовании сточных вод до очистки засевают: два объема по 1 $см^3$ и два объема из разведений от 10^{-1} до 10^{-7};
- сточных вод после очистки — два объема по 100 $см^3$, два объема по 10 $см^3$, два объема по 1 $см^3$ и два объема из разведений от 10^{-1} до 10^{-3};

- 100 $см^3$ сточных вод до очистки и после биологической очистки до обеззараживания засевают в равное количество среды накопления удвоенной концентрации, 10 $см^3$ сточной жидкости — в 100 $см^3$ среды нормальной концентрации, 1 $см^3$ стока и последующие разведения вносят в 10 $см^3$ среды нормальной концентрации;

- после обеззараживания сточную воду исследуют по схеме посева поверхностных водоемов, увеличивая количество разведений до 10^{-4}.

Посевы воды в среде накопления инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (22 ± 2) ч. НВЧ проводят в соответствии с таблицей Б.1.

10.1.3 Выделение бактерий рода *Salmonella* из среды накопления на плотных селективно-дифференциальных средах

Определяют наличие признаков роста бактерий в средах накопления через (24 ± 2) ч инкубации посевов. Из каждой среды селективного обогащения, где отмечено равномерное помутнение, проводят высев на две плотные селективно-дифференциальные среды для выделения *Salmonella* одним из способов для получения изолированного роста колоний. С этой целью можно использовать висмут-сульфитный агар, хромогенные среды, ксилозо-лизин-дезоксихолатный (XLD) агар, дезоксихолатный цитратный агар, XLT-4 агар, SS-агар и другие среды, разрешенные для применения.

Примечание — На среде XLT-4 агар полностью подавляется рост протея.

Засеянные емкости со средой накопления без наличия признаков роста оставляют при температуре (37 ± 1) °С в течение не более (46 ± 2) ч, после чего делают высев на две плотные селективно-дифференциальные среды, а посевы без признаков роста считают отрицательными, и дальнейшему исследованию они не подлежат.

Просмотр посевов проводят через (24 ± 2) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С на плотной селективно-дифференциальной среде и отбирают колонии, подозрительные относительно наличия *Salmonella*. При отсутствии подозрительных колоний чашки с селективными средами оставляют в термостате еще на (20 ± 2) ч. При отсутствии подозрительных на предмет наличия колоний *Salmonella* через (46 ± 2) ч дают окончательный отрицательный ответ.

На висмут-сульфитном агаре *Salmonella* растут в виде аспидно-черных колоний с металлическим блеском участка среды вокруг колонии — так называемое «зеркало», и черным отпечатком под колонией. На средах разных производителей морфология колоний может отличаться. Цвет колоний может варьировать от светло-серого до черного, а вместо металлического блеска вокруг колоний может появляться темный ореол. Наличие выраженного отпечатка под колонией является наиболее стабильным признаком.

Исключение в этом отношении составляют *S.paratyphi A*, некоторые *Salmonella* из группы С и других групп, которые при росте на висмут-сульфитном агаре образуют нежные зеленоватые колонии с темным центром и без него, слегка выпуклые с ровными краями.

На агаре Плоскирева *Salmonella* образуют прозрачные или нежно-розовые колонии.

На хромогенном агаре (РАМБАХ-агар) колонии *Salmonella* окрашены в пурпурный цвет; микроорганизмы, не являющиеся *Salmonella*, имеют синий цвет или не окрашиваются ни одним из хромогенов среды. Колиформные бактерии растут в виде сине-зеленых или сине-фиолетовых колоний. Остальные энтеробактерии (*Shigell*, *Proteus*) и грамотрицательные бактерии, такие как *Pseudomonas*, вырастают в виде бесцветных или желтоватых колоний.

На ксилозо-лизин-дезоксихолатном агаре (среде XLD) *Salmonella* образуют колонии красного цвета с черным центром за счет образования сероводорода.

На дезоксихолатном цитратном агаре колонии *Salmonella*, образующие сероводород, темные.

На XLT-4 агаре колонии *Salmonella* бесцветные с выраженным черным центром. Под одиночными колониями среда желтеет, под скоплениями — краснеет.

На SS-агаре *Salmonella* образуют желтоватые колонии с черным центром.

10.1.4 Идентификация бактерий рода *Salmonella* по биохимическим и антигенным свойствам

Для подтверждения выросших колоний к роду *Salmonella* проводят идентификацию по биохимическим и серологическим тестам.

10.1.4.1 Биохимические свойства

При обнаружении на чашках колоний, подозрительных на предмет наличия *Salmonella*, по две-три изолированных колонии с каждой чашки снимают для посева в пробирки с комбинированными среда-

ми для определения биохимических свойств бактерий, подтверждающих их принадлежность к роду *Salmonella* (типа Ресселя, Клиглера, Олькельницкого и др.).

Примечания

1 Параллельно колонии можно снять на фенилаланин, что позволит, как только появится видимый рост на скошенной поверхности, капнуть хлорное железо. Положительная реакция позволяет уверенно исключить протей.

2 Параллельный пересев колоний на среду XLT-4 также позволяет исключить протей, который на данной среде не растет.

На вышеперечисленных комбинированных средах бактерии рода *Salmonella* ферментируют глюкозу с образованием газа, не ферментируют лактозу и сахарозу, не образуют индол, ферментируют маннит и дульцит, образуют сероводород, не гидролизуют мочевину. В случае ферментации глюкозы реакция среды становится кислой и цвет индикатора в столбике изменяется. Если при расщеплении глюкозы помимо кислоты образуется газ, в среде появляются пузырьки. Появление желтой окраски в скошенной части агара свидетельствует о ферментации лактозы (и сахарозы) в среде Олькеницкого и ферментации лактозы в среде Клиглера и Ресселя. Образование сероводорода устанавливают по почернению среды.

При росте культуры, гидролизирующей мочевину, среда приобретет диффузный яркий красно-малиновый цвет, что характерно для бактерий рода протеев. Культуры, не расщепляющие лактозу и мочевину, но ферментирующие глюкозу, образующие сероводород, подвергают дальнейшему изучению для определения серовара с определением серологических свойств.

Для определения родовой принадлежности культур допускается использование тест-систем биохимической идентификации для биохимической дифференциации по специфическим белкам (например, Lachema, API 20E, Rapid 20E, ID 32E, Densi-La-Meter, BioMerieux или аналоги), разрешенных к применению приборов и автоматических анализаторов в соответствии с нормативными документами или инструкцией производителя.

При выполнении качественного анализа выдается заключение: «Патогенные бактерии рода *Salmonella* в 1 дм^3 обнаружены». При проведении количественного исследования анализ продолжают.

10.1.4.2 Антигенные свойства

Следующим этапом идентификации *Salmonella* является изучение более устойчивой антигенной структуры в реакции агглютинации на стекле с О-, Н- и Vi- агглютинирующими диагностическими сыворотками.

При серологической идентификации культур вначале определяют их принадлежность к виду *Salmonella enterica* с поливалентной сывороткой *Salmonella enterica* (A, B, C, D, E), в случае получения отрицательного результата проводят агглютинацию с сыворотками редких групп.

На этом этапе может быть следующее заключение: «Обнаружены бактерии вида *Salmonella enterica* A-, B-, C-, D-, E-групп/(не A-, B-, C-, D-, E-групп) в 1 дм^3».

Если культура агглютинируется одной из поливалентных О-сывороток, то определяют характерные для каждой серологической группы О-антигены (соматические), а затем жгутиковые Н-антигены, которые представлены двумя фазами — Н1 и Н2.

Для проведения агглютинации используют диагностические сальмонеллезные сыворотки, адсорбированные для РА, лиофилизат для диагностических целей согласно инструкции по применению.

На обезжиренное предметное стекло пипеткой наносят три-четыре капли различных сывороток. Петлю исследуемой в течение 18—24 ч культуры, снятой с питательного агара, вносят в одну из сывороток и тщательно размешивают ее путем растирания круговыми движения петли. После каждой сыворотки петлю прожигают на огне. Для агглютинации с О-сыворотками культуру следует брать с верхней части скошенного питательного агара, для агглютинации с Н-сыворотками — из конденсационной воды, в которой расположены наиболее подвижные особи. Предварительно культуру контролируют на отсутствие спонтанной агглютинации. Для этого ее растирают в капле физиологического раствора. Положительная реакция агглютинации наступает в течение 1—3 мин. Для учета агглютинации используют лупу с увеличением (2×) по четырехкрестной системе:

«++++» — отчетливый агглютинат при полном просветлении жидкости;

«+++» — отчетливый агглютинат на фоне мутноватой жидкости;

«++» — незначительный агглютинат на фоне мутной жидкости;

«+» — незначительное количество агглютината на фоне мутной жидкости;

«-» — гомогенная мутная жидкость.

Положительной считают реакцию агглютинации интенсивностью не менее чем на +++.

В некоторых случаях исследуемая культура обладает свойствами неспецифически выпадать в осадок в физиологическом растворе или агглютинировать во всех или практически всех групповых О-сыворотках. Это происходит при переходе культуры из S-(гладкой) в R-(шероховатую) форму. Штаммы, находящиеся в R-форме, обладают самопроизвольной агглютинацией. Их дальнейшее серотипирование не представляется возможным без дополнительных манипуляций. Такие штаммы пересевают на слабощелочной агар для того, чтобы выбрать колонию с ровными краями возвратить штамм в S-форму и повторить агглютинацию.

При определении Н-антигенов нередко возникают трудности, связанные с отсутствием, выявляемым при агглютинации, одной из фаз. Для восстановления той или иной фазы Н-антигена применяют метод Свен—Гарда. Для этого к полужидкому (0,8 %) агару добавляют гомологичную сыворотку, т. е. ту, с которой культура дает агглютинацию. Сыворотку добавляют из расчета пять капель на 30 $см^3$ агара. Гомологичная сыворотка задерживает рост клеток с выявленной фазой и способствует развитию элемента противоположной фазы.

Серологическая классификация *Salmonella* представлена в схеме Кауфмана-Уайта, которая является каталогом диагностически значимых антигенов *Salmonella.*

10.1.5 Учет результатов

При выполнении качественного анализа выдается ответ: «Патогенные бактерии рода *Salmonella* в 1 $дм^3$ обнаружены» или «Обнаружены бактерии вида *Salmonella enterica* A, B, C, D, E группы в 1 $дм^3$».

При выполнении количественного анализа наиболее вероятную величину индекса патогенных бактерий рода *Salmonella* НВЧ в 1 $дм^3$ (1000 $см^3$) воды определяют по таблицам Хоскинса—Мура (см. приложение Б).

В протоколе исследования указывают «число НВЧ патогенных бактерий рода *Salmonella* в 1 $дм^3$ воды».

10.2 Определение патогенных бактерий рода *Shigella* [3]

10.2.1 Выполнение исследования определение бактерий рода *Shigella* культуральным методом

Для выявления *Shigella* используют две накопительные среды: селенит-цистиновый бульон и селективный бульон для бактерий рода *Shigella*, приготовленные по ГОСТ 32010.

Посев в среды селективного обогащения выполняют методом мембранной фильтрации. Исследуемый объем пробы (1000 $см^3$) фильтруют по 500 $см^3$ через мембранные фильтры, количество которых зависит от степени загрязненности образца. Фильтры с сконцентрированной пробой, содержащие по 100 $см^3$ среды обогащения, помещают в колбу. Фильтры с сконцентрированной пробой, содержащие по 100 $см^3$ каждой из сред обогащения, — в две колбы.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч. После инкубации посевов при наличии признаков роста (помутнение среды) из каждого флакона делают высевы на две чашки со средой: XLD агар, ЭМС (агар с эозиновым метиленовым синим), среду Плоскирева (далее — бактоагар Плоскирева) с антибиотиками, *Salmonella*/*Shigella* агар (SS агар), среду Эндо.

Посевы помещают в термостат дном вверх при температуре (37 ± 1) °С и инкубируют в течение 18—24 ч.

10.2.2 Учет результатов

Типичные колонии бактерий рода *Shigella* вырастают:

- на ксилозо-лизин-дезоксихолатном (XLD) агаре — в виде красных колоний;
- на агаре ЭМС — в виде круглых, прозрачных нежных, бесцветных колоний. Колонии *Shigella sonnei* более плотные, иногда белесоватые, с изрезанными краями;
- на агаре Плоскирева — в виде бесцветных прозрачных нежных колоний, слегка возвышающихся над поверхностью агара (*Shigella flexneri*). Колонии *Shigella sonnei* иногда бывают белесоватые, приобретающие через 48 ч слегка розовый оттенок;
- на *Salmonella*/*Shigella* агаре, на средах Эндо — в виде круглых бесцветных или слегка розоватых колоний.

При обнаружении на чашках колоний, подозрительных на *Shigella*, по две-три изолированные колонии с каждой чашки снимают для посева в пробирки с комбинированными средами для определения биохимических свойств бактерий, подтверждающих их принадлежность к роду *Shigella* (типа Клиглера, Олькельницкого и др.). Параллельно выполняют посев уколом в столбик полужидкого агара для определения подвижности.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

На вышеперечисленных комбинированных средах ферментируют глюкозу без образования газа (*S.flexneri* VI серотипа может давать слабое газообразование из глюкозы), не ферментируют лактозу и сахарозу, не образуют сероводород, не гидролизуют мочевину.

Все *Shigella* неподвижны, поэтому при посеве в столбик полужидкого агара бактерии рода *Shigella* растут только по ходу укола, столбик среды остается прозрачным.

Примечание — Выполнение теста на оксидазу позволяет исключить бактерии вида *Plesiomonas shigeloides*, которые обладают аналогичными с бактериями рода *Shigella* свойствами, но положительны по цитохромоксидазе.

Для определения родовой принадлежности выделенных культур допускается использование тест-систем по биохимической идентификации (например, Lachema, API 20E, Rapid 20E, ID 32E, Densi-La-Meter, BioMerieux» или аналоги), разрешенных к применению на территории России приборов и автоматических анализаторов в соответствии с нормативными документами или инструкцией производителя.

При необходимости выполняют серологическую идентификацию выделенных колоний.

При выявлении *Shigella* дают положительный ответ «бактерии рода *Shigella* обнаружены в 1 дм^3».

11 Определение колифагов в воде методом прямого посева [3]

В основе методики определения лежит способность колифагов инфицировать бактериальную культуру *E.coli* и формировать зоны лизиса («бляшки») на бактериальном газоне штамма-хозяина на питательном агаре при температуре (37 ± 1) °С через (21 ± 3) ч.

Определение колифагов прямым методом заключается в посеве нормируемого объема (100 см^3) пробы или ее децимальных разбавлений в чашки Петри и последующего подсчета всех выросших бляшек на газоне *E.coli* K-12F+Str^R с питательным агаром.

11.1 Подготовка тест-культуры *E.coli* K-12F+Str^R

Выполнение данного исследования начинается с подготовки тест-культуры — *E.coli* K-12F+Str^R. На всех этапах исследования используют бактериальную взвесь, приготовленную следующим образом: *E.coli* K-12F+Str^R засевают в пробирку со скошенным питательным агаром со стрептомицином. Возможен посев *E.coli* K-12F+StrRв пробирку со скошенным питательным агаром без стрептомицина при предварительном подтверждении чистоты пересеваемой культуры по морфологическим и биохимическим свойствам согласно паспорту штамма, выдаваемого из коллекции. Через (21 ± 3) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С проводят смыв бактерий со скошенного питательного агара стерильным физиологическим раствором и по стандарту мутности готовят взвесь *E.coli* K-12F+Str^R в концентрации 10^9 бактериальных клеток в объеме 1 см^3.

Если заранее культуру приготовить невозможно, то используют 4-часовую бульонную культуру, выросшую при температуре (37 ± 1) °С. Количество бактериальных клеток $1 \cdot 10^9$ будет содержаться примерно в 3—4 см^3 бульонной культуры.

11.2 Выполнение исследования

Объем воды для посева выбирают в зависимости от степени ее загрязнения с таким расчетом, чтобы на чашках диаметром от 90 до 100 мм образовалось до 200 БОЕ, а на чашках диаметром от 140 до 150 мм — до 300 БОЕ, без сливных зон.

При посеве на чашку Петри 1 см^3 или соответствующих десятикратных разбавлений применяют питательный агар в обычной прописи, при посеве 15 см^3 и более исследуемой воды — питательный агар двойной концентрации. В зависимости от плотности используемого агара проводят посевы воды по 10 см^3 на 10 чашек диаметром от 90 до 100 мм или по 20 см^3 чашек на пять чашек диаметром от 140 до 150 мм. При применении чашек диаметром от 140 до 150 мм используется питательный агар однократной концентрации.

Для освобождения исследуемой воды от сопутствующей бактериальной флоры ее обрабатывают хлороформом из расчета 1 см^3 хлороформа на 10 см^3 воды. Пробу тщательно встряхивают и отстаивают в течение 15 мин при комнатной температуре для осаждения хлороформа. На исследование отбирают воду над хлороформом.

Примечание — При использовании хлороформа следует пользоваться исключительно стеклянной посудой.

Альтернативным способом деконтаминации образца является мембранная фильтрация через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (шприцевую насадку). Пробу по 1; 5; 10 или 20 $см^3$ фильтруют непосредственно в чашки Петри, используя шприц объемом 20 $см^3$ или более.

Требуемый объем деконтаминированной пробы вносят в стерильные чашки Петри нужного диаметра. При посеве объемов от 10 до 20 $см^3$ чашки с внесенным образцом выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 10—15 мин.

В питательный агар, расплавленный и остуженный до температуры (49 ± 2) °С, добавляют смыв *E.coli* Ki2F+Str-r из расчета 1,0 $см^3$ смыва на каждые 100 $см^3$ агара и перемешивают.

В чашки диаметром 90 мм вносят 25 $см^3$ питательного агара однократной или двойной концентрации в зависимости от посевного объема пробы; в чашки диаметром 140—150 мм — 100 $см^3$ однократной концентрации. Чашки с застывшим агаром помещают дном вверх в термостат и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (21 ± 3) ч.

11.3 Учет результатов

Просмотр посевов осуществляют в проходящем свете. При исследовании всего нормируемого объема (100 $см^3$) воды подсчитывают и суммируют все бляшки, образовавшиеся на чашках Петри. Если посевная доза менее 100 мл, то количество колифагов X вычисляют по формуле

$$X = \frac{a \cdot 100}{V}, \quad (3)$$

где a — сумма бляшек на чашках;

V — объем исследуемой воды.

При исследовании децинормальных разведений количество колифагов X в объеме 100 $см^3$ воды вычисляют по формуле

$$X = \frac{a \cdot p_1 + a \cdot p_2 + a \cdot p_3}{3} \cdot 100, \quad (4)$$

где a — сумма бляшек на чашке;

p_1, p_2, p_3 — разведения;

3 — количество разведений (в данном примере их 3 — p_1, p_2, p_3).

Результаты выражают в БОЕ на 100 $см^3$ пробы воды. В контрольной чашке бляшки должны отсутствовать. Предварительный учет результатов можно проводить через (6 ± 1) ч инкубации. На этом этапе при наличии четких зон лизиса может быть выдан предварительный ответ о присутствии колифагов в воде. Окончательный количественный учет прямого посева проводят через (21 ± 3) ч. Результаты выражают количеством БОЕ на 100 $см^3$ пробы воды. Если отмечен сливной рост бляшек и счет затруднителен, то по данным прямого посева может быть выдан качественный результат: «Обнаружено в 100 $см^3$ воды».

При наличии зон лизиса в контрольной чашке результат исследования считают недействительным.

11.4 Постановка контролей

Цель выполнения отрицательного контроля — подтверждение отсутствия контаминации фагом питательных сред, лабораторной посуды, оборудования на этапах подготовки и проведения анализа, а также позволяет оценить способность тест-культуры *E.coli* давать равномерный газон. Отрицательным контролем служит исследование стерильной водопроводной воды, проводимое аналогично анализируемой пробе воды. С этой целью в зависимости от посевной дозы исследуемой воды в стерильную чашку Петри вносят от 1 до 20 $см^3$ стерильной водопроводной воды, заливают смесью мясопептонного агара с *E.coli* и инкубируют (18 ± 2) ч при температуре (37 ± 1) °С. В случае обнаружения бляшек колифагов в чашках с «отрицательным» контролем результаты исследования всей серии проб воды недействительны.

Следует проверить стерильность лабораторного оборудования, посуды, питательных сред, а также повторить контрольный посев на лизогенность тест-штамма *E. coli* K12 F+Str-r.

Для проверки культуры на лизогенность необходимо использовать новую пробирку с культурой, хранящейся на полужидком агаре. В стерильную чашку Петри помещают 1 мл бактериальной взвеси и заливают расплавленным и остуженным до температуры (49 ± 1) °С питательным агаром, инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (21 ± 3) ч. Просмотр посевов осуществляют в проходящем свете. Наличие зон лизиса в контрольном посеве свидетельствует о спонтанно проявившемся свойстве культуры продуцировать фаги или контаминации ее колифагом в процессе работы. Использование в работе лизогенной культуры запрещается. Необходимо получить новую лиофилизированную культуру.

11.5 Подтверждение фаговой природы лизиса

В случае обнаружения на чашках сомнительных бляшек или артефактов следует провести исследование на подтверждение фаговой природы лизиса.

С этой целью бактериологической петлей извлекают участок агара, подозрительный на колифаги, помещают его в питательный бульон объемом от 3 до 5 $см^3$, добавляют каплю тест-культуры *E.coli* K-12F+Str^R и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (21 ± 3) ч. В полученную взвесь вносят 0,5 $см^3$ хлороформа (процедуру проводят в вытяжном шкафу), перекрывают резиновой пробкой, интенсивно встряхивают и через 15 мин после осаждения хлороформа исследуют надосадочную жидкость на наличие колифага. Деконтаминацию посева допускается осуществлять при помощи шприцевых фильтров-насадок с диаметром пор 0,45 мкм. Высев деконтаминированнной пробы выполняют пипеткой или бактериологической петлей на питательный агар. Наличие четких характерных для фага зон лизиса на поверхности агара подтверждает фаговую природу лизиса.

При необходимости проведения комиссионных испытаний полученную взвесь можно хранить в холодильнике при температуре (6 ± 2) °С в течение года.

12 Санитарно-паразитологические методы исследований [3]

12.1 Метод осаждения

Применяют для проб сточной воды, а также природной, в которой содержится большое количество взвесей.

В емкости с отобранной пробой добавить один из нижеприведенных коагулянтов.

12.1.1 Медь (II) сернокислую 5-водную добавляют в количестве от 0,5 до 0,6 г/$дм^3$, тщательно перемешивают и дают отстояться от 40 до 50 мин до осветления надосадочной жидкости. Далее удаляют надосадочную жидкость, осадок в зависимости от объема помещают в пробирку или центрифужный стакан, доливают доверху дистиллированной водой и отправляют в центрифугу в течение 5 мин при скорости от 1500 до 2000 об/мин.

Далее надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют необходимое количество (около 3—20 $см^3$) 3 %-ного раствора соляной кислоты до полного растворения хлопьев коагулянта, размешивают и доводят доверху дистиллированной водой.

После отправляют в центрифугу в течение 5 мин при скорости от 1500 до 2000 об/мин и сливают надосадочную жидкость. Если в пробе содержится много взвесей, следует продолжить отмывку до прозрачной надосадочной жидкости.

12.1.2 Карбонат кальция: в емкости с пробой из расчета на 1 $дм^3$ добавляют 100 $см^3$ раствора кальция хлористогодвухводного (дигидрат хлорида кальция) 1 М и 100 $см^3$ раствора гидрокарбоната натрия 1 М. Закрывают крышки емкостей и, по возможности, интенсивно перемешивают. Дают отстояться при комнатной температуре не менее 4 ч, но не более 24 ч.

После осаждения хлопьев осторожно (без взбалтывания осадка) удаляют способом сифонирования надосадочную жидкость, оставив над осадком от 4 до 5 см воды.

Добавляют достаточное количество (от 100 до 200 $см^3$) 10 %-ного раствора сульфаминовой кислоты для полного растворения хлопьев. Интенсивно перемешивают содержимое емкостей и переливают в центрифужные флаконы.

Добавляют (200 ± 20) $см^3$ 0,01 %-ного раствора Tween 20 в каждую емкость, в которой находилась проба, энергично встряхивают, ополоскивают и также переносят в центрифужные флаконы.

Контролируют значение pH содержимого центрифужных флаконов. Оно должно составлять от 6,0 до 6,5 ед. pH во избежание повторного образования хлопьев. Для доведения pH до нужного значения используют раствор гидроксида натрия 1 Н.

Устанавливают центрифужные флаконы в центрифугу и запускают ее при максимальном ускорении 7200*g* в течение 12 мин без торможения во время фазы замедления. Непосредственно после окончания центрифугирования извлекают центрифужные флаконы из центрифуги и осторожно удаляют надосадочную жидкость способом сифонирования, оставив над осадком от 1 до 2 см воды.

Энергично встряхивают флаконы и переносят осадок в пробирку. Используя промывалку, добавляют (20 ± 2) $см^3$ 0,01 %-ного раствора Tween 20 в центрифужные флаконы для извлечения остатков пробы, перемешивают и переносят в пробирку.

Доводят объем дистиллированной водой и запускают процесс центрифугирования при ускорении 1100*g* в течение 15 мин без торможения во время фазы замедления, при наличии такой технической возможности, а затем сливают надосадочную жидкость. Если в пробе содержится много взвесей, следует продолжить отмывку до прозрачной надосадочной жидкости.

Далее добавляют в пробирку дистиллированную воду и проводят фильтрование полученной суспензии.

12.2 Флотационный метод исследования

12.2.1 Приготовление флотационных растворов

Для получения насыщенного водного раствора семиводного сульфата цинка необходимо растворить 500 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в 800 мл кипящей дистиллированной воды, после охлаждения измерить плотность раствора с помощью ареометра, которая должна быть не менее 1,25—1,26 $г/см^3$.

Для получения 30 %-ного водного раствора сахарозы необходимо 300 г сахарозы растворить в 1 л горячей дистиллированной воды, после охлаждения измерить плотность раствора с помощью ареометра, которая должна быть не менее 1,25—1,26 $г/см^3$.

12.2.2 Ход исследования

Пробу воды фильтруют через мембранные фильтры типа МФАС или прозрачные АТМ. Весь полученный смыв с мембранных фильтров или после концентрации химическими реактивами центрифугируют в пробирках емкостью 10 мл и более в течение 5 мин при оборотах в диапазоне от 1500 до 2000 об/мин. Затем осторожно сливают надосадочную жидкость, добавляют 2 %-ный водный раствор формалина (или дистиллированной воды) и размешивают. Затем суспензию повторно центрифугируют в течение 5 мин при оборотах в диапазоне от 1500 до 2000 об/мин и осторожно удаляют надосадочную жидкость. Добавляют один из флотационных растворов по 11.1.1 в соотношении 1:3 (одна часть осадка и три части флотационного раствора) и тщательно перемешивают. Центрифугируют в течение 5 мин при оборотах в диапазоне от 1500 до 2000 об/мин в замедленном торможении центрифуги (при наличии такой технической возможности). Затем осторожно собирают пипеткой надосадочную жидкость и переносят в чистую центрифужную пробирку, разбавляя не менее четырех раз дистиллированной водой, центрифугируют в течение 5 мин при оборотах в диапазоне от 1500 до 2000 об/мин, затем осторожно сливают надосадочную жидкость. Из осадка готовят препараты на предметных стеклах и микроскопируют под покровным стеклом при увеличении объектива 10×—40×, окуляр 10×. Для исследования на цисты лямблий микропрепараты окрашивают 1 %-ным раствором Люголя.

12.3 Метод последовательной фильтрации через систему прозрачных аналитических трековых мембран

Предварительно на заборно-фильтровальное устройство прибора для фильтрования крепят предфильтр. АТМ с диаметром пор 4,0 мкм помещают на фритту фильтродержателя прибора для фильтрования, укладывают предфильтр с размером пор 25,0 мкм и уплотняют уплотнительным кольцом. Для плотного (без складок) прилегания АТМ к фритте мембрану смачивают дистиллированной водой и плотно укладывают на фритту фильтродержателя. После фильтрации обе мембраны последовательно по одной осторожно снимают пинцетом с фритты фильтродержателя на заранее подготовленные тонкие пластмассовые квадратные пластинки размером 150 × 150 мм (поставка в комплекте с АТМ) и переносят в лоток.

Профильтрованную в отдельную емкость пробу воды повторно фильтруют, используя АТМ с диаметром пор 2,5 мкм, которую укладывают на фритту фильтродержателя между двумя уплотнительными кольцами из полиэтилена или обрезиненного лавсана (поставляются в комплекте с АТМ).

При использовании прибора для фильтрования типа ПВФ-142Б(К) с двумя фильтровальными ячейками АТМ с диаметром пор 4,0 мкм и одну АТМ с диаметром пор 2,5 мкм размещают в одном фильтродержателе для последовательного фильтрования. На верхнюю фритту фильтродержателя прибора для фильтрования помещают АТМ с диаметром пор 4,0 мкм и предфильтр с размером пор 25,0 мкм, на нижнюю фритту фильтродержателя через вкладыш (входит в состав фильтродержателя) помещают АТМ с диаметром пор 2,5 мкм. Обе мембраны уплотняют кольцами из полиэтилена или обрезиненного лавсана (поставляются в комплекте с АТМ).

После фильтрации АТМ осторожно снимают пинцетом с фритты на пластиковый диск, который должен быть помещен в лоток. Со всех трех фильтров аккуратно и тщательно, придерживая диск с АТМ пинцетом за край, производят смыв осадка с обеих поверхностей АТМ и с пластиковых дисков, на которых эти фильтры лежали. Смыв проводят плоской, средней жесткости кисточкой в лоток с дистиллированной водой. При этом периодически споласкивают АТМ и диски дистиллированной водой из химического стакана. Общий объем дистиллированной воды при смыве осадка со всех трех фильтров не должен превышать объем от 300 до 500 $см^3$.

Полученный концентрированный смыв сливают из лотка в воронки прибора для фильтрации типа ПВФ-35Б или ПВФ-47Б и фильтруют через АТМ с диаметром пор 2,5 мкм. После фильтрации АТМ осторожно снимают пинцетом с фильтродержателя (фритты) фильтровального прибора и переносят на предметное стекло, предварительно обработав его 50 %-ным раствором глицерина (для этого на поверхность предметного стекла наносят одну-две капли 50 %-ного раствора глицерина и стеклянной палочкой распределяют по всей поверхности тонким слоем), затем сверху АТМ наносят каплю 1 %-ного раствора Люголя и накрывают всю поверхность мембраны покровными стеклами размером 24 × 24 мм.

Микроскопируют препарат при следующих увеличениях: окуляр 7× или 10×; объектив 10×; для идентификации яиц и личинок гельминтов и исследования на цисты лямблий — объектив 40×.

Исследование полученного концентрата на яйца, личинки гельминтов и цисты патогенных простейших проводят, применяя микроскопию АТМ на стеклах, как описано выше, или используя флотационный или другие методы выделения и видовой идентификации паразитарных патогенов.

После фильтрации пробы воды через прозрачную АТМ диаметром пор 2,5 мкм на фильтровальном приборе или при получении концентрированного смыва АТМ тщательно высушивают в лотке на воздухе при комнатной температуре.

Затем АТМ фиксируют в смеси Никифорова или в этаноле 96 % 5 мин.

После фиксации мембрану вновь тщательно высушивают в лотке на воздухе и затем окрашивают фильтр АТМ в кювете (лотке, чашке Петри) по Циль—Нильсену (для окрашивания могут применять специально для этого предназначенные готовые комплекты реагентов) в течение 20 мин.

После окраски фильтры промывают.

Далее проводят обесцвечивание (дифференцируют) 5 %-ным раствором серной или соляной кислоты в течение 10 с и снова промывают.

Дополнительно окрашивают 0,2 %-ным водным раствором метиленового синего (входит в состав готового набора по Циль—Нильсену промышленного приготовления) или 5 %-ным раствором малахитовой зелени (приготовленным на 10 %-ным этиловом спирте) в течение 3—5 мин, после чего промывают под струей проточной воды. Фильтры после промывания переносят в кювету (лоток) и высушивают на воздухе при комнатной температуре. Сухой окрашенный фильтр (АТМ) помещают на предметное стекло, предварительно смазанное тонким слоем иммерсионного масла (для надлежащей адгезии), накрывают покровным стеклом и микроскопируют под иммерсией при увеличении микроскопа: окуляр 10×, объектив 90× или 100×.

Результат окрашивания: ооцисты криптоспоридий окрашиваются в разные оттенки ярко-красного (малинового, вишневого) цвета и имеют вид округлых образований диаметром от 5 до 6 мкм с отчетливо видимой оболочкой и структурированным содержанием (можно наблюдать наличие четырех веретенообразных темноокрашенных спорозоитов) на синем (сиреневом) или зеленом основном фоне.

12.4 Учет результатов окрашивания

Микроскопии подлежит весь объем полученного осадка пробы с учетом всех паразитарных патогенов и с определением их видовой принадлежности. Полученное количество патогенов соответствует их количеству в объеме исследованной пробы.

12.5 Люминесцентная микроскопия для выявления цист и ооцист паразитарных простейших

12.5.1 Окраска препаратов для последующей люминесцентной микроскопии

Метод основан на окрашивании препаратов, приготовленных из концентрированного осадка воды (см. 7.2.1), специальным красителем, молекулы которого под действием ультрафиолета возбуждаются, начинают испускать кванты света в длинноволновой области и создают цветное свечение ооцист криптоспоридий, при этом достигаются высокая степень контрастности светящихся объектов на темном фоне, значительно большая площадь поля зрения.

Мазки для люминесцентной микроскопии готовят из концентрированного осадка после обработки материала детергентом (синтетические ПВА) с последующим отмыванием и центрифугированием. Перед нанесением предварительно сконцентрированной пробы на предметное стекло необходимо добиться нейтрального значения pH (6,8—7,0). С этой целью осадок нейтрализуют несколькими каплями 1М раствора соляной кислоты или 1М едкого натра (в зависимости от метода обработки материала), тщательно встряхивают и с помощью лабораторного pH-метра определяют уровень pH (оптимально 6,8) осадка. В качестве контрастирующего красителя может быть применен краситель типа Флюоро-Стейн или аналогичные красители с такими же характеристиками.

Примечание — Приготовление раствора соляной кислоты 1М — по ГОСТ 25794.1—83 (2.1), приготовление раствора едкого натра 1М по ГОСТ 25794.1—83 (1.4).

12.5.2 Подготовка к окрашиванию флюорохромными красителями

Промывание мазков в процессе окраски следует проводить только дистиллированной водой.

В случае невозможности проведения немедленной микроскопии окрашенные мазки рекомендуется сохранять, прикрыв черной бумагой во избежание ослабления флюоресценции.

При окраске мазков необходимо избегать неполного обесцвечивания и не делать толстых мазков, так как это затрудняет обесцвечивание и фиксацию мазка на стекле.

Примечание — При окраске флюорохромными красителями не допускается подогревать мазки и пользоваться накладками из фильтровальной бумаги.

12.5.3 Окраска препаратов для световой микроскопии по методу Циль—Нильсена для определения ооцист криптоспоридий

Метод окраски по Циль—Нильсену[1)] (для окрашивания могут применяться специально для этого предназначенные готовые комплекты реагентов промышленного приготовления) основан на использовании нескольких специальных методических приемов: окраска фуксином (с подогреванием) — при одновременном воздействии нагревания и сильного протравливающего действия карболовой кислоты повышается способность красителя проникать в цитоплазму цисты (ооцисты) и особенно в структуры ее клеточной стенки; обесцвечивание (3 мин) — при последующей обработке препарата 25 %-ным раствором серной кислоты или 3 %-ным раствором солянокислого спирта приводит к обесцвечиванию красителя, проникшего в структуры, которые после обесцвечивания остаются окрашенными в малиново-красный цвет; контрастирующая окраска (1 мин) — обесцвеченные элементы препарата докрашивают метиленовым синим для придания контрастности препарату.

12.5.3.1 Фиксация препарата

Полученный концентрированный смыв после фильтрации питьевой воды или «висячую каплю» из осадка пробы поверхностной воды наносят тонким слоем на предметное стекло и высушивают при комнатной температуре в вытяжном шкафу.

Фиксацию препарата проводят одним из нижеприведенных способов.

Пинцетом или специальными щипцами берут за боковые концы препарат и три раза медленно проводят через верхнюю треть пламени спиртовки или газовой горелки до исчезновения признаков запотевания стекла. Общая продолжительность пребывания препарата в пламени не должна превышать 3—5 с. Затем стекла помещают на специальную подставку («рельсы») для окрашивания.

Предметные стекла с мазками раскладывают на жестяные или эмалированные подносы и помещают в сушильный шкаф, где сначала высушивают при температуре от 35 °С до 38 °С. Затем темпера-

---

[1)] Приготовление раствора краски по Циль—Нильсену: фуксин основной для микробиологических целей чистый 2 г растворяют в 12 см^2 спирта этилового технического 96 %-ного по ГОСТ 17299—78; 5 г фенола по ГОСТ 23519—93 растворяют в 50 см^3 дистиллированной воды; сливают вместе растворы фуксина и фенола (карболовый фуксин), доливают дистиллированной водой до 100 см^3 и тщательно перемешивают.

туру повышают до 100 °С — 105 °С и спустя 10 мин шкаф выключают. При таком методе достигается надежное прикрепление материала к стеклу.

Высушенные и фиксированные мазки должны незамедлительно окрашиваться.

12.5.3.2 Процедура окраски

Препараты помещают на подставку («рельсы») таким образом, чтобы они не касались друг друга и расстояние между ними составляло порядка 1 см, а маркировка (номер) была (был) направлена (направлен) в одну сторону.

На каждое стекло накладывают полоску фильтровальной бумаги так, чтобы она полностью закрывала мазок.

Наливают на бумагу раствор карболового фуксина с избытком и нагревают препарат над пламенем горелки до легкого появления паров. При подогревании препарата следят за тем, чтобы краска не закипела, а фильтровальная бумага не высыхала. Подогретый препарат оставляют на 5 мин для его полного прокрашивания.

Пинцетом снимают и удаляют фильтровальную бумагу.

Осторожно смывают остатки краски слабой струей дистиллированной воды до тех пор, пока не прекратится видимое отхождение краски. При промывании препаратов следует использовать холодную воду или воду комнатной температуры.

Перед тем как нанести на стекло следующий раствор, щипцами или пинцетом берут каждое стекло за маркированный конец и наклоняют для того, чтобы с него стекла вода; это предотвращает разбавление следующего реактива.

Препарат обесцвечивают 3 мин одним из обесцвечивающих растворов, полностью покрывая всю поверхность мазка.

Тщательно промывают дистиллированной водой и докрашивают в течение не более 1 мин (при этом не следует превышать экспозицию) 0,3 %-ным раствором метиленового синего.

Вновь аккуратно промывают проточной водой, наклоняя каждое стекло для того, чтобы стекала вода.

Высушивают на открытом воздухе при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

Примечание — Не следует промокать препарат.

Препарат исследуют с масляной иммерсией в световом микроскопе.

Ооцисты криптоспоридий окрашиваются в разные оттенки ярко-красного (малинового, вишневого) цвета и имеют вид округлых образований диаметром от 5 до 6 мкм с отчетливо видимой оболочкой и структурированным содержанием (можно наблюдать наличие четырех веретенообразных темно-окрашенных спорозоитов) на синем (сиреневом) или зеленом фоне.

13 Исследование воды на цисты лямблий и ооцисты криптоспоридий методом иммуномагнитного разделения и мечения флуоресцирующими антителами

Метод предназначен для определения специфических антигенов простейших цист лямблий и ооцист криптоспоридий в исследуемой пробе: выявлении одного из антигенов либо одновременно обоих.

Метод представлен двухэтапной реакцией, при которой обнаружение искомого антигена в комплексе антиген-антитело (АГ—АТ) происходит с помощью иммуномагнитной суспензии (для выделения ооцист криптоспоридий и цист лямблий соответственно).

Примечание — Возможно применение диагностических наборов, в состав которых могут входить контрастирующие вещества, например метящий раствор 4′,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI). Все изменения в проведении реакции регулируются в соответствии с инструкцией по применению диагностического теста.

Метод проводят с применением реактивов, реагентов и расходных материалов в соответствии с инструкцией производителя, в том числе слайды типа SuperStick (предметные стекла): S100-1 (одно окно), S100-2 (два окна), S100-3 (три окна); фосфатно-солевой моющий буфер PBS 20X (pH = 7,4); магнитный штатив MagnetOn 4T; магнитная ручка SepPen; наконечники для магнитной ручки; флюоро-Стейн (краситель) — 0,1 %-ный водный раствор калькофлюора белого.

Исследование состоит из нескольких этапов и процедур.

13.1 Подготовка проб воды к исследованию

После фильтрации воды осадок с фильтров смывают в 10 $см^3$ дистиллированной воды, переливают в центрифужную пробирку и центрифугируют 10 мин при скорости 1500 об/мин. Удаляют надосадочную жидкость и осадок исследуют. При этом осадок должен быть не более 1 $см^3$. Ресуспендировать осадок в 3 $см^3$ дистиллированной воды. Если получился больший объем осадка, его необходимо ресуспендировать в большем объеме дистиллированной воды и далее обрабатывать как две и более порции одной пробы.

Примечание — Все иммунореагенты и буферные растворы диагностического набора перед использованием выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре.

13.2 Процедуры связывания и промывки цист лямблий и ооцист криптоспоридий

Пипеткой Пастера, предварительно смоченной элюирующим буфером, переносят исследуемую пробу (в объеме 3 $см^3$) в ИМС-пробирку с плоской стенкой, промывают центрифужную пробирку два раза, внося по 1 $см^3$ дистиллированной воды и собирая смывы в пробирку ИМС с исследуемой пробой. Общий объем раствора в пробирке составит 5 $см^3$. Затем вносят 5 $см^3$ концентрированного буфера для иммуномагнитной сепарации из диагностического набора в пробирку с ресуспендированным осадком, закрывают пробирку крышкой и переворачивают пробирку три раза, перемешивают весь объем иммуномагнитных суспензий, специфичных к ооцистам криптоспоридий и к цистам лямблий диагностического набора на вортексе в течение 20 с, отбирают дозатором из каждого флакона по 100 мкл (0,1 $см^3$) суспензии и переносят ее в пробирку ИМС, в которой уже находится порция пробы, подлежащей исследованию. Закрепляют пробирку ИМС, закрытую крышкой, в штативе лабораторного ротатора и перемешивают в течение 1 ч при скорости 18 об/мин. Извлекают пробирку ИМС из ротатора и помещают ее в магнитный штатив (например, MagnetOn 4T или аналог), при этом плоская сторона пробирки должна быть обращена к магниту штатива и плотно к нему прилегать. Осторожно наклоняют пробирку примерно на 90 градусов вместе с магнитным штативом по направлению от дна к крышке пробирки (плоской стороной пробирки — вниз, к столу) и наоборот в течение 3 мин (не следует переворачивать пробирку с магнитным штативом). По мере движения на плоской стороне пробирки ИМС будет образовываться осадок (налет). Не вынимая пробирку ИМС из магнитного штатива, открывают крышку и осторожно сливают надосадочную жидкость из пробирки, при этом не повредив осадок (налет), сформировавшийся на плоской стороне пробирки ИМС. В пробирку добавляют 480 мкл моющего буфера. Удаляют пробирку из штатива, осторожно вращая пробирку, смывают осадок с плоской стороны пробирки (промывка стенки пробирки с использованием пастеровской пипетки также необходима). Помещают в пробирку ИМС магнитную ручку (например, SepPen или аналог) и собирают магнитную суспензию на наконечнике ручки, осторожно перемешивая содержимое пробирки в течение примерно 1 мин.

Удаляют из пробирки ИМС магнитную ручку, переворачивая ее, нажимают на кнопку ручки, чтобы убрать магнитный сердечник из наконечника. В пробирку типа Eppendorf (объемом от 1,5 до 2 $см^3$) помещают пипеточным дозатором 1 $см^3$ моющий буфер (например, Grab Buffer B или аналог) и переносят ранее собранную суспензию, вращая наконечник ручки в растворе буфера (при этом магнит убран из наконечника нажатием кнопки ручки). При этом наконечник можно не сбрасывать и использовать в дальнейших процедурах. В пробирку ИМС добавляют 480 мкл моющего буфера (например, Grab Buffer B или аналог). Осторожно вращая пробирку, смывают в раствор осадок с плоской стороны пробирки (промывка стенки пробирки с использованием пастеровской пипетки также необходима). Помещают в пробирку ИМС магнитную ручку и собирают магнитную суспензию на наконечнике ручки, осторожно перемешивая содержимое пробирки в течение примерно 1 мин. Удаляют из пробирки ИМС магнитную ручку, переворачивая ее, нажимают на кнопку ручки, чтобы убрать магнитный сердечник из наконечника ручки. Переносят собранную суспензию в пробирку типа Eppendorf с первой порцией смыва, вращая наконечник ручки в растворе буфера (при этом магнит убирают из наконечника нажатием кнопки ручки). Процедуры повторяют.

Затем устанавливают микроцентрифужную пробирку типа Eppendorf в магнитный штатив. Аккуратно покачивают штатив с пробиркой вручную, поворачивая его примерно на 180 градусов, от крышки пробирки к ее дну. Продолжают покачивание в течение 1 мин. Оставляют штатив вместе с пробиркой в покое на 20 с в вертикальном положении. Не вынимая микроцентрифужную пробирку типа Eppendorf из магнитного штатива, открывают крышку и сливают моющий буфер из пробирки, добавляют в пробирку 1 $см^3$ новой порции моющего буфера, при этом не повредив осадок (налет) на стенке пробирки со стороны магнита.

13.3 Процедуры диссоциации

Готовят рабочий раствор 2-меркаптоэтанола в концентрации 1:700, при этом к 0,1 $см^3$ 0,1Н соляной кислоты добавляют 7 $см^3$ дистиллированной воды. Не вынимая микроцентрифужную пробирку типа Eppendorf из магнитного штатива открывают крышку и сливают моющий буфер из пробирки, затем добавляют в пробирку 100 мкл рабочего раствора 0,1Н соляной кислоты и перемешивают полученную суспензию на вортексе в течение 50 с. Помещают микроцентрифужную пробирку типа Eppendorf в термостат или водяную баню при температуре 50 °С на 5 мин. Перемешивают суспензию в микроцентрифужной пробирке типа Eppendorf на вортексе в течение 30 с, затем устанавливают эту пробирку в магнитный штатив на 15 с, не вынимая из магнитного штатива, отбирают супернатант и переносят его на предметное стекло SuperStick для последующего иммунофлуоресцентного мечения [при этом осадок (налет) остается на стенке пробирки и не исследуется]. Во второе окно предметного стекла вносят каплю положительного контроля (взвесь с цистами лямблий и ооцистами криптоспоридий — Positive control: *G. lamblia*, *C. Parvum*). Перед началом процедуры мечения концентраты проб и контроль, нанесенные на предметное стекло, необходимо подсушить в слабом токе теплого (не горячего) воздуха или с помощью специального устройства для подсушки слайдов. Не допускается перегрев предметного стекла. Время сушки составляет приблизительно 20—30 мин.

13.4 Процедура детекции (идентификации) ооцист криптоспоридий и цист лямблий методом иммунофлюоресцентного мечения

По одной капле (около 45 мкл) иммунореагента (например, AquaGlo G/C или аналог) вносят в каждую лунку предметного стекла (например, SuperStick или аналог), на котором находятся предварительно подсушенная проба и контроль. При необходимости с помощью аппликатора или стеклянной палочки распределяют иммунореагент по всей поверхности лунки, не касаясь поверхности самой лунки. Рабочий раствор иммунореагента предварительно разведен из концентрата, поэтому, когда его вносят на поверхность лунок, дальнейших разведений не требуется.

Примечание — Из представленного в диагностическом наборе концентрированного иммунореагента готовят рабочий раствор путем разбавления концентрата буфером DB в 20 раз.

Пример — Если для работы нужен готовый рабочий раствор иммунореагента объемом 1 $см^3$, смешивают 50 мкл концентрированного 20Х иммунореагента (например, AquaGlo G/C или аналог) с 950 мкл разбавляющего буфера, входящего в этот диагностический набор. Если нужно получить 20 $см^3$ готового иммунореагента, смешивают 1 $см^3$ концентрированного 20Х иммунореагента с 19 $см^3$ разбавляющего буфера, входящего в этот диагностический набор. Хранить рабочее разведение иммунореагента необходимо при температуре 4 °С.

Затем предметные стекла помещают в ячейку влажности в темноте и инкубируют не менее 30 мин при температуре 37 °С или не менее 40 мин при комнатной температуре (допускается более длительное время инкубации). Наносят от 50 до 100 мкл фосфатно-солевого буфера в каждую лунку предметного стекла (например, SuperStick или аналога) и выдерживают 2 мин. Аккуратно с лунок предметного стекла удаляют излишек жидкости (с помощью фильтровальной бумаги по ГОСТ 12026—76 или пастеровской пипетки), при этом избегают перемешивания пробы.

13.5 Процедура мечения

Для снижения неспецифической флуоресценции и выделения фона для лучшего наблюдения яблочно-зеленой флуоресценции цист *G. lamblia* и ооцист *C. parvum* необходимо нанести по одной капле контрастирующего красителя в каждую лунку предметного стекла и выдержать 1 мин при комнатной температуре. Для этого наносят одну каплю фосфатно-солевого моющего буфера (PBS) в каждую лунку и выдерживают 1 мин при комнатной температуре. Аккуратно с лунок предметного стекла (например, SuperStick или аналога) удаляют излишек жидкости (с помощью фильтровальной бумаги или пастеровской пипетки), при этом избегают перемешивания пробы. Затем раскладывают предметные стекла на наклонном штативе и подсушивают в слабом токе теплого воздуха. Наносят одну каплю монтирующей среды в каждую лунку предметного стекла, накрывают лунки покровным стеклом, края можно заклеить канадским бальзамом и микроскопируют под масляной иммерсией на люминесцентном микроскопе либо на микроскопе, оснащенном насадкой «ОптиЛюм».

Примечание — Меченые препараты необходимо хранить в темном месте при температуре (5 ± 3) °С. Не допускается замораживания меченых препаратов. Меченые препараты могут храниться в течение 72 ч и более от выполнения мечения до окончательного завершения исследования и подтверждения результатов исследований.

13.6 Люминесцентная микроскопия

Проводят исследования препаратов не менее чем при 100-кратном общем увеличении на наличие яблочно-зеленой флюоресценции, микроскопируя все поля зрения лунки предметного стекла. Перед началом микроскопии меченых препаратов необходимо предварительно просмотреть лунку с положительным контролем.

Если в образце обнаружены сверкающие и флюоресцирующие яблочно-зеленым светом объекты — от округлых до овальных (8—14 мкм в длину на 7—10 мкм в ширину), с ярко подсвеченными темно-зелеными краями, то в результатах исследований указывают: «Цисты *Lamblia (Giardia) intestinalis* обнаружены», при отсутствии характерного свечения в протоколе регистрируют: «Цисты *Lamblia (Giardia) intestinalis* не обнаружены».

Если в образце присутствуют сверкающие и флюоресцирующие яблочно-зеленым светом объекты от овальных до сферических (от 2,5 до 5 мкм в диаметре) с ярко подсвеченными краями, то в результатах исследований указывают: «Ооцисты *Cryptosporidium parvum* обнаружены», при отсутствии характерного свечения в протоколе регистрируют: «Ооцисты *Cryptosporidium parvum* не обнаружены».

Результаты регистрируют в протоколе и в журнале испытаний/исследований.

14 Обнаружение цистных форм криптоспоридий и лямблий методом полимеразной цепной реакции

14.1 Метод ПЦР позволяет определить специфические нуклеиновые кислоты криптоспоридий и лямблий и провести прямое обнаружение инфекционного агента.

14.2 Выделение ДНК из образцов воды

Подготовку проб питьевой воды для последующего выделения ДНК проводят в соответствии с 7.2.1.

14.2.1 Метод выделения ДНК криптоспоридий и лямблий из воды для ПЦР с применением ЦТАБ

Методика описана в ГОСТ Р ИСО 21571—2018 (А.3).

14.2.2 Метод выделения ДНК с использованием ДСН, гуанидин-гидрохлорида и диоксида кремния

Методика описана в ГОСТ Р ИСО 21571—2018 (А.4).

14.2.3 Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстрагирования ДНК на основе гуанидина-хлороформа

Методика описана в ГОСТ Р ИСО 21571—2018 (А.5).

14.2.4 Методы выделения ДНК с использованием готовых наборов

Поскольку поверхностная и сточная вода не содержит ингибиторов ПЦР, а пробоподготовка (фильтрация и иммуносорбция) предполагает дополнительное очищение, для экстракции нуклеиновых кислот для ПЦР могут быть использованы любые сертифицированные наборы готовых реактивов, предназначенные для выделения общей (неспецифической для какого-либо биологического вида) ДНК из клинического материала, биологического материала, бактериальных и иных клеточных культур и т. д. Могут быть применены наборы, сочетающие первоначальный лизис клеточного материала с дальнейшими преципитацией нуклеиновых кислот (например, «Рибо-преп», либо сорбцией ДНК на сорбенте в виде взвеси, либо колонок типа «К-сорб», «Проба-НК», «РеалБест экстракция», ExtractDNA, QIAamp DNA Mini Kit или аналоги). Во всех этих случаях экстракцию следует выполнять в соответствии с инструкцией производителя. При первом применении нового набора следует провести контрольное выделение ДНК из эталонного образца цист лямблий и ооцист криптоспоридий.

14.3 Проведение ПЦР

14.3.1 Реакционная смесь

Объем реакции в пробе зависит от используемых приборов и расходных материалов. Рекомендуется объем пробы не менее 20 и не более 50 мкл. Реакционную смесь составляют по инструкции производителя фермента ДНК-полимеразы Taq для всех анализируемых в данном эксперименте проб, включая контрольные образцы (рекомендуется составлять смесь не менее чем для пяти проб, рекомендуемый состав приведен в таблице 2). Составленная смесь используется незамедлительно или хранится не более нескольких часов в соответствии с протоколом производителя фермента ДНК-полимеразы.

Таблица 2 — Рекомендуемый состав амплификационной смеси (корректируется в соответствии с инструкцией производителя фермента) на 10 проб при объеме пробы 25 мкл*

Реактивы с указанием концентрации	Количество добавляемого реактива, мкл	
	на одну пробу	на 10 проб
1 Деионизированная вода	Не более 20 (необходимо учитывать объем ДНК-матрицы**), в данном случае 14,5	145
2 Буфер для ПЦР с $MgCl_2$ (10×)	2,5	25,0
3 Смесь дезоксинуклеотидов	0,5	50,0
4 Праймер 1 (10 мкм)	1,0	30,0
5 Праймер 2 (10 мкм)	1,0	30,0
6 Taq-полимераза (5 ед/мкл)	0,5	18,0

* При использовании флуоресцентной детекции в реакционную смесь добавляют флуоресцентный интеркалирующий краситель для нуклеиновых кислот (типа Sybr Green, Eva green и др.) согласно протоколу производителя.

** По данной таблице предполагается добавление 5 мкл ДНК в пробу.

Кроме реактивов, предусмотренных протоколом производителя, в пробы добавляют специфические олигонуклеотиды (см. таблицу 3). Тщательно перемешав реакционную смесь, ее раскапывают по реакционным пробиркам. Реакционные пробирки объемом от 0,2 до 0,5 $см^3$ необходимо выбирать в соответствии с моделью используемого прибора (термоциклера).

Таблица 3 — Специфические олигонуклеотиды для идентификации

Наименование олигонуклеотидов	Нуклеотидная последовательность
Криптоспоридии 1	GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGG
Криптоспоридии 2	CTGCTTTAAGCACTCTAATTTTCTCAAAG
Лямблии 1	CATGCATGCCCGCTCA
Лямблии 2	AGCGGTGTCCGGCTAGC

В каждую пробирку добавляют также анализируемые и контрольные образцы (в объеме желательно не менее 2—5 мкл). Контрольные образцы включают в себя: положительный контроль — к реакционной смеси добавляют ДНК анализируемого возбудителя в определенной концентрации (эталонный образец); отрицательный контроль — к реакционной смеси вместо ДНК добавляют деионизованную воду, заведомо чистую от ДНК возбудителя.

После перемешивания на встряхивателе и сгона капель на дно в центрифуге пробирки помещают в термоциклер. Если используется термоциклер без подогрева крышки, в реакционные пробирки добавляют от 10 до 20 мкл минерального масла для того, чтобы предотвратить испарение проб при нагревании.

14.3.2 Режим ПЦР

Режимы ПЦР могут быть изменены в соответствии с инструкциями производителей, используемых реактивов и аппаратуры (термоциклеров).

Для реакции определения криптоспоридий предусмотрен нижеприведенный протокол.

Начальная денатурация при температуре 95 °С 10 мин, далее 55 циклов амплификации (95 °С в течение 15 с, 60 °С в течение 60 с).

Для реакции определения лямблий предусмотрен следующий протокол.

Начальная денатурация 95 °С 5 мин, далее 40 циклов амплификации (95 °С в течение 20 с, 53 °С в течение 20 с, 72 °С в течение 20 с).

Примечание — При применении детекции продуктов реакции в режиме реального времени при задании программы условий амплификации добавляется режим детекции флуоресцентного сигнала в соответствии с инструкцией к используемым реагентам с применением рекомендованных каналов для флюорофоров.

14.4 Детектирование результатов ПЦР

14.4.1 Флуоресценция

Анализ результатов с детекцией в режиме реального времени проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для выполнения данного вида ПЦР. Согласно инструкции производителя прибора устанавливают все необходимые настройки параметров с учетом указаний для конкретного набора реагентов. Ключевым параметром является значение порогового цикла Ct, т. е. номера цикла, в котором кривая флуоресценции пересекает установленную на соответствующем уровне пороговую линию.

14.4.2 Гель-электрофорез

Методика детекции результатов ПЦР при помощи электрофореза в агарозном геле описана в ГОСТ Р ИСО 21571—2018 (В.2).

14.5 Интерпретация результатов ПЦР

14.5.1 Тестирование считают прошедшим корректно в том случае, если:

а) в пробе с положительным контролем присутствует продукт ожидаемого размера (для детекции методом электрофореза) или значение Ct соответствует ожидаемому, как правило, обозначенному в инструкции к используемым реактивам (для детекции в режиме реального времени);

б) в пробе с отрицательным контролем отсутствуют продукты реакции (для детекции методом электрофореза) или значение Ct отсутствует (или соответствует указанному в инструкции к используемым реактивам) для детекции в режиме реального времени.

Также при оценке корректности прохождения тестирования следует учитывать дополнительные критерии, указываемые в инструкции производителя.

В случае корректно прошедшего тестирования наличие ДНК в анализируемой пробе считают установленным, если на электрофорезном геле присутствует продукт ожидаемого размера (соответствующего положительному контролю) или значение Ct превышает значение в пробе отрицательного контроля.

В случае корректно прошедшего тестирования отсутствие ДНК в анализируемой пробе считают установленным, если на электрофорезном геле в данной пробе отсутствуют продукты реакции или значение Ct равно или меньше значения Ct для пробы с отрицательным контролем (учитывают инструкцию к используемым реактивам).

14.5.2 Если результаты тестирования некорректны, предпринимают следующие действия:

а) в случае некорректных результатов для положительного контроля необходимо повторить ПЦР-тестирование и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК анализируемого возбудителя;

б) в случае неверных результатов для отрицательного контроля, тестирование повторяют для всех анализируемых проб, начиная с выделения ДНК;

в) если результаты анализа не удовлетворяют критериям, указанным в инструкции производителя прибора или набора реактивов, поступают согласно инструкции производителя прибора или набора реактивов;

г) в случае сомнительности результатов для отдельных проб (например, значение Ct выше, чем допустимо для отрицательного контроля, но ниже, чем минимально требуемое для признания образца положительным) тестирование повторяют для конкретных образцов, начиная с выделения ДНК.

Приложение А
(рекомендуемое)

Схема посева воды из различных объектов

В таблицах А.1, А.2 представлены схемы посева воды из различных объектов при работе различными методами.

Таблица А.1 — Схема посева воды из различных объектов при работе методом мембранной фильтрации

Объект исследования	Объем засеваемой воды, $см^3$, для определения
Водоемы, не загрязняемые сточными водами	100; 50; 10; 1
Водоемы, загрязняемые сточными водами	10; 1; 0,1; 0,01
Водоемы в зоне влияния выпуска сточных вод	0,1; 0,01; 0,001; 0,0001

Таблица А.2 — Схема посева воды из различных объектов при работе титрационным методом

Объект исследования	Объем засеваемой воды, в $см^3$, для определения
Водоемы, не загрязняемые сточными водами	Три повторности: по 10; 1; 0,1
Водоемы, загрязняемые сточными водами	Три повторности: по 1; 0,1; 0,01
Водоемы в зоне влияния выпусков сточных вод	Три повторности: по 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001

Приложение Б
(рекомендуемое)

Определение наиболее вероятного числа бактерий при титрационном методе посева

Таблица Б.1 — Расчет НВЧ бактерий в 100 $см^3$ воды при использовании трехрядовой схемы посева

Число положительных результатов			НВЧ бактерий в объеме 100 $см^3$	Число положительных результатов			НВЧ бактерий в объеме 100 $см^3$
из трех объемов по 1 $см^3$	из трех объемов по 0,1 $см^3$	из трех объемов по 0,01 $см^3$		из трех объемов по 1 $см^3$	из трех объемов по 0,1 $см^3$	из трех объемов по 0,01 $см^3$	
0	0	0	Менее 30	2	0	0	91
0	0	1	30	2	0	1	140
0	0	2	—*	2	0	2	—*
0	0	3	—*	2	0	3	—*
0	1	0	30	2	1	0	150
0	1	1	—*	2	1	1	200
0	1	2	—*	2	1	2	—*
0	1	3	—*	2	1	3	—*
0	2	0	—*	2	2	0	210
0	2	1	—*	2	2	1	280
0	2	2	—*	2	2	2	—*
0	2	3	—*	2	2	3	—*
0	3	0	—*	2	3	0	290
0	3	1	—*	2	3	1	—*
0	3	2	—*	2	3	2	—*
0	3	3	—*	2	3	3	—*
1	0	0	36	3	0	0	230
1	0	1	72	3	0	1	390
1	0	2	—*	3	0	2	640
1	0	3	—*	3	0	3	—*
1	1	0	73	3	1	0	430
1	1	1	110	3	1	1	750
1	1	2	—*	3	1	2	1200
1	1	3	—*	3	1	3	—*
1	2	0	110	3	2	0	930
1	2	1	—*	3	2	1	1500
1	2	2	—*	3	2	2	2100
1	2	3	—*	3	2	3	2900
1	3	0	—*	3	3	0	2400

Окончание таблицы Б.1

Число положительных результатов			НВЧ бактерий в объеме 100 $см^3$	Число положительных результатов			НВЧ бактерий в объеме 100 $см^3$
из трех объемов по 1 $см^3$	из трех объемов по 0,1 $см^3$	из трех объемов по 0,01 $см^3$		из трех объемов по 1 $см^3$	из трех объемов по 0,1 $см^3$	из трех объемов по 0,01 $см^3$	
1	3	1	—*	3	3	1	4600
1	3	2	—*	3	3	2	11000
1	3	3	—*	3	3	3	Более 11000
* Вероятность ниже допустимого уровня.							

Примечание — Схему посева, приведенную в таблице 3, используют при необходимости получения более точных результатов.

Приложение В
(рекомендуемое)

Постановка оксидазного теста, определение грам-принадлежности

Оксидазный тест — биохимическая реакция, которая позволяет определить наличие цитохромоксидазы, в присутствии которой микроорганизм, содержащий фермент цитохромоксидазу, становится окисленным окрашенным продуктом.

Для определения цитохромоксидазы могут быть использованы коммерческие тест-системы (СИБ для определения оксидазы или аналогов), тест-полоски, диски и реактивы промышленного производства, зарегистрированные в установленном порядке.

Перед работой качества дисков, растворов, реактивов или тест-системы на оксидазу следует испытывать с применением тест-штаммов, дающих отрицательную оксидазную реакцию (например, *E.coli*) и положительную оксидазную реакцию (например, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*).

В.1 Оксидазный тест с тетраметил-п-фенилендиамин гидрохлоридом

В качестве реактива для оксидазного теста используют 1 %-ный водный раствор тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорид, который готовят перед употреблением.

Мембранный фильтр с выросшими на нем колониями с питательной среды переносят на кружок фильтровальной бумаги большего диаметра, чем фильтр, обильно смоченной реактивом тетраметил-п-фенилендиамин гидрохлоридом для определения оксидазной активности. Оксидазный тест считают положительным, если в течение 1—4 мин появляется окрашивание колоний в фиолетово-коричневый цвет.

В случае необходимости дальнейшей идентификации оксидазоотрицательных бактерий проводят пересев колоний на подтверждающие среды непосредственно с мембранного фильтра, расположенного на кружке фильтровальной бумаги с реактивом. Время пересева не ограничено.

В.2 Оксидазный тест с диметил-п-фенилендиамин дигидрохлоридом и α-нафтолом

В качестве реактива для оксидазного теста используют 1 %-ный спиртовой раствор диметил-п-фенилендиамин дигидрохлорид с α-нафтолом (первый раствор — сохраняют в темных флаконах с притертыми пробками не более 1 мес) и 1 %-ный водный раствор фенкпендиаминового соединения (второй раствор — сохраняют в темных флаконах с притертыми пробками не более 1 нед). Перед употреблением к трем частям первого раствора добавляют семь частей второго раствора.

Мембранный фильтр с выросшими на нем колониями с питательной среды переносят на кружок фильтровальной бумаги незначительно большего диаметра, чем фильтр, обильно смоченной реактивом диметил-п-фенилендиамин дигидрохлоридом с α-нафтолом для определения оксидазной активности. Оксидазный тест считают положительным, если появляется окрашивание колоний в синий цвет.

После появления первых признаков положительного теста (окрашивание колоний в синий цвет), но не позднее чем через 4 мин, мембранный фильтр переносят обратно на питательную среду.

В случае необходимости дальнейшей идентификации оксидазоотрицательных бактерий проводят пересев колоний на подтверждающие среды непосредственно с мембранного фильтра, расположенного на питательной среде.

Посев целесообразно проводить не сразу после определения оксидазной активности, а после выдерживания на питательной среде свыше 5 мин.

В.3 Постановка оксидазного теста способом посева штрихом

Полоску фильтровальной бумаги помещают в чистую чашку Петри и смачивают двумя-тремя каплями одного из указанных выше реактивов для оксидазного теста. Если используют бумажные индикаторные системы (СИБ), то их смачивают дистиллированной водой.

С мембранных фильтров отбирают по три-четыре изолированные колонии каждого типа из числа характерных колоний и наносят штрихом или бляшкой на подготовленную фильтровальную бумагу с помощью одноразовой петли или стеклянной палочки.

Оксидазный тест считают положительным, если в течение 1 мин появляется окрашивание в сине-фиолетовый цвет. Тест считают отрицательным, если цвет в месте нанесения культуры не изменяется.

При получении нечеткого результата колонии пересевают на питательный агар для получения изолированных колоний, посевы инкубируют при температуре (36 ± 2) °С в течение 24—26 ч, а затем проводят повторное определение оксидазной активности.

В.4 Определение грам-принадлежности.

Реактивы для окраски препаратов по Граму

В.4.1 Карболовый раствор генциана фиолетового готовят следующим образом: 1 г генциана фиолетового, 10 мл ректификованного этилового спирта, 5 г фенола растирают в ступке, добавляя 100 мл дистиллированной воды.

В.4.2 Раствор Люголя готовят следующим образом: 1 г йода, 2 г йодистого калия растворяют в 300 мл дистиллированной воды. Хранят во флаконе из темного стекла.

В.4.3 Фуксин Циля готовят следующим образом: 1 г основного фуксина, 10 мл спирта этилового ректификованного, 54 г фенола растирают в ступке, добавляя 100 мл дистиллированной воды.

На обезжиренное спиртом предметное стекло наносят петлей каплю дистиллированной воды. Вносят небольшое количество культуры из анализируемой колонии и распределяют по поверхности стекла.

Мазок высушивают при комнатной температуре и фиксируют трехкратным проведением через пламя горелки.

На препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор генциана фиолетового на протяжении 0,5—1,0 мин, снимают бумагу и наливают раствор Люголя на протяжении 0,5—1,0 мин, сливают раствор Люголя.

Стекло промывают в этиловом спирте в течение 0,5—1,0 мин, пока не перестанет отходить краситель.

Затем стекло тщательно промывают водой и докрашивают в течение 1—2 мин фуксином Циля, разведенным в соотношении 1:10 дистиллированной водой.

После промывания и просушивания препарата мазок микроскопируют: грамотрицательные микроорганизмы имеют розовую окраску; грамположительные микроорганизмы окрашиваются в синий цвет.

Отношение бактерий к окраске по методу Грама допускается определять прибором для автоматического окрашивания мазков по Граму. Можно использовать промышленные наборы для окраски.

В.5 Тест Грегерсена

Петлю суточной агаровой культуры испытуемого штамма суспендируют на предметном стекле в капле 3 %-ного раствора КОН. При положительной реакции, свойственной грамотрицательным микроорганизмам, через несколько секунд жидкость в капле приобретает слизистую консистенцию, и при отрыве петли предметного стекла слизистые нити тянутся на расстояние 0,5—2,0 см. Учет результатов пробы рекомендуется проводить на темном фоне.

Приложение Г
(рекомендуемое)

Растворы и методы приготовления для проведения санитарно-паразитологических методов исследования

Г.1 Реагенты, растворы и методы их приготовления для проведения санитарно-паразитологических методов исследования

Г.1.1 Приготовление смеси Никифорова

Смешивают равные части эфира и спирта этилового технического 96 % по ГОСТ 17299—79 или ГОСТ 5962—2013.

Техника приготовления: в широкогорлую емкость наливают 100 $см^3$ эфира и 100 $см^3$ спирта 96 %, затем погружают туда чистые предметные стекла для обезжиривания.

Г.1.2 Приготовление основного (маточного) раствора Люголя 5 %-ного

Для приготовления 5 %-ного раствора Люголя 10 г йодида калия по ГОСТ 4232—74 растворяют в 30 мл дистиллированной воды, добавляют 5 г кристаллического йода по ГОСТ 4159—79, размешивают до полного растворения и доливают до 100 $см^3$ дистиллированной водой (хранить в темном стекле).

Г.1.3 Приготовление 1 %-ного раствора Люголя

Смешивают 5 $см^3$ маточного раствора с 20 $см^3$ физиологического раствора (срок хранения в темном стекле — 14 дней). Для приготовления физиологического раствора в 1000 $см^3$ дистиллированной воды растворяют 8,5 г хлорида натрия по ГОСТ 4233—77, устанавливают pH с расчетом, чтобы после стерилизации pH = (7,0 ± 0,1).

Г.1.4 Приготовление 50 %-ного раствора глицерина

50 %-ный раствор глицерина готовят путем смешивания 50 $см^3$ глицерина по ГОСТ 6824—96 и 50 $см^3$ дистиллированной воды.

Приложение Д
(рекомендуемое)

Определение наиболее вероятного числа колифагов при титрационном методе посева

Таблица Д.1 — Расчет НВЧ колифагов в воде в 100 см^3

Число положительных результатов			НВЧ в 100 см^3. Вероятность	Нижний предел	Верхний предел
из одного объема по 50 см^3	из пяти объемов по 10 см^3	из пяти объемов по 1 см^3			
1	4	16,1	0,4095	1,9	113,9
1	3	9,3	0,3422	1,1	77,4
1	2	5,6	0,3218	0,7	46,4
1	1	3,2	0,3039	0,4	26,2
1	0	1,4	0,2500	0,2	11,5
0	5	6,9	0,0010	0,8	57,6
0	4	5,1	0,0060	0,6	42,5
0	3	3,6	0,0222	0,4	29,6
0	2	2,2	0,0671	0,3	18,5
0	1	1,1	0,1937	0,1	8,8

Приложение Е
(рекомендуемое)

Эмпирическая оценка неопределенности при внедрении метода, связанная с исследованиями проб на наличие санитарно-показательных микроорганизмов в поверхностных и сточных водах

В Российской Федерации эмпирическую оценку неопределенности при внедрении метода можно проводить в соответствии с ГОСТ Р 54502.

Основными источниками неопределенности является отбор проб, первичное разведение, оборудование, культуральная среда, реактивы, компетентность исследователя, время проведения исследования, остаточные случайные погрешности.

Лаборатории при внедрении метода должны подтверждать техническую компетентность путем сличительных испытаний. Стандартное отклонение вопроизводимости может быть оценено по результатам, полученным в условиях внутрилабораторного или межлабораторного эксперимента с целью оценки технической компетентности, что позволит оценить неопределенность результатов в условиях конкретной лаборатории.

Количество выросших колоний x на чашках или в пробирках вычисляют по формуле:

$$X = \frac{\sum C}{(n_1 + n_2) \cdot 0{,}1} \cdot 10^n, \qquad (E.1)$$

где $\sum C$ — сумма всех подсчитанных колоний на чашках Петри в шести последовательных разведениях;

n_1 — количество чашек Петри, подсчитанное для первого меньшего разведения;

n_2 — количество чашек Петри, подсчитанное для второго разведения;

n — степень разведения воды (для меньшего разведения).

Число разведений может быть больше, это зависит от степени загрязнения исследуемой воды.

По каждому образцу необходимо исследовать не менее 10 повторностей образца, выполненных каждым исполнителем, по окончании рассчитывают среднее арифметическое значение результатов параллельных определений.

Результаты количества колоний выражают как число КОЕ/100 см^3, пересчитанные в $\log_{10}$ (КОЕ/см^3 или см^3).

Стандартное отклонение воспроизводимости S_R для n-образцов вычисляют по формуле

$$S_R = \sqrt{\sum_{i=1}^{N} \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{N - 1}}, \qquad (E.2)$$

где y_{iA}, y_{iB} — результаты, выраженные в логарифмической шкале $\log_{10}$ (КОЕ/см^3);

i — индекс выборки $i = 1$ n ($n > 10$);

n — количество составляющих, используемых при вычислении неопределенности;

iA, iB — результат испытаний i-го объекта обычным методом при сравнении методов А и В;

N — количество результатов выборки $N > 10$ при оценке близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных двумя разными сотрудниками лаборатории, выполняющих внедрение метода в конкретных одинаковых условиях в одной лаборатории.

Так как предполагается, что на чашках Петри или в пробирках количество выросших колоний незначительно, т. е. поддается подсчету, то оно подчиняется закону распределения Пуассона. Случайную погрешность, рассчитанную исходя из распределения Пуассона, учитывают при оценке расширенной неопределенности.

Если результат испытаний выражен в логарифмических единицах, то расширенная неопределенность U с учетом того, что коэффициент охвата равен 2 (что приблизительно соответствует вероятности $P = 0{,}95$), может быть определена по формуле

$$U = \sqrt[2]{S_R^2 + \frac{0{,}18861}{\sum C}}, \qquad (E.3)$$

где S_R — стандартное отклонение воспроизводимости;

$\frac{0{,}18861}{\sum C}$ — компонента дисперсии, возникающая вследствие распределения Пуассона.

Результаты расчета стандартного отклонения воспроизводимости S_R и расширенной неопределенности для разных видов матрицы представлены в таблице Е.1.

Таблица Е.1 — Неопределенность, связанная с исследованиями проб на наличие нормируемых показателей поверхностных и сточных вод

Результаты расчетов, КОЕ/20 см^3 или КОЕ/100 см^3	Образец 1	Образец 2
СКО воспроизводимости, S_R $\log_{10}$ (КОЕ/см^3 или см^3)	0,013	0,02
$\frac{0,18861}{\sum C}$ $\log_{10}$ (КОЕ/см^3 или см^3)	0,024	0,026
Расширенная неопределенность U, $\log_{10}$ (КОЕ/см^3 или см^3)	0,055	0,065
Расширенная неопределенность U, %	4,6	4,8

Данные о сходимости методов, описанных в настоящем стандарте, основаны на результатах, полученных в межлабораторных испытаниях.

Абсолютная разность между двумя отдельными результатами испытаний или результатов, полученных при использовании одного и того же метода, на идентичном испытуемом материале, одним и тем же оператором, использующим одно и то же оборудование, в течение допустимого промежутка времени, будет превышать предел повторяемости не более чем в 5 % случаев. При этом оценивают результаты 10 повторных по степени близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных установленных условиях в одной лаборатории.

Оценку воспроизводимости при оценке неопределенности измерений можно проводить в соответствии со статистическими методами, принятыми в ГОСТ Р ИСО 21748.

Библиография

[1]	МУК 4.2.2316-08	Методы контроля бактериологических питательных сред
[2]	СанПиН 3.3686-21	Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней
[3]	СанПиН 1.2.3685-21	Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания
[4]	Методические рекомендации МР 24 ФЦ/513-2004	Определение колиформных бактерий и *E.coli* с использованием хромогенных и флюорогенных индикаторных сред производства Merck (Германия). — М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004

УДК 614.78.628:579.262:006.354 ОКС 13.060.70

Ключевые слова: сточная вода, микроорганизмы, энтерококки, обобщенные колиформные бактерии, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, колифаги, патогенные бактерии рода *Shigella* и рода *Salmonella*, цисты лямблий, ооцисты криптоспоридий, яйца и личинки гельминтов

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 08.04.2024. Подписано в печать 18.04.2024. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 5,58. Уч.-изд. л. 4,74.

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