МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 35239— 2025

ВОДА ПИТЬЕВАЯ

Методы санитарно-паразитологического анализа воды

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2025

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Российской ассоциацией водоснабжения и водоотведения совместно с 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)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 февраля 2025 г. № 182-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узбекское агентство по техническому регулированию

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 мая 2025 г. № 488-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 35239—2025 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2026 г. с правом досрочного применения.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2025

В Российской Федерации 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 Аппаратура, материалы, реактивы, посуда 3
5 Общие требования к отбору проб, условиям транспортировки, хранения, отбора и концентрированию проб воды 5
6 Методы исследования проб питьевой воды 7
7 Исследование воды на цисты лямблий и ооцисты криптоспоридий методом иммуномагнитного разделения и мечения флуоресцирующими антителами 11
8 Обнаружение цистных форм криптоспоридий и лямблий методом полимеразной цепной реакции . . . 14
Приложение А (рекомендуемое) Приготовление смеси Никифорова 18
Приложение Б (рекомендуемое) Калибровка окулярной шкалы микроскопа 19
Приложение В (справочное) Информация о применяемых технических регламентах и нормативных правовых актах в государствах — участниках СНГ 20

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ВОДА ПИТЬЕВАЯ

Методы санитарно-паразитологического анализа воды

Drinking water. Methods of parasitological tests of water

Дата введения — 2026—01—01
с правом досрочного применения

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на упакованную питьевую воду, включая природную минеральную воду (в том числе столовую природную минеральную воду, лечебно-столовую природную минеральную воду и лечебную природную минеральную воду), купажированную питьевую воду, обработанную питьевую воду, природную питьевую воду, питьевую воду для детского питания, искусственно минерализованную питьевую воду, изготовленную с использованием природной питьевой воды (если вода отобрана из поверхностного водозабора или подвержена влиянию поверхностных вод в точке водоотбора исходной (сырой) воды), питьевую воду из емкостей для ее хранения, а также воду для изготовления алкогольной и безалкогольной продукции (напитков) и устанавливает методы санитарно-паразитологического анализа в рамках проведения лабораторного контроля в соответствии с требованиями технических регламентов или нормативных правовых актов, действующих в стране, присоединившейся к стандарту, по показателям цисты и ооцисты патогенных простейших, яйца и личинки гельминтов методами последовательной фильтрации и люминесцентной микроскопии, полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуномагнитного разделения и мечения флуоресцирующими антителами.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 857 Кислота соляная синтетическая техническая. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4159 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4232 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4517—2016 Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия[1)]

ГОСТ 6824 Глицерин дистиллированный. Общие технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 17299 Спирт этиловый технический. Технические условия

ГОСТ 21241 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ ISO 21571—2018 Продукция пищевая. Методы анализа для обнаружения генетически-модифицированных организмов и производных продуктов. Экстрагирование нуклеиновых кислот

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 58144—2018.

Издание официальное

ГОСТ 24363 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25706 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования

ГОСТ 25794.1—83 Реактивы. Методы приготовления титрованных растворов для кислотно-основного титрования

ГОСТ 29227—91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 30813 Вода и водоподготовка. Термины и определения

ГОСТ 31861[1)] Вода. Общие требования к отбору проб

ГОСТ 31862 Вода питьевая. Отбор проб[2)]

ГОСТ 31904 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ 31942—2012 Вода. Отбор проб для микробиологического анализа

ГОСТ ISO 15553—2017 Качество воды. Выделение из воды и идентификация ооцист криптоспоридий и цист лямблий

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 31942—2012 (ISO 19458:2006) Вода. Отбор проб для микробиологического анализа

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 30813, а также следующие термины с соответствующими определениями:

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

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

3.3 **цисты лямблий:** Стадия развития лямблий, обеспечивающая их выживание во внешней среде и способствующая передаче инфекции новым хозяевам.

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

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 59024—2020.

[2)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 56237—2014 «Вода питьевая. Отбор проб на станциях водоподготовки и в трубопроводных распределительных системах».

3.5 **люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия:** Метод наблюдения под микроскопом люминесцентного свечения микрообъектов при освещении их сине-фиолетовым светом или ультрафиолетовыми лучами.

Примечание — Возбуждение видимой люминесценции микроскопических объектов, окрашенных флуорохромами, осуществляется ультрафиолетовым, фиолетовым и синим светом.

3.6 **флуорохромы:** Вещества (красители), применяемые в люминесцентной (флуоресцентной) микроскопии для обработки объектов, не обладающих природной способностью люминесцировать.

Примечание — При мечении микрообъектов флуорохромы адсорбируются различными структурными элементами клеток, что придает им способность люминесцировать.

3.7 **иммунофлуорохромы:** Специфические реактивы, представляющие собой антитела к исследуемым микрообъектам или к их структурным элементам, конъюгированные с флуорохромным красителем.

Примечание — При использовании иммунофлуорохромов обеспечивается максимальная эффективность методик выявления искомых патогенов.

3.8 **иммуномагнитные суспензии:** Специфические реактивы, представляющие собой антитела к исследуемым микрообъектам, конъюгированные с магнитными частичками.

Примечание — При использовании иммунномагнитных суспезий обеспечивается максимальная эффективность изоляции искомых патогенов.

3.9 **тест с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР):** Метод обнаружения целевых последовательностей ДНК в исследуемом биологическом материале путем амплификации *invitro*.

3.10 **амплификация:** Процесс многократного копирования целевых последовательностей ДНК (кДНК), ограниченного (фланкированного) специфическими олигонуклеотидными последовательностями («специфическими олигонуклеотидами»).

В остальном в настоящем документе применены термины и определения, относящиеся к методу ПЦР, данные в ГОСТ ISO 21571.

4 Аппаратура, материалы, реактивы, посуда

4.1 Приборы мембранного фильтрования для санитарно-паразитологического исследования воды: вакуумные фильтровальные установки типа ПВФ-142, ПВФ-142Б, ПВФ-142Б(К), ПВФ-142Б (ДК), ПВФ-35Б, ПВФ-47Б, ПВФ-142ПБ, напорного фильтрования типа ПНФ-70Б, УППВ; ЗИП-комплект (фритта, трубопроводы, фильтры к заборнофильтровальному устройству (220 × 220 мм).

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

4.3 Флуоресцентные(люминесцентные) микроскопы 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 типа «ОптиЛюм» или аналогичные.

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

4.5 Шкаф холодильный или холодильник, поддерживающий температуру 2 °С—8 °С.

4.6 Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды не ниже ГОСТ 6709 или иных нормативных документов на дистиллированную воду, принятых в государствах, принявших стандарт.

4.7 Шкаф сушильный, стерилизационный, обеспечивающий температуру до 180 °С.

4.8 Дозаторы пипеточные полуавтоматические с наконечниками. С целью недопущения контаминации следует использовать различные комплекты микропипеток на разных стадиях процесса (отдельные — для выделения ДНК, для проведения ПЦР, для проведения электрофореза).

4.9 Инструментарий металлический: пинцеты по ГОСТ 21241 для работы с мембранными фильтрами.

4.10 Оборудование для экстракции нуклеиновых кислот описано в ГОСТ ISO 21571—2018 (приложение А, подпункт А.3.1.6).

4.11 Оборудование для проведения ПЦР (и флуоресцентной детекции) — помимо иного лабораторного оборудования необходимо использование оборудования, перечисленного в ГОСТ ISO 20838—2014 (раздел 6), при использовании флуоресцентной детекции результатов ПЦР применяют амплификатор с возможностью такой детекции (работа в режиме реального времени).

4.12 Оборудование для проведения электрофореза описано в ГОСТ ISO/TS 13136—2016 (приложение С, подпункт С.3.5).

4.13 Мембранные фильтры для санитарно-паразитологических исследований на основе ацетатов целлюлозы типа МФАС-СПА с размерами пор от 1,5 до 3,0 мкм, МФАС-П-4 с размерами пор от 2,4 до 4,5 мкм или прозрачные аналитические трековые мембраны АТМ на основе полиэтилентерефталата с размерами пор от 2,5 до 4,0 мкм. Рекомендуемый диаметр фильтровальных дисков для исследования питьевых вод, применяемых в паразитологических лабораториях 142 мм, 70 мм, в зависимости от диаметра фритты фильтродержателя используемого фильтровального оборудования.

4.14 Уплотнительные кольца в комплекте фильтров аналитических трековых мембран (АТМ).

4.15 Предфильтры — капроновая сетка с ячейками 25 мкм, 60—70 мкм.

4.16 Лабораторная посуда 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);
- покровные стекла 24 × 24;
- кюветы из нержавеющей стали;
- горелка газовая или спиртовки;
- кисти акварельные широкие (мягкие или полужесткие);
- штативы лабораторные для пробирок и микропробирок.

4.17 Готовый комплект реагентов для окраски микроорганизмов по методу Циля-Нильсена.

4.18 Оборудование, реагенты и расходные материалы для проведения исследования на лямблии и ооцисты криптоспоридий методом иммуномагнитного разделения и мечения флуоресцирующими антителами:

- слайды типа SuperStick (предметные стекла): S100-1 (одно окно), S100-2 (два окна), S100-3 (три окна);
- фосфатно-солевой моющий буфер PBS20X (pH = 7,4);
- тонкие пластмассовые квадратные или круглые пластинки (диски) для переноса мембраны на лоток собственного или заводского изготовления;
- ячейка влажности;
- термостат, поддерживающий рабочую температуру 37 °С и обеспечивающий градиент температуры в камере 1 °С;
- наклонный штатив для слайдов;
- магнитный штатив MagnetOn 4T;
- магнитная ручка SepPen;
- наконечники для магнитной ручки;
- автоматические дозаторы на 100—1000 мкл;
- наконечники для автоматических пипеток;
- градуированная пипетка на 1—5 $см^3$;
- лабораторный вортекс;
- лабораторный ротатор;
- лабораторный таймер;
- пробирки для иммуномагнитной сепарации (ИМС-пробирки с одной плоской стороной);
- микроцентрифужные пробирки на 1,5—2,0 $см^3$ типа «Eppendorf»;
- штативы лабораторные для пробирок и микропробирок;
- штатив для ИМС-пробирок;
- штатив для микроцентрифужных пробирок;
- канадский бальзам (бесцветный лак).

4.19 Краситель флюоро-Стейн — 0,1 %-ный водный раствор калькофлюора белого.

4.20 Реагенты и химреактивы диагностического набора AquaGlo G/C:

- иммунореагент AquaGlo G/C концентрированный или в рабочем разведении;
- фосфатно-солевой буфер имеет pH 7,4. Состав 20-кратного концентрата: 16 % хлорида натрия, 0,4 % хлорида калия, 2,88 % гидрофосфата натрия, 0,48 % дигидрофосфата калия, 0,5 % твина 20;
- защитная среда на основе эльванола (поливинилового спирта) предохраняет флуорофор, связавшийся на меченных объектах, от выгорания;
- коунтер-стейн представляет собой 0,1 %-ный раствор синьки Эванса в натрий-фосфатном буфере с добавлением 0,04 % азида натрия;
- DB-буфер состоит из 0,8 % хлорида натрия, 0,02 % хлорида калия, 0,144 % гидрофосфата натрия, 0,0245 % дигидрофосфата калия, 1 % бычьего сывороточного альбумина, 0,3 % тритона X-100 и 0,05 % азида натрия;
- контроль положительный (взвесь с цистами лямблий и ооцистами криптоспоридий).

4.21 Реагенты и химреактивы диагностического набора Combo-Grab IMS:

- иммуномагнитная суспензия Crypto-Grab IMS Beads, специфичная к ооцистам криптоспоридий;
- иммуномагнитная суспензия Giardia-Grab IMS Beads, специфичная к цистам лямблий;
- буфер для иммуномагнитной сепарации Grab Buffer Аб концентрированный (2x);
- моющий буфер Grab Buffer B;
- концентрированный раствор 2-меркаптоэтанола 14,3 М (2-меркаптоэтанола, готовый раствор 20 мМ готовить свежим непосредственно перед проведением анализа, разбавляя концентрированный 14,3 М раствор в отношении 1:700);
- реактивы и рецептуры приготовления растворов, реактивов, используемых при концентрировании проб и выявлении цист лямблий и ооцист криптоспоридий методом иммуномагнитного разделения и мечения флюоресцирующими антителами, описаны в ГОСТ ISO 15553—2017 (подраздел 4.4).

4.22 Реагенты для экстракции нуклеиновых кислот описаны в ГОСТ ISO 21571—2018 (приложение А, подпункты А.3.1.5.2 — А.3.1.5.12, А.3.1.5.14 — А.3.1.5.20, А.4.1.5, А.5.1.5).

4.23 Реагенты и расходные материалы для проведения ПЦР применяют в соответствии с ГОСТ ISO 20838—2014 (раздел 5) и ГОСТ ISO 21570—2009 (приложение А, пункт А.1.5), за исключением специфических олигонуклеотидов, указанных в таблице 2 настоящего стандарта. Допускается применение готовых диагностических наборов ПЦР, специфических для *Giardia spp* или *Cryptosporidium spp* (таких как «РеалБест-Вет ДНК *Cryptosporidium spp*» или аналогичных) или аналогичных.

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

Примечание — Допускается применение реагентов, реактивов и расходных материалов с аналогичными характеристиками, а также готовых реактивов и наборов промышленного производства, зарегистрированных и разрешенных к применению в установленном порядке.

5 Общие требования к отбору проб, условиям транспортировки, хранения, отбора и концентрированию проб воды

Отбор, транспортирование и хранение проб воды для паразитологического анализа проводят по ГОСТ 31861, ГОСТ 31862, ГОСТ 31942 или иным нормативным документам на отбор проб, принятым в государствах, присоединившихся к стандарту.

5.1 Подготовка лабораторной посуды к исследованию

Общие требования к подготовке лабораторной посуды для проведения паразитологических исследований:

5.1.1 Посуда, применяемая для паразитологического исследования (пробирки, колбы, флаконы, чашки), должна быть удобной конструкции, использоваться должным образом и проходить соответствующую подготовку, чтобы гарантировать лабораторную чистоту.

5.1.2 После окончания исследования использованную лабораторную посуду с отработанным материалом обеззараживают в соответствии с действующими санитарными требованиями.

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

5.1.3 Использованные пипетки, стекла, пробирки и другие инструменты погружают в рабочий раствор дезинфицирующего средства, эффективного в отношении гельминтозов и протозоозов. После обеззараживания лабораторную посуду тщательно промывают проточной водопроводной водой, затем дистиллированной водой и высушивают.

5.1.4 Лабораторная посуда для паразитологических исследований должна быть обеззаражена дезинфицирующими средствами, эффективными в отношении гельминтозов и протозоозов, тщательно вымыта, высушена; предметные стекла — дополнительно обезжирены в смеси Никифорова (см. приложение А) или этаноле.

5.2 Требования к емкостям для отбора проб

5.2.1 Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую или многократного применения (предварительно обеззараженную) посуду с притертыми или завинчивающимися крышками. Посуду (емкости) для многократного использования необходимо изготавливать из материалов, выдерживающих обработку дезинфицирующими средствами или кипятком.

5.2.2 Горловины бутылей из стекла, металла, полимеров должны быть укомплектованы плотно закрывающимися пробками (силиконовыми, корковыми, резиновыми, пластмассовыми, закрывающимися нажатием или завинчивающимися крышками), а также при необходимости защищены снаружи от загрязнений колпачками из алюминиевой фольги или плотной бумаги.

5.2.3 Для отбора проб путем погружения в чистые воды используют емкости (бутыли), которые должны быть обеззараженными как внутри, так и снаружи, и защищены от загрязнений при хранении после обеззараживания, например упакованы или храниться на специально отведенной промаркированной полке или шкафу.

5.2.4 Вместимость емкости (бутыли) для отбора проб должна соответствовать объему воды, необходимому для определения всех требуемых паразитологических показателей. Допускается возможность отбора и доставки одной пробы для паразитологического исследования в нескольких обеззараженных емкостях, например 5,10, 25, 50 дм^3.

5.3 Отбор проб воды с применением фильтровальных приборов или в емкости

Отбор проб воды с применением фильтровальных приборов, разрешенных к применению [типа ПНФ-70Б, оснащенного прибором отсчета отобранной воды; могут использоваться вакуумные фильтровальные установки типа ПВФ-142, ПВФ-142Б, ПВФ-142Б(К), ПВФ-35, ПВФ-47, ПВФ-142П, установки напорного фильтрования типа УППВ и его модификаций, снабженных счетчиками воды для контроля объема отбираемой пробы воды], осуществляют на объектах водозабора с доставкой на исследование в лабораторию концентрированного осадка на мембранных фильтрах.

5.3.1 Отбор проб питьевой воды распределительных сетей централизованных систем водоснабжения

Отбор проб воды из распределительной сети осуществляют по ГОСТ 31942—2012 (подраздел 6.1) в емкости, подготовленные по 5.2. Допускается возможность отбора и доставки одной пробы для паразитологического исследования в нескольких обеззараженных или одноразовых емкостях из полимерных материалов, подготовленных по 5.2. Общий объем пробы должен составлять 50 дм^3. При исследовании воды из распределительной сети отбор проб осуществляют из крана без предварительного спуска воды, с применением гибких шлангов, водораспределительных сеток, насадок.

Отбор проб питьевой воды централизованных систем водоснабжения с помощью фильтровальных приборов типа ПНФ-70 Б используют для проведения концентрирования питьевых вод на мембранном фильтре диаметром 70 мм непосредственно на месте забора под напором водопроводной сети. Фильтровальный прибор типа ПНФ-70 Б соответствует водопроводным кранам с диаметрами изливов 20—23 мм. Прибор для фильтрования типа ПНФ-70 Б закрепляют на краю излива водопроводного крана с помощью одного из переходных устройств (набор переходников входит в комплект поставки). Прибор для фильтрования оборудован отсечным краном и штуцером для подсоединения шланга. Количество воды, прошедшей через фильтрующий прибор, контролируют с помощью стандартного механического счетчика воды (50 дм^3). Перед началом фильтрования мембранный фильтр укладывают на поверхность фильтрующей ячейки типа ПНФ-70 Б, подсоединяют конец шланга к водосчетчику, открывают отсечной кран прибора и постепенно открывают водопроводный кран до среднего положения. После прохождения 50 дм^3 воды через фильтрующую установку типа ПНФ-70 Б закрывают водопроводный

кран и отсечной кран фильтрующего прибора. Показания водосчетчика фиксируют в акте отбора, а мембранный фильтр переносят на чашку Петри и доставляют в лабораторию.

5.3.2 Отбор проб питьевой воды из природных источников

Отбор проб воды из скважин, родников и колодцев проводят по ГОСТ 31942—2012 (подраздел 6.2) в емкости, подготовленные по 5.2, или с помощью фильтровальных приборов.

Способ отбора проб воды с помощью фильтровальных приборов из природных источников проводят в месте отбора 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, предфильтр закрепляют в заборно-фильтровальном устройстве, подключают фильтровальную ячейку к электронасосу и водосчетчику, опускают заборно-фильтровальное устройство непосредственно в водоисточник с питьевыми водами. После прохождения 50 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. При использовании фильтровальных приборов в лабораторию доставляют концентрат пробы в пластиковой емкости, входящей в состав прибора.

5.4 Объемы отбора проб питьевых вод

При исследовании воды из распределительной сети объем пробы, отобранной по 5.3.1, составляет 50 дм^3.

При исследовании воды, отобранной по 5.3.2 из природных источников, подверженных влиянию поверхностных вод, объем пробы составляет 50 дм^3.

При необходимости исследовании бутилированной воды в потребительской упаковке объем пробы составляет 50 дм^3. Отбор проб в этом случае проводят по ГОСТ 31904.

5.5 Доставка и хранение проб питьевой воды

Пробы воды доставляются в лабораторию в соответствии с ГОСТ 31942—2012 (раздел 7).

Промаркированные пробы воды должны быть доставлены в лабораторию в течение 24 ч после отбора. Пробы, не прошедшие предварительную обработку, хранят при комнатной температуре 15 °С — 25 °С не более 2 сут. Концентрированные пробы можно хранить в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 3—4 сут.

5.6 Концентрирование проб питьевых вод

Концентрирование проб питьевой воды осуществляют в соответствии с ГОСТ ISO 15553—2017 (приложение В).

6 Методы исследования проб питьевой воды

Пробы питьевой воды после пробоподготовки (фильтрации) и получения концентрированных смывов осадка исследуют санитарно-паразитологическими, серологическими, молекулярно-биологическими методами для выявления возбудителей паразитарных болезней (яиц гельминтов, личинок гельминтов и цист и ооцист патогенных кишечных простейших).

Санитарно-паразитологические методы применяют при исследовании на яйца, личинки гельминтов и патогенных кишечных простейших (цист и ооцист патогенных простейших) (например, метод последовательной фильтрации через систему прозрачных аналитических трековых мембран и метод люминесцентной микроскопии).

Серологические методы представлены двухэтапной реакцией, при которой обнаружение искомого антигена в комплексе антиген — антитело (АГ — АТ) происходит с помощью иммуномагнитной суспензии для выделения ооцист криптоспоридий (*Cryptosporidium parvum*) и цист лямблий [*Lamblia* (*Giardia*) *intestinalis*].

Молекулярно-биологическими методами (ПЦР) определяют целевые последовательности ДНК паразитарного агента (лямблий и криптоспоридий).

Наиболее высокой чувствительностью обладает метод иммуномагнитной сепарации с иммунофлуоресцентным мечением, который позволяет выявить цисты лямблий и ооцисты криптоспоридий даже при незначительной концентрации их в воде.

6.1 Метод последовательной фильтрации через систему прозрачных аналитических трековых мембран

На заборно-фильтровальное устройство прибора для фильтрования типа ПВФ-142 крепят предфильтр в виде капроновой сетки с размерами ячейки 67—70 мкм.

АТМ с диаметром пор 4,0 мкм помещают на фритту фильтродержателя прибора для фильтрования и сверху укладывают фильтр с размером ячейки 25,0 мкм, уплотняют кольцом из эластичной резины. 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 пластиковые квадратные или круглые пластинки размером 150 × 150 мм и переносят в лоток. Профильтрованную в отдельную емкость пробу воды повторно фильтруют с использованием АТМ с диаметром пор 2,5 мкм, которую укладывают на фритту фильтродержателя между двумя уплотнительными кольцами из полиэтилена или обрезиненного лавсана (поставляют 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 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 фильтр с размером ячейки 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 (поставляют в комплекте с АТМ).

После фильтрации АТМ осторожно снимают пинцетом с фритты фильтрующего прибора на пластиковую пластинку (диск), а затем помещают в лоток. Со всех трех фильтров аккуратно и тщательно, придерживая пластинку (диск) с мембраной пинцетом за край, смывают осадок с обеих поверхностей мембран и с пластиковых пластинок (дисков), на которых эти фильтры лежали. Смыв проводят плоской, средней жесткости кисточкой в лоток с дистиллированной водой. При этом периодически споласкивают мембраны и пластинки (диски) дистиллированной водой из химического стакана. Общий объем дистиллированной воды при смыве осадка со всех трех фильтров не должен превышать 300—500 см^3.

Полученный концентрат смыва сливают из лотка в воронки прибора для фильтрации типа ПВФ 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 и при необходимости осмотрев их с помощью лупы по ГОСТ 25706, а затем обработав предметное стекло 50 %-ным раствором глицерина (для этого на поверхность предметного стекла наносят 1—2 капли 50 %-ного раствора глицерина[1)] и стеклянной палочкой распределяют его по всей поверхности тонким слоем), сверху мембраны наносят каплю 1 %-ного раствора Люголя[2)] и накрывают покровными стеклами (24 × 24 мм) всю поверхность мембраны.

Микроскопируют препарат при увеличениях: окуляр 7$^×$ или 10$^×$; объектив 10$^×$; для идентификации яиц гельминтов и исследования на цисты простейших — объектив 40$^×$.

Если есть необходимость сохранить препараты трековых мембран для отдаленной микроскопии либо использовать метод концентрации осадка, поступают следующим образом:

[1)] 50 %-ный раствор глицерина готовят путем смешивания 50,0 см^3 глицерина по ГОСТ 6824 и 50,0 см^3 дистиллированной воды.

[2)] 1 %-ный раствор Люголя готовят из 5 %-ного маточного раствора Люголя. Для приготовления 5 %-ного раствора Люголя 10 г йодида калия по ГОСТ 4232 растворяют в 30 мл дистиллированной воды, добавляют 5 г кристаллического йода по ГОСТ 4159, размешивают до полного растворения и доливают до 100 см^3 дистиллированной водой. Готовый рабочий раствор хранят в темном стекле. 1 %-ный раствор 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, устанавливают pH с расчетом, чтобы после стерилизации pH = 7,0 ± 0,1.

- первый вариант: сохраняют объекты на трековых мембранах для последующей микроскопии (в течение 2 сут после фильтрации) путем подготовки постоянных препаратов на предметных стеклах с глицерином. Хранят препараты до микроскопии в закрытых чашках Петри, в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С.

Мембраны (или полоски из них) без подготовки постоянных препаратов и применения глицерина хранению не подлежат;

- второй вариант: концентрируют осадок с трековых мембран. Для этого в небольшое количество 50—100 $см^3$ дистиллированной воды с pH = (9—12) (щелочной pH позволяет эффективнее смыть с поверхности мембраны паразитарные объекты) смывают кисточкой осадок с трековых мембран. Повторно фильтруют этот смыв через новую трековую мембрану с меньшим диаметром пор (например, при фильтрации всей пробы воды использовалась мембрана с диаметром пор 2,5 мкм).

Полученный концентрированный смыв сливают из лотка в воронки прибора для фильтрации типа ПВФ-35Б или ПВФ-47Б и фильтруют через аналитические мембраны АТМ с диаметром пор 2,5 мкм.

В зависимости от первоначальной загрязненности воды ее фильтруют, последовательно меняя мембраны.

Исследование полученного концентрата на яйца, личинки гельминтов и цисты патогенных простейших проводят, применяя микроскопию мембран АТМ на стеклах, как описано выше.

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

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

Затем 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 Цилю — Нильсену, промышленного приготовления) или 5 %-ным раствором малахитовой зелени (приготовленным на 10%-ном 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 лучшей адгезии), накрывают покровным стеклом и микроскопируют под иммерсией при увеличении микроскопа: окуляр $10^{\times}$, объектив $90^{\times}$ или $100^{\times}$.

6.1.1 Результат окрашивания

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

6.1.2 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 числу в объеме исследованной пробы.

6.2 Метод люминесцентной микроскопии для выявления цист и ооцист паразитарных простейших

6.2.1 Окраска препаратов для последующей люминесцентной микроскопии

Метод основан на окрашивании препаратов, приготовленных из концентрированного осадка воды (см. 6.1), специальным красителем, молекулы которого под действием ультрафиолета возбуждаются и начинают испускать кванты света в длинноволновой области и создают цветное свечение ооцист криптоспоридий, достигается 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 (любые 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)[1], 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.

6.2.2 Подготовка к окрашиванию флюорохромными красителями

Промывание мазков в процессе окраски следует производить только дистиллированной водой, так как водопроводная вода содержит соединения хлора, которые могут изменять флюоресценцию.

Примечание — При окраске флюорохромными красителями ни в коем случае нельзя подогревать мазки и пользоваться накладками из фильтровальной бумаги.

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

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

6.2.3 Окраска препаратов для световой микроскопии по методу Циля — Нильсена для определения ооцист криптоспоридий

Метод окраски по Цилю — Нильсену основан на использовании нескольких специальных методических приемов:

- окраске 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;
- обесцвечивании (3 мин) — последующая обработка препарата 25 %-ным раствором серной кислоты[2] или 3 %-ным раствором солянокислого спирта[3] приводит к обесцвечиванию красителя, проникшего в структуры, которые после обесцвечивания остаются окрашенными в малиново-красный цвет;
- контрастирующей окраске (1 мин) — обесцвеченные элементы препарата докрашивают метиленовым синим[4] для придания контрастности препарату.

6.2.3.1 Фиксация препарата

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

Фиксацию препарата проводят одним из приведенных способов:

- пинцетом или специальными щипцами берут за боковые концы препарат и трижды 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 35 °С — 38 °С. Затем температуру 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 сразу же окрашиваться.

6.2.3.2 Процедура окраски зафиксированных мазков

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

По ГОСТ 12026 на каждое стекло накладывают полоску фильтровальной бумаги так, чтобы она полностью закрывала мазок, и с избытком наливают раствор карболового фуксина, приготовленного по 6.1. Готовый препарат нагревают над пламенем горелки до легкого появления паров. При подогревании препарата следят за тем, чтобы краска не закипела, а фильтровальная бумага по ГОСТ 12026 не

---

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

[2] 25 %-ный раствор серной кислоты готовят по ГОСТ 4517—2016 (подраздел 4.89).

[3] Спирт солянокислый с концентрацией 3 % по объему готовят путем добавления 3 $см^3$ концентрированной соляной кислоты по ГОСТ 857 или ГОСТ 3118 к 97 $см^3$ 96 %-ного спирта этилового технического по ГОСТ 17299.

[4] 30 $см^3$ насыщенного спиртового раствора метиленового синего (8 г на 100 $см^3$ 96 %-ного спирта этилового технического по ГОСТ 17299) разбавляют дистиллированной водой до 100 $см^3$ и добавляют 1 $см^3$ 1 %-ного едкого калия по ГОСТ 24363.

высыхала. Подогретый препарат оставляют на 5 мин для полного его 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, чтобы с него стекла вода, что предотвращает разбавление следующего реактива.

Препарат обесцвечивают 3 мин одним из обесцвечивающих растворов (по 6.2.3), полностью покрывая всю поверхность мазка.

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

Вновь аккуратно промывают проточной водой, наклоняя каждое стекло, 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 или с применением насадки на микроскоп типа ОптиЛюм, а также допускается использовать для окрашивания специальные наборы реагентов для окраски по Цилю — Нильсену.

6.2.4 Учет результатов окрашивания

Препараты исследуются при не менее чем 100-кратном общем увеличении на наличие ооцист криптоспоридий, которые окрашиваются в разные оттенки ярко-красного (малинового, вишневого) цвета и имеют вид округлых образований диаметром 5—6 мкм с отчетливо видимой оболочкой и структурированным содержанием (можно наблюдать наличие четырех веретенообразных темноокрашенных спорозоитов) на синем (сиреневом) или зеленом фоне, при обнаружении таких объектов в протоколе указывают «Ооцисты *Cryptosporidium parvum в 50 литрах обнаружены»*, при отсутствии характерного окрашивания и округлых образований диаметром 5—6 мкм в протоколе указывают «Ооцисты *Cryptosporidium parvum* в 50 литрах не обнаружены».

Результаты регистрируют в журнале испытаний/исследований.

7 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, например, другие контрастирующие вещества — метящий раствор 4`,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI). Все изменения в проведении реакции регулирует инструкция к применению диагностического набора.

Исследование состоит из нескольких этапов и процедур.

7.1 Этап I. 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 1500 об/мин. Удаляют надосадочную жидкость и осадок исследуют. При этом осадок должен быть не более 1 $см^3$. Ресуспендировать осадок следует 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.

7.2 Этап II. Процедуры связывания и промывки цист лямблий и ооцист криптоспоридий:

а) с помощью градуированной пипетки на 10 $см^3$ по ГОСТ 29227, предварительно смоченной элюирующим буфером, переносят исследуемую пробу (3 $см^3$) в ИМС-пробирку (пробирка с плоской стенкой). Промывают центрифужную пробирку, двукратно внося по 1 $см^3$ дистиллированной воды. Собирают смывы в ИМС-пробирку, в которой уже находится исследуемая проба. Объем раствора в пробирке составит 5 $см^3$. Вносят 5 $см^3$ концентрированного *GrabBuffer A* из диагностического набора в пробирку с ресуспендированным осадком, закрывают пробирку крышкой и переворачивают пробирку три раза;

б) перемешивают весь объем иммуномагнитных суспензий *Giardia-Grab* и *Crypto-Grab* 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 ИМС-пробирку, в которой уже находится порция пробы, подлежащей исследованию;

в) закрепляют ИМС-пробирку, закрытую крышкой, в штативе лабораторного ротатора и перемешивают в течение 1 ч при скорости 18 об/мин;

г) извлекают ИМС-пробирку из ротатора и помещают ее в магнитный штатив *MagnetOn 4T*, при этом плоская сторона пробирки должна быть обращена к магниту штатива и плотно к нему прилегать;

д) осторожно наклоняют пробирку примерно на 90° вместе с магнитным штативом по направлению от дна к крышке пробирки (плоской стороной пробирки — вниз, к столу) и наоборот в течение 3 мин (не переворачивать пробирку с магнитным штативом!).

По мере движения на плоской стороне ИМС-пробирки будет образовываться осадок (налет);

е) не вынимая ИМС-пробирку из магнитного штатива, открывают крышку и осторожно сливают надосадочную жидкость из пробирки, при этом не повредив осадок (налет), сформировавшийся на плоской стороне ИМС-пробирки;

ж) в пробирку добавляют 480 мкл моющего буфера *Grab Buffer B*. Удаляют пробирку из штатива, осторожно вращая пробирку, смывают осадок с плоской стороны пробирки (промывка стенки пробирки с использованием пастеровской пипетки также необходима);

и) помещают в ИМС-пробирку магнитную ручку SepPen и собирают магнитную суспензию на наконечнике ручки, осторожно перемешивая содержимое пробирки в течение примерно 1 мин;

к) удаляют из ИМС-пробирки магнитную ручку SepPen, переворачивая ее, нажимают на кнопку ручки, чтобы убрать магнитный сердечник из наконечника;

л) в пробирку типа *Eppendorf* (объемом 1,5—2 $см^3$) помещают пипеточным дозатором 1 $см^3$ буфера *Grab Buffer B* и переносят ранее собранную суспензию, вращая наконечник ручки SepPen в растворе буфера (при этом магнит убран из наконечника нажатием кнопки ручки).

Примечание — Не сбрасывать наконечник! Этот же наконечник понадобится далее;

м) в ИМС-пробирку добавляют 480 мкл моющего буфера *Grab Buffer B*. Осторожно вращая пробирку, смывают в раствор осадок с плоской стороны пробирки (промывка стенки пробирки с использованием пастеровской пипетки также необходима);

н) помещают в ИМС-пробирку магнитную ручку SepPen и собирают магнитную суспензию на наконечнике ручки, осторожно перемешивая содержимое пробирки в течение примерно 1 мин;

п) удаляют из ИМС-пробирки магнитную ручку SepPen, переворачивая ее, нажимают на кнопку ручки, чтобы убрать магнитный сердечник из наконечника ручки SepPen;

р) переносят собранную суспензию в пробирку типа Eppendorf с первой порцией смыва, вращая наконечник ручки SepPen в растворе буфера (при этом магнит убирают из наконечника нажатием кнопки ручки).

с) повторяют процедуры, указанные в п), р);

т) устанавливают микроцентрифужную пробирку типа Eppendorf в магнитный штатив. Аккуратно покачивают штатив с пробиркой вручную, поворачивая его примерно на 180°, 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;

у) 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.

7.3 Этап III. Процедуры диссоциации:

а) с помощью пипетки добавляют 50 $мм^3$ 0,1н HCl в пробирку типа Eppendorf, затем перемешивают на вортексе в течение 50 с. Затем дают постоять в течение 10 мин при комнатной температуре и наносят в каждую лунку слайда 8 $мм^3$ 1н NaOH;

б) повторяют перемешивание пробирки типа Eppendorf в течение 30 с. Помещают пробирку Eppendorf в магнетон и, прижав ее к магниту, дают отстояться в течение 30 с. Переносят всю подкисленную жидкость из пробирки типа Eppendorf на слайды типа SuperStick (предметные стекла) с 1н NaOH. Необходимо проследить за тем, чтобы магнитные частицы остались на задней стенке пробирки;

в) при каждом выполнении анализа серии проб проводят положительный контроль результатов, для чего используют контрольную суспензию с цистами *Giardia* и ооцистами *Cryptosporidium*. Для этого берут из контрольной суспензии 10 мм^3 пипеткой Пастера и переносят в лунку слайда типа SuperStick (предметного стекла). Слайд предварительно подписывают. Контрольную суспензию аккуратно распределяют по лунке слайда, затем перемещают слайд на лоток до полного высушивания при температуре (36 ± 2) °С;

г) подсушивают слайды типа SuperStick (предметные стекла) с пробами и контролем в термостате при температуре (36 ± 2) °С или на воздухе при комнатной температуре;

д) затем наносят каплю метанола (45—50 мм^3) в каждую лунку слайда типа SuperStick (предметного стекла) с подсушенными пробами и высушивают на воздухе при комнатной температуре.

7.4 Этап IV. Процедура детекции (идентификации) ооцист криптоспоридий и цист лямблий методом иммунофлуоресцентного мечения:

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

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

Пример — Если для работы нужен 1 см^3 готового рабочего раствора иммунореагента, смешивают 50 мкл концентрированного 20X иммунореагента AquaGlo G/C с 950 мкл разбавляющего буфера, входящего в этот диагностический набор. Если нужно получить 20 см^3 готового иммунореагента, смешивают 1 см^3 концентрированного 20X иммунореагента с 19 см^3 разбавляющего буфера, входящего в этот диагностический набор. Хранить рабочее разведение иммунореагента при 4 °С;

б) затем предметные стекла помещают в ячейку влажности в темноте и инкубируют не менее 30 мин при 37 °С или не менее 40 мин при комнатной температуре (допускается более длительное время инкубации);

в) наносят по 50—100 мкл фосфатно-солевого буфера в каждую лунку предметного стекла SuperStick и выдерживают 2 мин;

г) аккуратно с лунок предметного стекла SuperStick удаляют излишек жидкости (с помощью фильтровальной бумаги по ГОСТ 12026 или пастеровской пипетки), при этом избегают перемешивания пробы.

7.5 Этап V. Процедура мечения:

а) чтобы снизить неспецифическую флуоресценцию и выделить фон для лучшего наблюдения яблочно-зеленой флуоресценции цист *G. lamblia* и ооцист *C. parvum*, наносят по одной капле контрастирующего красителя в каждую лунку предметного стекла и выдерживают 1 мин при комнатной температуре;

б) наносят одну каплю фосфатно-солевого моющего буфера (PBS) в каждую лунку и выдерживают 1 мин при комнатной температуре;

в) аккуратно с лунок предметного стекла SuperStick удаляют излишек жидкости (с помощью фильтровальной бумаги или пастеровской пипетки), при этом избегают перемешивания пробы;

г) затем раскладывают предметные стекла на наклонном штативе и подсушивают в слабом токе теплого воздуха;

д) 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 замораживание меченых препаратов! Меченые препараты могут храниться в течение 72 ч и более от выполнения мечения до окончательного завершения исследования и подтверждения результатов исследований.

7.6 Этап VI. Люминесцентная микроскопия

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

7.7 Этап VII. Учет результатов люминесцентной микроскопии

Если в образце обнаружены сверкающие и флуоресцирующие 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 протоколе указывают «Цисты *Lamblia (Giardia) intestinalis в 50 литрах обнаружены», при отсутствии характерного свечения в протоколе указывают «Цисты Lamblia (Giardia) intestinalis в 50 литрах не обнаружены».*

Если в образце обнаружены сверкающие и флуоресцирующие яблочно-зеленым светом объекты, от овальных до сферических (от 2,5 до 5 мкм в диаметре), с ярко подсвеченными краями, то в протоколе указывают «Ооцисты *Cryptosporidium parvum в 50 литрах обнаружены»*, при отсутствии характерного свечения в протоколе указывают «Ооцисты *Cryptosporidium parvum* в 50 литрах не обнаружены».

Результаты регистрируют в журнале испытаний/исследований.

8 Обнаружение цистных форм криптоспоридий и лямблий методом полимеразной цепной реакции

Для выполнения анализа методом ПЦР помещения должны соответствовать ГОСТ ISO 21571—2018 (пункты 5.3.1—5.3.2) или иным нормативным документам, действующими на территории государства, принявшего стандарт, за исключением устройства перечисленных ниже рабочих зон:

а) зона фильтрации образца (получения осадка);

б) зона выделения нуклеиновых кислот;

в) зона постановки и проведения ПЦР;

г) (опционально, если используется электрофоретический метод детекции продуктов реакции) зона работы с продуктами ПЦР.

Для исключения контаминации образцов и ДНК продуктами ПЦР-реакции в разных рабочих зонах следует использовать соответствующие средства индивидуальной защиты, сменяющиеся с соответствующей периодичностью.

Оборудование для выполнения исследований методом ПЦР должно соответствовать требованиям, указанным в ГОСТ ISO 21571—2018 (приложение А, пункты А.3, А.4, А.5 и приложение В, пункт В.2) или иными нормативными документами, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

8.1 Применение метода ПЦР

Позволяет определить целевые последовательности ДНК криптоспоридий и лямблий и провести прямое обнаружение инфекционного паразитарного агента.

8.2 Выделение ДНК из образцов питьевой воды

Подготовку проб питьевой воды для последующего выделения ДНК проводят в соответствии с 6.1.

8.2.1 Выделение ДНК криптоспоридий и лямблий из воды для ПЦР-реакции с применением ЦТАБ

Производят в соответствии с ГОСТ ISO 21571—2018 (приложение А, пункт А.3 «Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстрагирования ДНК на основе ЦТАБ») или иными нормативными документами, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

8.2.2 Выделение ДНК с использованием ДСН, гуанидин-гидрохлорида и диоксида кремния

Производят в соответствии с ГОСТ ISO 21571—2018 (приложение А, пункт А.4 «Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстрагирования ДНК на основе диоксида кремния») или иными нормативными документами, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

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

Проводят в соответствии с ГОСТ ISO 21571—2018 (приложение А, пункт А.5 «Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстрагирования ДНК на основе гуанидина-хлороформа») или иными нормативными документами, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

8.2.4 Выделение ДНК с использованием готовых наборов

Допустимо использовать любые сертифицированные наборы готовых реактивов, предназначенные для выделения общей (неспецифической для какого-либо биологического вида) ДНК, а также наборы, сочетающие первоначальный лизис клеточного материала с дальнейшей преципитацией нуклеиновых кислот (например, типа Рибо-преп или аналогичные), либо сорбцией ДНК на сорбенте в виде взвеси либо колонок (например, «К-сорб», Проба-НК, РеалБест экстракция, ExtractDNA, QIAamp DNA Mini Kit или аналогичные). Экстракцию следует выполнять в соответствии с инструкцией производителя. При первом применении нового набора необходимо провести контрольное выделение ДНК цист лямблий и ооцист криптоспоридий.

8.3 Проведение ПЦР-реакции

8.3.1 Реакционная смесь

Объем реакции в пробе зависит от используемых приборов и расходных материалов. Допускается использование как отдельных реактивов, так и готовых диагностических наборов ПЦР, специфических для определения *Giardia spp* или *Cryptosporidium spp* (например, «РеалБест-Вет ДНК *Cryptosporidium spp*» или аналогичных). Рекомендуется проводить исследование объема пробы не меньше 20 и не больше 50 мкл. Реакционную смесь составляют по инструкции производителя фермента ДНК-полимеразы Taq для всех анализируемых в данном эксперименте проб, включая контрольные образцы, при этом готовят смесь не менее чем для пяти проб по рекомендуемому составу, представленному в таблице 1. Составленная смесь используется сразу или хранится не более нескольких часов в соответствии с протоколом производителя фермента ДНК-полимеразы.

Таблица 1 — Рекомендуемый состав амплификационной смеси (корректируется в соответствии с инструкцией производителя фермента) на 10 проб при объеме пробы 25 мкл[1]

Реактивы с указанием концентрации	Количество добавляемого реактива, мкл	
	На одну пробу	На 10 проб
1 Деионизированная вода	до 20 (необходимо учесть объем ДНК-матрицы[2]) в данном случае 14,5	145
2 Буфер для полимеразной цепной реакции с $MgCl_2$ (10x)	2,5	25
3 Смесь дезоксинуклеотидов (мкл)	0,5	50,0
4 Специфический олигонуклеотид 1 (10 мкМ)	1	30,0
5 Специфический олигонуклеотид 2 (10 мкМ)	1	30,0
6 Taq-полимераза (5 ед./мкл)	0,5	18,0

Примечания

1 При использовании флуоресцентной детекции в реакционную смесь добавляют флуоресцентный интеркалирующий краситель для нуклеиновых кислот (типа SybrGreen, Evagreen и др.) согласно протоколу производителя.

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

Специфические олигонуклеотиды, использующиеся для детекции ДНК криптоспоридий или лямблий, перечислены в таблице 2. Допустимо вместо олигонуклеотидов, указанных в таблице 2, использовать готовые диагностические наборы, специфические для обнаружения ДНК *Giardia spp* или *Cryptosporidium spp* (например, «РеалБест-Вет ДНК *Cryptosporidium spp*» или аналогичные).

Таблица 2 — Специфические олигонуклеотиды для идентификации

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

Тщательно перемешав, реакционную смесь раскапывают по реакционным пробиркам. Реакционные пробирки (объемом 0,2—0,5 $см^3$) необходимо выбирать в соответствии с моделью используемого прибора (термоциклера).

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 известной 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 используют термоциклер без подогрева крышки, в реакционные пробирки добавляют 10—20 мкл минерального масла, чтобы предотвратить испарение проб при нагревании.

8.3.2 Режим реакции ПЦР

Для реакции определения криптоспоридий предусмотрен следующий протокол.

Начальная денатурация 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 использовании детекции продуктов реакции в режиме «реального времени» при задании программы условий амплификации добавляют режим детекции флуоресцентного сигнала в соответствии с инструкцией к используемым реагентам с использованием рекомендованных каналов для флуорофоров.

Допустимо изменять режимы проведения ПЦР реакций в зависимости от применяемых диагностических наборов, реактивов и аппаратуры (термоциклеров) в соответствии с инструкциями производителей, прилагаемыми к готовым диагностическим ПЦР-наборам.

8.4 Детектирование результатов ПЦР

8.4.1 Флуоресценция

Анализ результатов с детекцией в режиме реального времени проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения 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.

8.4.2 Гель-электрофорез

Детекцию результатов ПЦР проводят методом электрофореза в агарозном геле по ГОСТ ISO 21571—2018 (приложение В, пункт В.2 «Метод электрофореза в агарозном геле и окрашивания бромистым этидием») или иными нормативными документами, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

Детектирование продуктов ПЦР криптоспоридии (298 пар нуклеотидов) производят в 1 %-ном агарозном геле (на 100 $см^3$ объема геля: 1 г агарозы на 100 $см^3$ рабочего электрофорезного буфера).

Детектирование продуктов ПЦР лямблии (98 пар нуклеотидов) осуществляют в 2 %-ном агарозном геле (на 100 $см^3$ объема геля: 2 г агарозы на 100 $см^3$ рабочего электрофорезного буфера).

Электрофорез проводят до момента, когда бромфеноловый синий краситель, добавленный в пробу, отходит от лунки на расстояние около 5 см.

Параллельно с пробами исследуемых образцов наносят контрольные пробы и эталонный маркер молекулярных весов ДНК, содержащий фрагменты ДНК, по размеру близкие к анализируемым (около 400—500 для криптоспоридий, около 100 для лямблий).

Анализ результатов электрофореза проводят визуально, просматривая гель в ультрафиолетовом свете, фотографируют гель с помощью гель-документирующей системы. О результатах судят по наличию окрашенных полос в дорожках геля.

8.5 Интерпретация результатов ПЦР

Тестирование считается прошедшим корректно, если:

- 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);
- в пробе с отрицательным контролем отсутствуют продукты реакции ожидаемого размера (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 считается 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 считается установленным, если на электрофорезном геле в данной пробе отсутствуют продукты реакции или значение Ct равно или меньше значения Ct для пробы с отрицательным контролем (учитывается инструкция к используемым реактивам).

Если результаты тестирования некорректны, предпринимают следующие действия:

- в случае неверных результатов для положительного контроля необходимо повторить ПЦР-тестирование и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК анализируемого возбудителя;
- в случае неверных результатов для отрицательного контроля тестирование повторяют для всех анализируемых проб, начиная с выделения ДНК;
- если результаты анализа не удовлетворяют критериям, указанным в инструкции производителя прибора или набора реактивов, поступают согласно инструкции производителя прибора или набора реактивов;
- 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 повторяется для конкретных образцов, начиная с выделения ДНК.

Приложение А
(рекомендуемое)

Приготовление смеси Никифорова

Смешивают равные части эфира и этилового технического спирта 96 %-ного по ГОСТ 17299 или ГОСТ 5962.

Пример — В широкогорлую емкость наливают 100 см^3 эфира и 100 см^3 96 %-ного спирта, затем погружают туда чистые предметные стекла для обезжиривания.

Приложение Б
(рекомендуемое)

Калибровка окулярной шкалы микроскопа

Помещают микрометр на предметный столик микроскопа, включают проходящий свет и фокусируют изображение микрометра. Измерительная линейка, которая обычно имеет 1 мм в длину, подразделяется на 100 единиц, каждая единица имеет 10 мкм в длину. Регулируют предметный столик микроскопа и окулярную шкалу таким образом, чтобы «нулевая» линия окулярной шкалы точно накладывалась на «нулевую» линию микрометра. Не изменяя регулировки столика, находят точку как можно дальше от двух «нулевых» линий, если линия на окулярной сетке снова точно накладывается на линию микрометра. Определяют количество делений на окулярной шкале и количество микрометров на микрометре между двумя точками наложения. Делят количество микрометров на количество делений окулярной шкалы, чтобы рассчитать количество микрометров на деление окулярной шкалы.

Пример — Если 40 делений окулярной шкалы точно измеряют 100 мкм на микрометре, то одно деление на шкале измеряет 2,5 мкм.

Повторяют эту процедуру для каждого объектива. Записывают эту информацию и хранят вблизи микроскопа. Калибровка микроскопа должна осуществляться не реже одного раза в год.

Приложение В
(справочное)

Информация о применяемых технических регламентах и нормативных правовых актах в государствах — участниках СНГ

Наименование технического регламента или нормативного правового акта	Государство — участник СНГ
Технический регламент ЕАЭС 044/2017 «О безопасности упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду»	AM, BY, KZ, KG, RU

УДК 663.6:006.3:614.777:663.646:613.38:006.354 МКС 13.060.20

Ключевые слова: санитарно-паразитологические исследования, цисты лямблий, ооцисты криптоспоридий, яйца и личинки гельминтов, последовательная фильтрация, люминесцентная микроскопия, ПЦР-тестирование

Редактор *З.А. Лиманская*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 29.05.2025. Подписано в печать 11.06.2025. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,12.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

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

gost.e-ecolog.ru