ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСТ ISO 15553—2017

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Выделение из воды и идентификация ооцист криптоспоридий и цист лямблий

ЯКАСЦЬ ВАДЫ

Вылучэнне з вады і ідэнтыфікацыя аацыст крыптаспарыдый і цыст лямблій

(ISO 15553:2006, IDT)

Издание официальное



Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации по переписке (протокол № 98-П от 20 апреля 2017 г.)

За принятие стандарта 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	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 15553:2006 «Качество воды. Выделение из воды и идентификация ооцист криптоспоридий и цист лямблий» («Water quality — Isolation and identification of Cryptosporidium oocysts and Giardia custs from water»).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 4 «Микробиологические методы» технического комитета по стандартизации ISO/TC 147 «Качество воды» Международной организации по стандартизации (ISO)

5 ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 31 июля 2017 г. № 63 непосредственно в качестве государственного стандарта Республики Беларусь с 1 июля 2018 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Госстандарт, 2017

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Содержание

Введение IV
1 Область применения 1
2 Термины и определения 1
3 Сущность метода 1
4 Реактивы 2
5 Оборудование 3
6 Отбор и транспортирование проб 5
7 Методика проведения испытания 6
8 Методика контроля качества проведенного испытания 13
9 Представление результатов испытания 13
Приложение A (обязательное) Приготовление реактивов 14
Приложение B (справочное) Концентрирование ооцист и цист в небольших объемах (10 л) воды 16
Приложение C (справочное) Калибровка окулярной шкалы микроскопа 21
Приложение D (справочное) Подготовка к проведению положительного контроля и теста на определение эффективности выделения 22
Приложение E (справочное) Примеры эффективности различных методов 25
Приложение F (справочное) Альтернативные методы 28
Приложение G (справочное) Дополнительные сведения о криптоспоридиях и лямблиях 29
Приложение H (справочное) Сведения об изготовителях 30
Библиография 34

Введение

Криптоспоридии и лямблии — простейшие паразиты, которые могут вызвать кишечные заболевания у людей. Оба организма характеризуются способностью выживать в водной среде. Криптоспоридии, в частности, устойчивы к хлору в концентрациях, используемых при обработке питьевой воды и воды в плавательных бассейнах. Следовательно, отсутствие вегетативных бактерий как индикаторов фекального загрязнения, не обязательно указывает на отсутствие ооцист криптоспоридий или цист лямблий. Методы, установленные в настоящем стандарте, могут быть использованы для определения присутствия ооцист криптоспоридий и/или цист лямблий в водных ресурсах. Методики были отобраны на основе разработанных методов и публикации данных, полученных на основе экспертной оценки. Все методики проходили дополнительный отбор, при котором была учтена сопоставимость результатов, полученных при применении различных реактивов и методов выявления организмов.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

КАЧЕСТВО ВОДЫ
Выделение из воды и идентификация ооцист криптоспоридий и цист лямблий

ЯКАСЦЬ ВАДЫ
Вылучэнне з вады і ідэнтыфікацыя аацыст крыптаспарыдый і цыст лямблій

Water quality
Isolation and identification of Cryptosporidium oocysts and Giardia custs from water

Дата введения 2018-07-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод выявления и подсчета ооцист криптоспоридий и цист лямблий в воде. Метод применим для исследования поверхностных и грунтовых вод, очищенных вод, минеральных вод, вод в плавательных бассейнах, аквапарках и других местах досуга.

Метод не обеспечивает идентификацию на уровне видов, источника происхождения видов или определение жизнеспособности или инвазионной способности любой ооцисты криптоспоридий или цисты лямблий, которые могут присутствовать в воде. Методики проведения испытания предназначены для использования опытными специалистами, имеющими соответствующую квалификацию и регулярно принимающими участие в испытаниях, направленных на обеспечение безопасности воды.

Примечание — Может наблюдаться присутствие организмов, схожих с криптоспоридиями или лямблиями по структуре. Такие организмы могут быть ошибочно приняты за ооцисты или цисты. Результаты следует анализировать с осторожностью. В случае, если есть сомнения в идентификации ооцист или цист или если получен необычно высокий результат, рекомендуется предоставить предметные стекла специалистам из других лабораторий для исследования с целью подтверждения или опровержения полученных данных.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **криптоспоридии** (Cryptosporidium): Простейшие паразиты, которые концентрируются в воде и выделяются из проб воды методами, установленными в настоящем стандарте, вступающие в реакцию со специфическими антителами к криптоспоридиям и имеющие типичные морфологические характеристики, описанные в 7.4.

Примечание — Более полное определение паразита и различных генотипов и видов содержится в приложении G.

2.2 **лямблии** (Giardia): Простейшие паразиты, которые концентрируются в воде и выделяются из проб воды методами, установленными в настоящем стандарте, вступающие в реакцию со специфическими антителами к лямблиям и имеющие типичные морфологические характеристики, описанные в 7.4.

Примечание — Более полное определение паразита и различных видов содержится в приложении G.

3 Сущность метода

3.1 Концентрирование проб воды

Выделение криптоспоридий и лямблий из воды требует применения методики, которая позволяет уменьшить объем пробы, при этом сохраняя все ооцисты и цисты. Методика концентрирования пробы воды зависит от анализируемого типа воды, объема пробы и количества взвешенных частиц в пробе. В настоящем стандарте установлены две методики концентрирования проб воды различных объемов, используя фильтрацию с помощью капсульных фильтров и элюирование с последующим низкоскоростным центрифугированием (см. 7.1). Дополнительные методы выделения ооцист и цист из малых объемов воды или очень мутных вод приведены в приложении В. Примеры эффективности различных методов приведены в приложении Е.

Издание официальное

Таблица 1 — Мембранные фильтры/системы фильтрации, используемые для концентрирования проб воды

Мембранные фильтры/система фильтрации	Применение
Pall Envirochek™ STD [a]	Для концентрирования проб воды объемом 10–200 л (или более)
Pall Envirochek™ HV	Для концентрирования проб воды объемом 10–1000 л
IDEXX Filta-Max®	Для концентрирования проб воды объемом 10–1000 л
[a] Некоторые лаборатории с успехом используют для больших объемов воды, хотя в инструкции изготовителя предусмотрено только использование для объемов воды до 200 л.	

3.2 Очистка и дальнейшее концентрирование

После концентрирования взвешенных частиц из фильтрованных элюатов ооцисты и цисты изолируют посредством иммуномагнитного разделения (IMS) (см. 7.2). Ооцисты и цисты прикрепляют к парамагнитным гранулам, покрытым специфическими антителами, гранулы отделяют от нежелательных взвешенных частиц с использованием магнита, а затем ооцисты и цисты отделяют от гранул, используя кислоту, и нейтрализуют щелочью, прежде чем будет осуществлено иммунное окрашивание.

3.3 Выявление криптоспоридий и лямблий

После IMS организмы метят моноклональным антителом (mAb), конъюгированным с флуорохромом, как правило, флуоресцеином изотиоцианатом (FITC). Кроме того, любой ядерный материал метят красителем для нуклеиновой кислоты для облегчения идентификации (см. 7.3). Затем каждую пробу исследуют на присутствие меченых ооцист криптоспоридий и цист лямблий (Giardia) с использованием эпифлуоресцентной микроскопии по методу дифференциально-интерференционного контраста (DIC) (см. 7.4).

4 Реактивы

4.1 Реактивы, необходимые для элюирования капсульных фильтров Pall Envirochek™ STD [1)]

4.1.1 **Деионизированная вода,** фильтрованная по месту использования через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

4.1.2 **Очищающее вещество лаурет 12**.

4.1.3 **Трис-буфер,** pH 7,4 (см. А.1.1).

4.1.4 **Раствор ЭДТА** концентрацией 0,5 моль/л, pH 8,0 (см. А.1.2).

4.1.5 **Пеногаситель А**.

4.1.6 **Элюирующий буфер** (см. А.1.3).

4.2 Реактивы, необходимые для элюирования капсульных фильтров Pall Envirochek™ HV [1)]

4.2.1 **Деионизированная вода,** фильтрованная по месту использования через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

4.2.2 **Буфер предварительной обработки** (см. А.1.4).

4.2.3 **Очищающее вещество лаурет 12.**

4.2.4 **Трис-буфер,** pH 7,4 (см. А.1.1).

4.2.5 **Раствор ЭДТА** концентрацией 0,5 моль/л, pH 8,0 (см. А.1.2).

4.2.6 **Пеногаситель А**.

4.2.7 **Элюирующий буфер** (см. А.1.3).

4.3 Реактивы, необходимые для элюирования фильтров IDEXX Filta-MAX® [1)]

4.3.1 **Фосфатно-солевой буфер (PBS)** (см. А.2.1).

4.3.2 Полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат (твин 20)

Хранят при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 1 года.

4.3.3 **Элюирующий буфер** (см. А.2.2).

[1)] Все продукты и реактивы являются примерами подходящей продукции, имеющейся в продаже. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой данной продукции со стороны ISO.

4.4 Реактивы, используемые при концентрировании проб воды и выявлении криптоспоридий и лямблий

4.4.1 **Метанол** аналитической степени чистоты.

4.4.2 Магнитные микроносители для выявления криптоспоридий и лямблий

Срок годности устанавливает изготовитель.

Примечание — Приложение Н содержит сведения об изготовителях.

4.4.3 Флуоресцентно меченые моноклональные антитела (mAb) к криптоспоридиям и лямблиям

Хранят при температуре (5 ± 3) °С. Срок годности устанавливает изготовитель. Красители готовят из концентрированного материала с использованием разбавителя, поставляемого изготовителем. Готовый раствор хранят при температуре (5 ± 3) °С не более 6 мес.

Примечание — Приложение Н содержит сведения об изготовителях.

4.4.4 Заливочная среда для иммунофлуоресценции (см. А.3.1)

Примечание — Приложение Н содержит сведения об изготовителях.

4.4.5 4',6'-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид безводный (DAPI)

Хранят в соответствии с инструкциями изготовителя.

Срок годности изготовитель указывает на каждой упаковке.

4.4.6 **Исходный раствор DAPI** (см. А.3.2).

4.4.7 **Рабочий раствор DAPI** (см. А.3.3).

4.4.8 **Фосфатно-солевой буфер (PBS)** (см. А.2.1).

4.4.9 Масло иммерсионное нефлуоресцирующее

Хранят при комнатной температуре (20 ± 5) °С.

4.4.10 Исходные суспензии ооцист криптоспоридий (Cryptosporidium parvum) и цист лямблий (Giardia lamblia)

Хранят суспензию при температуре (5 ± 3) °С. Не допускают замерзания суспензий и регулярно проверяют их качество. Желательно использовать суспензии ооцист и цист, хранящиеся не более 3 мес. Исходные суспензии проверяют под микроскопом, чтобы подтвердить, что они являются монодисперсными, и их отбраковывают при выявлении комков или скоплений. Кроме того, если окрашивание mAb и DAPI становится слабым, и ооцисты становятся деформированными, суспензии также отбраковывают.

4.4.11 **Среда для хранения паразитов** (см. А.3.4).

5 Оборудование

Используют стандартное лабораторное оборудование, в том числе перечисленное ниже.

5.1 Оборудование, необходимое для концентрирования проб с использованием Pall Envirochek™ STD или HV [2)]

5.1.1 **Капсула для проб,** Envirochek™ STD или HV (Pall).

5.1.2 **Перистальтический насос** с номинальной подачей 2 л/мин.

5.1.3 **Силиконовые трубки** для использования с перистальтическим насосом.

5.1.4 **Емкость для мембранных фильтров, используемых для посева,** вместимостью 10 л, при использовании метода мембранных фильтров.

5.1.5 **Встряхиватель,** имитирующий движение запястья, с держателями для встряхивания капсул для проб Envirochek™ STD или HV.

5.1.6 **Центрифуга,** обеспечивающая центробежное ускорение не менее 1 100 g.

5.1.7 **Центрифужные пробирки,** конические, пластиковые, с завинчивающейся пробкой, вместимостью 250 мл.

[2)] Все продукты и реактивы являются примерами подходящей продукции, имеющейся в продаже. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой данной продукции со стороны ISO.

5.1.8 **Центрифужные пробирки,** конические, пластиковые, с завинчивающейся пробкой, вместимостью 50 мл.

Примечание — Наличие расходомера и ограничителя потока будет необходимо при отборе проб воды при осуществлении фильтрации прямо на рабочем участке.

5.2 Специальный прибор, необходимый для концентрирования проб с использованием IDEXX Filta-Max® [2)]

5.2.1 **Корпус для проб** IDEXX Filta-Max®.

5.2.2 **Модуль отбора проб** IDEXX Filta-Max®.

5.2.3 **Мембраны фильтра** IDEXX Filta-Max®.

5.2.4 **Лабораторный насос** для нагнетания, создающий давление 500 кПа (5 бар).

5.2.5 **Перистальтический насос** с номинальной подачей 4 л/мин.

5.2.6 **Силиконовые трубки** для использования с перистальтическим насосом.

5.2.7 **Емкость для мембранных фильтров, используемых для посева,** вместимостью 10 л, при использовании метода мембранных фильтров.

5.2.8 **Установка для промывки** автоматическая или ручная и комплект зажимов для установки для промывки IDEXX Filta-Max®.

5.2.9 **Вакуумная установка,** включающая пластиковый ручной насос, емкость для смывов, шланг и магнитную мешалку IDEXX Filta-Max®.

5.2.10 **Комплект трубок,** включающий пробирку для элюирования и средний переходный отсек, трубку концентратора и базу с линейным выводом и стальным стержнем IDEXX Filta-Max®.

5.2.11 **Мембрана** для комплекта трубок.

5.2.12 **Пластиковый мешок** для промывки мембраны.

5.2.13 **Центрифуга,** обеспечивающая центробежное ускорение не менее 1 100 g.

5.2.14 **Центрифужные пробирки,** конические, пластиковые, вместимостью 50 мл.

5.2.15 **Пинцет.**

Примечание — Наличие расходомера и ограничителя потока будет необходимо при отборе проб воды при осуществлении фильтрации прямо на рабочем участке.

5.3 Основное оборудование [2)].

5.3.1 **Термостат,** поддерживающий температуру (36 ± 2) °С.

5.3.2 **Холодильник,** поддерживающий температуру (5 ± 3) С.

5.3.3 **Магнитная мешалка** и магнитный элемент.

5.3.4 **Вортекс-миксер**.

5.3.5 **Промывалки** полипропиленовые вместимостью 250 мл.

5.3.6 **Микропипетки** с регулируемым объемом дозы: 1–10 мкл с наконечниками объемом 1–10 мкл; 20–200 мкл с наконечниками объемом 10–200 мкл; 200–1 000 мкл с наконечниками объемом 100–1 000 мкл.

5.3.7 **pH-метр**.

5.3.8 **Концентратор магнитных частиц** с соответствующими трубками.

5.3.9 **Луночные предметные стекла** с особым гидрофобным покрытием и покровным стеклом.

5.3.10 **Эпифлуоресцентный микроскоп** 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), оптическим устройством для микроскопии по методу дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и окулярной шкалой. Общее увеличение — 1 000 ×.

5.3.11 **Микрометр предметного столика микроскопа,** 1 мм, с нанесенными делениями на 100 единиц.

5.3.12 **Окулярная шкала** с нанесенными делениями на 100 единиц.

5.3.13 **Камера влажности**, например состоящая из герметично запечатанной пластиковой емкости, содержащей влажные бумажные полотенца, на которых помещают предметные стекла.

5.3.14 **Емкости вместимостью 10 л** с ценой деления 1 л.

5.3.15 **Предметное стекло гемоцитометра Нейбауэра**.

[2)] Все оборудование является примером подходящей продукции, имеющейся в продаже. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой данной продукции со стороны ISO.

6 Отбор и транспортирование проб

Размер пробы зависит от типа воды, которую будут отбирать в качестве пробы, цели анализа, требуемой чувствительности и скорости получения результата. Пробы малого объема воды (10–100 л) могут быть отобраны на месте, быстро транспортированы и проанализированы, в то время как большие по объему пробы воды (1 000 л) требуют фильтрации прямо на рабочем участке. Фильтрация может занять до 24 ч из-за ограниченной скорости потока через фильтр. Пробы малого объема воды (10 л) указывают на качество воды в момент отбора проб, тогда как большие объемы воды (1 000 л) указывают на качество воды в определенный промежуток времени. Так как концентрации криптоспоридий и лямблий, как правило, очень низки, то требуются большие по объему пробы воды (10–1 000 л). Необходимый объем пробы также может быть установлен в конкретных документах.

Для фильтрации больших объемов подключают встроенное устройство к водопроводной сети, убедившись, что поток через фильтр идет в направлении, указанном на корпусе изготовителем. Фильтр должен быть с расходомером, показания которого считывают до и после отбора проб. Если фильтр необходимо транспортировать в лабораторию, то его запечатывают после отбора проб концевыми пробками, предоставленными изготовителем. Следует соблюдать должную осторожность, для того чтобы скорость потока не превышала скорость, рекомендованную изготовителями фильтрационных устройств.

Пробы небольшого объема отбирают на глаз и при транспортировании в лабораторию хранят их в темном месте при комнатной температуре. После того как пробы доставлены в лабораторию, их хранят при температуре (5 ± 3) °С, кроме тех случаев, когда существует необходимость незамедлительного анализа. Пробы должны быть проанализированы предпочтительно в течение 24 ч после сбора и не позже чем через 4 сут.

Если пробы фильтруют на месте, то фильтры при транспортировании хранят в темном месте при комнатной температуре. После того как пробы доставлены в лабораторию, их хранят при температуре (5 ± 3) °С, кроме тех случаев, когда существует необходимость незамедлительного анализа. Пробы должны быть проанализированы предпочтительно в течение 24 ч после сбора и не позже чем через 4 сут. Если фильтры хранят при температуре (5 ± 3) °С, то им дают возможность нагреться до комнатной температуры перед началом элюирования.

На сегодняшний день отсутствует информация о поведении криптоспоридий и лямблий во время хранения пробы или фильтра, поэтому предпочтительно исследовать пробы сразу же после отбора.

На этапе предварительной подготовки используют полифосфат натрия до ввода элюирующего буфера для улучшения удаления взвешенных частиц в фильтре.

Примечание 1 — Фильтр Envirochek™ STD состоит из гофрированной мембраны из полиэфирсульфона, герметически закрытой в поликарбонатной гильзе. Фильтр установлен на широкую основу из полипропилена. Такая основа поставляется в комплекте с двумя торцевыми заглушками, которые могут быть использованы для герметизации фильтра. Фильтр может быть подключен к системе водоснабжения путем присоединения к ребристому входу. Направление потока через фильтр должно быть четко обозначено. Поток через фильтр не должен превышать 2,3 л/мин, а дифференциальное давление через фильтр не должно превышать 210 кПа (2,1 бар).

Примечание 2 — Капсула Envirochek™ HV состоит из полиэфирной трековой мембраны с размером пор 1 мкм, помещенной в корпус из поликарбоната. Полиэфирную мембрану приклеивают непосредственно на полипропиленовую основу, которая существенно повышает прочность по сравнению со стандартной основой Envirochek ™ STD. Прочность на разрыв корпуса капсулы превышает 1 000 кПа (10 бар), а дифференциальное давление через мембрану фильтра составляет до 410 кПа (4,1 бар). Каждая капсула Envirochek™ HV имеет 100%-ную надежность, испытываемую после сборки для обеспечения производительности продукта. Полезная площадь фильтрации Envirochek™ HV составляет 1 300 см^2. Фильтр снабжен двумя торцевыми заглушками, которые могут быть использованы, для того чтобы герметично закрыть фильтр для последующего транспортирования в лабораторию. Фильтр может иметь этикетку с защитой от вскрытия, содержащую уникальный идентификационный номер. Поток через Envirochek™ HV не должен превышать 3,4 л/мин.

Примечание 3 — Фильтр Filta-Max® состоит из модуля пенопластового фильтра, содержащего 60 открытых дисков из сетчатой пены с внешним диаметром 55 мм и внутренним диаметром 15 мм. Диски находятся между двумя упорами и сжаты крепежным болтом, чтобы дать номинальную пористость в 1 мкм. Фильтрующий модуль помещен в корпус фильтра, который имеет винтовую крышку и уплотнитель. Корпус фильтра имеет впускное и выпускное отверстия с зазубринами из нержавеющей стали. Проба поступает через крышку корпуса и выходит через основание. Вода течет в корпус через кольца из сжатой пены в центр модуля и через выпускное отверстие. Удаление крепежного болта на стадии элюирования позволяет фильтру расширяться во время промывки. Корпус фильтра поставляется с двумя инструментами для удаления крышек и двумя резиновыми пробками, чтобы запечатать отобранную пробу. После отбора проб фильтр Filta-Max® хранят и транспортируют влажным. Если хранят или транспортируют фильтр в корпусе фильтра, то входное и выходное отверстия корпуса

должны быть надежно закупорены предусмотренными резиновыми пробками. При транспортировании или хранении модуль фильтра может быть извлечен из корпуса и помещен в асептических условиях в герметичную емкость вместе с несколькими дополнительными миллилитрами деионизированной воды.

7 Методика проведения испытания

7.1 Концентрирование

7.1.1 Фильтрация Pall Envirochek™ STD

Фильтр закрепляют в вертикальном положении с установленным наверху белым пробоотборным клапаном. Удаляют две концевые пробки и позволяют жидкости вытечь через фильтр. Нижнюю концевую пробку возвращают на место, заправляют капсулу элюирующим буфером (см. 4.1.6) через входной патрубок до тех пор, пока он не покроет фильтр примерно на 1 см. Верхнюю концевую пробку возвращают на место и закрепляют капсулу горизонтально во встряхивателе (см. 5.1.5) с белым пробоотборным клапаном в 12-часовом положении. Встряхивают при (600 ± 25) об/мин в течение 5 мин ± 30 с.

Удаляют верхнюю концевую пробку и выливают смывы в коническую центрифужную пробирку вместимостью 250 мл (см. 5.1.7). Добавляют дополнительную аликвоту элюирующего буфера в капсулу, возвращают на место верхнюю концевую пробку и еще встряхивают в течение 5 мин ± 30 с. Обеспечивают, чтобы белый пробоотборный клапан находился в 3-часовом или 9-часовом положении.

Через 5 мин встряхивания удаляют верхнюю концевую пробку, сливают смывы в центрифужную пробирку вместимостью 250 мл и центрифугируют при 1 100 × g в течение 15 мин без перерыва во время фазы замедления. Записывают объем осадка (объем сухого остатка) сразу же после центрифугирования.

Возможно, второй этап центрифугирования должен будет осуществляться в центрифужной пробирке вместимостью 50 мл для измерения объема. Кроме того, центрифужные пробирки вместимостью 50 мл могут быть использованы для концентрирования взвешенных частиц, элюированных из фильтра.

Используя пипетку, осторожно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуума, не превышающего 20 кПа (0,2 бар), оставляя 2–5 мл жидкости над осадком. Если нет видимого осадка, принимают дополнительные меры предосторожности, чтобы избежать засасывания ооцист и цист при осуществлении данной процедуры.

В центрифужную пробирку добавляют деионизированную воду, чтобы довести объем содержимого пробирки до 9 мл. Встряхивают содержимое центрифужной пробирки в течение 10–15 с, чтобы ресуспендировать осадок, а затем хранят пробы при температуре (5 ± 3) °С для дальнейшего IMS или переходят непосредственно к методике, установленной в 7.2.

Если объем осадка превышает объем, рекомендованный изготовителем испытательного комплекта аппаратуры для IMS, то пробу центрифугируют второй раз в пробирке, которая позволит измерить объем осадка с высокой степенью точности. Пробу разделяют на аликвоты для IMS таким образом, чтобы каждая аликвота содержала максимальный объем осадка, рекомендованный изготовителем, и доводят каждую аликвоту до 9 мл деионизированной водой.

7.1.2 Фильтрация Pall Envirochek™ HV

Фильтр закрепляют в вертикальном положении с установленным наверху белым пробоотборным клапаном. Удаляют две концевые пробки и позволяют жидкости вытечь через фильтр. Нижнюю концевую пробку возвращают на место, заправляют капсулу буфером предварительной обработки (см. 4.2.2) через входной патрубок до тех пор, пока он не покроет фильтр примерно на 1 см. Верхнюю концевую пробку возвращают на место и закрепляют капсулу горизонтально во встряхиватель (см. 5.1.5) с белым пробоотборным клапаном в вертикальное положение. Встряхивают при (600 ± 25) об/мин в течение 5 мин ± 30 с.

Фильтр закрепляют в вертикальном положении с установленным наверху белым пробоотборным клапаном. Удаляют две концевые пробки и позволяют жидкости вытечь через фильтр. Нижнюю концевую пробку возвращают на место, заправляют капсулу, как описано выше, деионизированной водой (см. 4.2.1). Верхнюю концевую пробку возвращают на место и промывают мембрану, осторожно вращая фильтр в течение 30 с. Фильтр закрепляют в вертикальном положении, удаляют две концевые пробки и позволяют жидкости вытечь через фильтр.

Нижнюю концевую пробку возвращают на место, заправляют капсулу элюирующим буфером (см. 4.2.7) через входной патрубок до тех пор, пока он не покроет фильтр примерно на 1 см. Верхнюю концевую пробку возвращают на место и закрепляют капсулу во встряхивателе (см. 5.1.5) с белым пробоотборным клапаном в 12-часовом положении. Встряхивают при (600 ± 25) об/мин в течение 5 мин ± 30 с.

Верхнюю концевую пробку удаляют и наливают смывы в коническую центрифужную пробирку вместимостью 250 мл (см. 5.1.7). Добавляют дополнительную аликвоту элюирующего буфера в капсулу, верхнюю концевую пробку возвращают на место и встряхивают еще в течение 5 мин ± 30 с. Обеспечивают, чтобы белый пробоотборный клапан находился в 4-часовом положении. Через 5 мин встряхивания фильтр поворачивают таким образом, чтобы белый клапан находился в 8-часовом положении, и встряхивают еще в течение 5 мин.

Верхнюю концевую пробку удаляют и декантируют смывы в центрифужную пробирку вместимостью 250 мл и центрифугируют при центробежном ускорении 1 100 g в течение 15 мин без торможения во время фазы замедления. Записывают объем осадка (объем сухого остатка) сразу же после центрифугирования.

Возможно, второй этап центрифугирования должен будет осуществляться в центрифужной пробирке вместимостью 50 мл для измерения объема. Кроме того, центрифужные пробирки вместимостью 50 мл могут быть использованы для концентрирования взвешенных частиц, элюированных из фильтра.

Используя пипетку, осторожно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуума, не превышающего 20 кПа (0,2 бар), оставляя 2–5 мл жидкости над осадком. Если нет видимого осадка, принимают дополнительные меры предосторожности, чтобы избежать засасывания ооцист и цист при осуществлении данной процедуры.

В центрифужную пробирку добавляют деионизированную воду, чтобы довести объем содержимого пробирки до 9 мл. Встряхивают содержимое центрифужной пробирки в течение 10–15 с, чтобы ресуспендировать осадок и затем либо ставят пробу на хранение при температуре (5 ± 3) °С для будущего проведения IMS или сразу переходят к методике, установленной в 7.2.

Если объем осадка превышает объем, рекомендованный изготовителем испытательного комплекта IMS, повторно центрифугируют пробу в пробирке, которая позволяет точно измерить объем осадка. Разделяют пробу на аликвоты для IMS таким образом, чтобы каждая аликвота имела объем, не превышающий максимального объема осадка, рекомендованного изготовителем, и доводят каждую аликвоту до 9 мл фильтрованной деионизированной водой.

Примечание — Нагрев всех элюирующих растворов до температуры 37 °С улучшает процесс удаления взвешенных частиц. Увеличение скорости встряхивания до 900 об/мин также содействует элюированию.

7.1.3 Фильтрация IDEXX Filta-Max®

Аппарат для элюирования состоит из верхней и нижней промывочных пробирок (см. 5.2.10), установки для промывки (см. 5.2.8) и вакуумной установки (см. 5.2.9), предназначенной для уменьшения объема элюата через мембрану (см. 5.2.11) до 50 мл. Процедуру элюирования проводят нижеуказанным образом.

Мембранный фильтр (шероховатой поверхностью наверх) помещают в основание нижней промывочной пробирки и устанавливают пробирку в основание. Необходимо убедиться, что мембрана закреплена надежно и что пробка в основании закрыта.

Отвинчивают крышку корпуса, используя инструменты, удаляют фильтрующий модуль из корпуса и ввинчивают его в головку плунжера установки для промывки. При наличии остаточной воды в корпусе фильтра ее сливают в нижнюю промывочную пробирку.

Помещают верхнюю часть промывочной пробирки в зажим установки для промывки и опускают фильтрующий модуль через пробирку.

Используя предусмотренный ключ, удаляют крепежный винт из модуля фильтра. Фильтр должен начать расширяться. Ввинчивают стальную пробирку в основание верхней промывочной пробирки.

Наливают около 600 мл элюирующего буфера в нижнюю промывочную пробирку и пропускают небольшой объем буфера через мембрану, открыв пробку в основании нижней промывочной пробирки. Нижнюю промывочную пробирку крепят к верхней промывочной пробирке. Плунжер накачивают и откачивают четыре или пять раз, чтобы помочь фильтрующему модулю расшириться. Если фильтр не расширяется, то его оставляют намокать в элюирующем буфере в течение 5 мин, периодически накачивая плунжер, чтобы содействовать расширению фильтра.

Плунжер накачивают и откачивают, до тех пор пока он не переместится 20 раз. Нижнюю промывочную пробирку отсоединяют, нажав на плунжер 5 раз, чтобы удалить остатки элюирующего буфера из поролоновых колец. Пробирку из нержавеющей стали промывают элюирующим буфером и закрывают резиновой пробкой небольшого размера, предусмотренной изготовителем. Пробирку для элюирования помещают на магнитную мешалку. Магнитный элемент мешалки вставляют в верхнюю часть пробирки для элюирования и устанавливают мешалку таким образом, чтобы жидкость в пробирке могла перемешиваться. Присоединяют вакуумный насос и открывают пробку в основании промывочной пробирки.

Если проба имеет небольшую мутность и емкость для смывов располагается под промывочной пробиркой, то жидкость будет течь самотеком через мембрану. Для мутных жидкостей применяют вакуум не больше чем 40 кПа (30 см ртутного столба), чтобы фильтровать смывы через мембрану.

Если мембрана засоряется, то смывы декантируют в чистую емкость, удаляют мембрану в пластмассовый пакет (см. 5.2.12) и устанавливают свежую мембрану в нижнюю промывочную пробирку гладкой поверхностью наверх.

Жидкость выливают обратно в промывочную пробирку, промывая емкость, и продолжают процесс фильтрации. Каждую мембрану промывают в отдельном пакете.

Если смывы почти достают до магнитного элемента мешалки (примерно 30 мл), пробку закрывают и отсоединяют вакуумный насос и влагоотделитель. Жидкость, находящуюся в промывочной пробирке, выливают в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл (см. 5.2.14).

Добавляют дополнительные 600 мл элюирующего буфера в нижнюю промывочную пробирку и присоединяют ее к установке для промывки. Повторяют процедуру промывки, используя только 10 ходов плунжера. Удаляют нижнюю промывочную пробирку, промывая пробирку из нержавеющей стали, помещают ее на магнитную мешалку и крепят магнитный элемент. Элюат концентрируют, как описано выше, до тех пор пока не останется около 2,5 см выше магнитного элемента. Добавляют содержимое первого элюирования в промывочную пробирку и продолжают сокращение объема элюата, до тех пор пока он снова не поднимется на половину магнитного элемента. Мешалку извлекают и выливают элюат (около 30 мл) в центрифужную пробирку.

Промывочную пробирку откручивают от основания и осторожно снимают мембранный фильтр остроконечным пинцетом. Фильтр опускают в пакет, в котором находится 5 мл элюирующего буфера. Пакет герметично закрывают и промывают фильтр, потерев между пальцами на протяжении (60 ± 10) с. Пипеткой отсасывают смывы и добавляют в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл. Повторяют процедуру промывания и добавляют вторые смывы в центрифужную пробирку. Доводят объем в пробирке до 50 мл элюирующим буфером.

Центрифужную пробирку вместимостью 50 мл центрифугируют при центробежном ускорении 1 100 × g в течение 15 мин без торможения во время фазы замедления.

Записывают объем осадка (объем сухого остатка) сразу же после центрифугирования.

Используя пипетку, осторожно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуума, не превышающего 20 кПа (0,2 бар), оставляя 2–5 мл жидкости над осадком. Если нет видимого осадка, принимают дополнительные меры предосторожности во избежание засасывания ооцист и цист при осуществлении данной процедуры.

В центрифужную пробирку добавляют деионизированную воду, чтобы довести объем содержимого пробирки до 9 мл. Встряхивают содержимое центрифужной пробирки в течение 10–15 с, чтобы ресуспендировать осадок и затем либо ставят пробу на хранение при температуре (5 ± 3) °С для будущего проведения IMS, либо сразу переходят к методике, установленной в 7.2.

Если объем осадка превышает объем, рекомендованный изготовителем испытательного комплекта IMS, повторно центрифугируют пробу в пробирке, которая позволяет точно измерить объем осадка. Разделяют пробу на аликвоты для IMS таким образом, чтобы каждая аликвота имела объем, не превышающий максимального объема осадка, рекомендованного изготовителем, и доводят каждую аликвоту до 9 мл фильтрованной деионизированной водой.

Примечание 1 — Изготовители предоставляют вместе с аппаратурой компакт-диск с подробными инструкциями по сборке и эксплуатации оборудования.

Примечание 2 — Автоматизированная установка для промывки имеется в продаже (см. приложение Н).

Промывочные пробирки очищают горячей водой и моющим средством, затем тщательно ополаскивают теплой водой и фильтрованной деионизированной водой.

Примечание 3 — В случае когда некоторое количество проб из различных источников рассматривается в рабочем порядке, целесообразно иметь отдельный набор промывочных пробирок и плунжер, которые будут применяться на конкретной площадке, чтобы минимизировать перекрестное загрязнение.

7.2 Иммуномагнитное разделение (IMS)

Методика подразумевает прикрепление ооцист и цист к магнитным гранулам, покрытым антителами к криптоспоридиям либо лямблиям. Комплекс гранул с ооцистами и цистами отделяют от интерферирующих частиц в водном концентрате посредством использования магнита. После разделения ооцисты и цисты отделяют от гранул путем кислотной обработки. Ооцисты и цисты перемещают в виде суспензии на предметное стекло микроскопа, а намагниченные гранулы удаляют.

В настоящем стандарте не приводятся подробные инструкции по IMS, так как испытательные комплекты, имеющиеся в продаже, являются единственным проверенным методом, доступным для IMS. Испытательные комплекты должны использоваться в соответствии с инструкциями изготовителя.

Примечание 1 — Подробная информация об изготовителях испытательной аппаратуры для IMS приведена в приложении Н.

Примечание 2 — Сведения об автоматизированном оборудовании для улавливания и оборудовании для концентрирования проб, имеющемся в продаже, приведены в приложении Н.

7.3 Окрашивание пробы

На соответствующее луночное предметное стекло ставят номер образца и объем анализируемой пробы (анализу подвергают весь образец).

После добавления NaOH в лунки предметного стекла аликвоты суспензии, содержащей разделенные ооцисты и цисты (см. 7.2), распределяют по лункам.

Примечание 1 — Объем NaOH и образца, добавленного в каждую лунку, будет зависеть от размера лунки.

Готовят два отдельных предметных стекла с положительным и отрицательным контролем. Положительный контроль должен состоять из суспензии криптоспоридий и лямблий, содержащей известное количество паразитов (см. приложение D). Отрицательный контроль должен состоять из фильтрованной деионизированной воды или PBS. В дальнейшем положительный и отрицательный контроль должен быть включен в каждую партию окрашенных проб.

Предметные стекла, содержащие пробы, помещают в термостат при температуре (36 ± 2) °С или при температуре, не превышающей 42 °С, и выпаривают до сухого остатка.

На каждую лунку, содержащую высушенную пробу, наносят каплю метанола (см. 4.4.1) и дают высохнуть на воздухе при температуре (20 ± 5) °С.

Лунку с пробой покрывают флуоресцентно меченые моноклональные антитела (mAb) FITC (см. 4.4.3).

Предметные стекла помещают в камеру влажности (см. 5.3.13) и инкубируют при температуре (36 ± 2) °С в течение времени, установленного изготовителем конъюгированных антител.

Примечание 2 — Точные объемы и сроки зависят от типа использованных антител и луночных предметных стекол.

После инкубации предметные стекла удаляют из камеры влажности и осторожно аспирируют лишние меченые mAb с боковой поверхности каждой лунки. При выполнении данного этапа необходимо убедиться, что наконечник пипетки не касается поверхности лунки.

На каждую лунку наносят 1 каплю раствора 4', 6'-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (см. 4.4.7). Выдерживают при комнатной температуре (20 ± 5) °С в течение 2 мин.

Примечание 3 — Такие сроки применяют только по отношению к предметным стеклам, которые были закреплены метанолом и затем высушены.

Удаляют избыточный раствор DAPI путем аспирации (как описано выше).

На каждую лунку наносят каплю фильтрованной деионизированной воды, а затем аспирируют избыточную деионизированную воду (как описано выше).

Примечание 4 — Дополнительный этап промывки с использованием 0,01 М PBS с pH 7,2 иногда используют до промывки деионизированной водой.

Предметные стекла сушат при комнатной температуре (20 ± 5) °С или в термостате при температуре (36 ± 2) °С.

Предметные стекла до момента их использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С. Предметные стекла должны быть исследованы сразу после обработки. Исследование должно осуществляться на следующий день.

Примечание 5 — Предметные стекла хранились в темном месте в течение периода длительностью до 3 мес и сохраняли свою флуоресценцию. Однако подробного исследования не было проведено в отношении потери флуоресценции или окрашивания DAPI при хранении. Предметное стекло хранят сухим и крепят перед исследованием.

Перед исследованием на край лунки на предметном стекле с пробой наносят около 20 мкл заливочной среды (см. 4.4.4), стараясь не касаться предметного стекла наконечником пипетки.

Покровное стекло помещают на предметное стекло, стараясь не создавать пузырьки в заливочной среде (см. 4.4.4). Запечатывают края покровного стекла прозрачным лаком.

В качестве альтернативы, заливочную среду переносят пипеткой в центр покровного стекла, а предметное стекло осторожно переворачивают и помещают на покровное стекло. Затем предметное стекло осторожно переворачивают, чтобы покровное стекло оказалось наверху. Следует

соблюдать осторожность во избежание образования воздушных пузырьков между предметным и покровным стеклами.

7.4 Микроскопия

7.4.1 Общие положения

Используют эпифлуоресцентный микроскоп с оптическим устройством для DIC-микроскопии (см. 5.3.10) для анализа всех подготовленных микропрепаратов. Используют объективы и окулярные трубки с общим увеличением 200 × или 400 × и 1 000 ×. Следует изучить инструкцию по эксплуатации изготовителя, где описана конструкция микроскопа.

Окулярную шкалу (см. 5.3.12) калибруют через равные интервалы времени (в приложении С содержится информация по калибровке окулярной шкалы).

Используют увеличение от 800 × до 1 000 × для подтверждения ооцист и цист.

В рамках описанной методики выявление ооцист и цист зависит от исследования вручную подготовленных микропрепаратов с помощью эпифлуоресцентной /DIC-микроскопии. Несмотря на то что описанный метод широко используется, он требует временных затрат, может вызвать утомление специалиста и, как следствие, привести к ошибке. Поэтому надежная автоматизированная процедура имеет значительное преимущество. В настоящее время доступны несколько инструментов, которые могут автоматически сканировать пробы (например, лазерная сканирующая цитометрия), или находятся в стадии разработки. Такое оборудование может быть использовано при надлежащем подтверждении надежности.

7.4.2 Исследование флуоресцентных образцов препарата с использованием эпифлуоресцентной микроскопии

7.4.2.1 Общие положения

Интенсивность ультрафиолетового (УФ) излучения из дуговых ртутных ламп может варьироваться и будет постепенно снижаться, по мере использования электролампы. Интенсивность ультрафиолетового света проверяют регулярно, используя флуоресцентное контрольное предметное стекло.

Используя эпифлуоресцентный микроскоп (см. 5.3.10) и увеличение 200 × или 400 ×, исследуют окрашенные контрольные предметные стекла, чтобы гарантировать, что на предметных стеклах положительного контроля ооцисты и цисты надлежащим образом помечены mAb и что предметные стекла отрицательного контроля не содержат ооцисты и цисты. Исследование повторяют при увеличении 1 000 × для подтверждения окрашивания, размера и внешнего вида ооцист и цист. Исследуют содержимое, используя УФ-фильтр возбуждения, чтобы гарантировать, что ядерный материал был соответствующим образом помечен DAPI.

Если предметные стекла положительного контроля являются отрицательными, повторяют окрашивание до того, как пробы будут подвергнуты обработке. Если предметное стекло с отрицательным контролем является положительным, то приступают к исследованию для определения источника загрязнения. Готовят свежие реактивы и окрашивают контрольные предметные стекла повторно до того, как пробы будут подвергнуты обработке.

При условии, что данные проверки являются удовлетворительными, пробы исследуют, последовательно сканируя каждую лунку, используя эпифлуоресцентную микроскопию (FITC). Используют поперечную или вертикальную диаграмму сканирования.

При завершении горизонтального ряда выявляют часть, расположенную в нижней точке поля зрения микроскопа (т. е. остатки пробы или край покрытия лунки предметного стекла). Перемещают предметный столик микроскопа таким образом, чтобы данная часть была в верхней части поля зрения микроскопа. Если сканирование проводилось с использованием вертикальной диаграммы (вертикальные ряды), то выявляют часть, находящуюся на правой стороне, в центре поля зрения микроскопа. Перемещают предметный столик микроскопа таким образом, чтобы часть находилась на левой стороне поля зрения микроскопа:

- проводя поперечное сканирование, предметный столик микроскопа передвигают по горизонтали таким образом, чтобы граница лунки полностью находилась в пределах видимости, затем сканируют по горизонтали в обратном направлении по лунке;
- проводя вертикальное сканирование, предметный столик передвигают вертикально таким образом, чтобы граница лунки полностью находилась в пределах видимости, затем сканируют по направлению вверх или вниз, в случае необходимости.

Повторяют, пока не будет просканирована вся лунка целиком. Сканируют, используя увеличение 200 × или 400 ×, и записывают количество объектов, которые предположительно являются криптоспоридиями или лямблиями. Если имеется только один или два объекта, то изучают каждый

объект при увеличении от 800 × до 1 000 ×, водную или масляную иммерсию объектов для подтверждения того, что они являются ооцистами или цистами. Если имеется большее количество предполагаемых ооцист или цист, то изучают все предметное стекло при увеличении от 800 × до 1 000 × и подтверждают каждый объект. Такой процесс является более легким по сравнению с переходом от сухого объектива с малой светосилой к объективу с большой светосилой для исследования каждого предполагаемого объекта.

Все объекты с типичными характеристиками криптоспоридий или лямблий (см. 7.4.2.2.) должны подвергаться дальнейшему исследованию и измерению с использованием DAPI (см. 7.4.3) и DIC (см. 7.4.4).

7.4.2.2 Идентификация ооцист криптоспоридий и цист лямблий с помощью FITC

Если организмы помечены FITC-mAb и исследованы с использованием эпифлуоресцентной микроскопии (FITC, блок фильтра), то они должны иметь следующие идентификационные характеристики.

Таблица 2 — Идентификационные характеристики ооцист криптоспоридий и цист лямблий (Giardia)

Ооцисты криптоспоридий	Цисты лямблий
Светло-зеленая флуоресценция (часто с яркими краями)	Светло-зеленая флуоресценция (часто с яркими краями)
Сферические или слегка овальные по форме. У некоторых ооцист будут наблюдаться складки, трещины и шовные линии	Овальные по форме. У некоторых цист будут наблюдаться складки и загибы
Диаметр 4–6 мкм	Размеры: 8–12 мкм в длину и 7–10 мкм в ширину

Сильно деформированные и поврежденные объекты подсчитывают, проявляя осторожность, особенно если на предметном стекле нет типичных ооцист или цист.

Примечание 1 — Большинство ооцист криптоспоридий имеют сферическую или слегка овальную форму с более яркой, ровной окраской по всей окружности. Некоторые ооцисты могут отличаться от этого описания. Те, которые были некоторое время в среде, могут быть слабоокрашенными или казаться расплывчатыми. Они по-прежнему могут иметь содержимое, и может быть выявлено ядро спорозоита. Часто ооцисты разделены, как если бы из них был удален сегмент. При таких обстоятельствах ооцисты образуют трещину во время сушки на предметном стекле и спорозоиты и ядра спорозоитов могут очевидно прилегать к ооцистам. Кроме того, ооцисты, особенно те, у которых отсутствует содержимое, могут быть деформированными или частично загибаться.

Примечание 2 — Большинство цист лямблий (Giardia) имеют овальную форму (8–12 мкм в длину и 7–10 мкм в ширину), однако в отдельных случаях цисты могут выглядеть сферическими с размерами около 10 × 10 мкм. Цисты, находящиеся в среде некоторое время, могут иметь слабую окраску и быть сильно деформированными, особенно те, которые не имеют содержимого.

Примечание 3 — Некоторые виды криптоспоридий и лямблий были классифицированы (см. приложение G). Представленный диапазон размеров главным образом ориентирован на C. parvum и G. Intestinalis. Однако другие виды, которые могут быть патогенными для человека или не являться таковыми, могут также подпадать под данный диапазон размеров. Кроме того, другие виды или отдельные тела целевых видов могут быть не определены, как криптоспоридии или лямблии вследствие своего размера, который может превышать или быть меньше заданного диапазона размеров и патогенность которых для людей не может быть исключена.

Если наблюдается светло-зеленый флуоресцентный объект, который является типичным для ооцист криптоспоридий или цист лямблий, то данный объект изучают блоком УФ-фильтра для окрашивания DAPI, а затем DIC (см. 7.4.3 и 7.4.4 соответственно).

Другие объекты (например, водоросли) могут имитировать размер, структуру и окраску криптоспоридий и лямблий. Поэтому важно провести дополнительное подтверждение предполагаемых клеток (тел) с помощью DAPI и DIC.

7.4.3 Идентификация ооцист криптоспоридий и цист лямблий с помощью DAPI

Каждая предполагаемая ооциста или циста должна быть исследована для подтверждения наличия ядра, окрашенного DAPI, используя масляно-иммерсионный или водно-иммерсионный объектив с увеличением 100 ×, переключаясь на блок УФ-фильтра на микроскопе для визуализации DAPI.

Примечание — Ядра окрашенных DAPI ооцист и цист имеют голубой цвет при исследовании с помощью эпифлуоресцентной микроскопии (блок УФ-фильтра DAPI).

Если объект проявляет какую-либо из следующих характеристик, то его рассматривают как ооцисту криптоспоридий или цисту лямблий:

- от двух до четырех четких, голубых ядер в пределах одного тела;
- ядерный материал может быть немного диффузным, из-за чего вид может быть нечетким или расплывчатым;
- диффузная голубая внутренняя окраска, где невозможно определить четко ядерный материал (при подсчете это не учитывают).

В общий подсчет включают две подгруппы, за исключением случаев, когда они проявляют нестандартные морфологические характеристики, такие как: количество ядер, превышающее четыре, или, если одно или два крупных интенсивно окрашенных ядра визуально заметны в пределах объекта.

7.4.4 Идентификация ооцист криптоспоридий и цист лямблий с помощью DIC

Исследовав объект, используя блоки фильтра FITC и DAPI, закрывают светонепроницаемую преграду для УФ-света и переключают на источник проходящего света, следя за тем, чтобы конденсатор микроскопа был установлен на месте. Также обеспечивают, чтобы подбашенный лист конденсатора микроскопа имел правильную установленную призму конденсатора ICT.

Внимание! Важно, чтобы свет от ртутной дуговой лампы был заблокирован, так как УФ-свет может повредить фильтр DIC.

Фильтр DIC и призму передвигают на место и оптимизируют изображение, регулируя интенсивность света и/или поворачивая регулировочный винт на призме.

Используя DIC, измеряют размер и определяют внешние или внутренние морфологические характеристики, типичные для ооцист криптоспоридий или цист лямблий (Giardia). Подтверждение размера и внутреннего содержимого должно осуществляться только при увеличении × 1 000 (используя масляно-иммерсионный или водно-иммерсионный объектив с увеличением 100 ×).

Ооцисты криптоспоридий должны проявлять какие-либо из следующих характеристик:

- сферические или слегка овальные с выпуклой центральной частью, поверхность которых внешне искривлена. Кроме того, может наблюдаться уплотненная оболочка ооцисты, указывающая на то, что ооциста содержит спорозоиты. Можно увидеть спорозоиты внутри ооцисты, а также отчетливую точку рефракции, которая является остаточным телом;
- сферические или слегка овальные с уплотненной оболочкой ооцисты. Кроме того, может наблюдаться рефракционное остаточное тело, что может быть признаком ооцисты после эксцистирования;
- сферический или слегка овальный объект, который является плоским и нечетким. Кроме того, наблюдается уплотненная оболочка ооцисты, что может быть признаком ооцисты после эксцистирования.

Цисты лямблий должны проявлять какие-либо из следующих характеристик:

- овальные, с уплотненной оболочкой цисты и выпуклой центральной частью, что может быть признаком цисты с содержимым. Кроме того, ядро, продемонстрированное окрашиванием DAPI, может наблюдаться вместе с остатками жгутиковых аксонем и срединного тела;
- овальные, с уплотненной оболочкой цисты, центральная часть плоская и нечеткая, что может быть признаком пустых цист.

Примечание 1 — Идентификация организмов, используя DIC, требует большого опыта. Представленные характеристики могут быть использованы только в качестве руководящих принципов для целей идентификации. Ошибочная идентификация объектов, которые имитируют ооцисты и цисты, может происходить даже на данном этапе.

Примечание 2 — Тела, подобные телам криптоспоридий и лямблий, могут продемонстрировать внешние или внутренние морфологические характеристики, нетипичные для ооцист или цист (например, шипы, стебли, придатки, поры, одно или два крупных ядра, заполняющих клетку, красные флуоресцирующие хлоропласты, кристаллы, споры и т. д.). Наличие таких свойств указывает на то, что объект не является ооцистой или цистой. Следует принять к сведению, что содержимое ооцист, окрашенное голубым Эвансом (присутствует во многих препаратах mAb), также может флуоресцировать красным цветом.

В некоторых случаях исследование проб с использованием DIC невозможно вследствие присутствия мешающих остатков. Такие случаи вносят в отчет, а решение по идентификации такого события должно быть основано на характеристиках FITC-mAb и мечения DAPI.

8 Методика контроля качества проведенного испытания

8.1 Общие положения

Лаборатории, проводящие исследования, должны иметь четко определенную систему контроля качества, чтобы гарантировать, что оборудование, реактивы и методы соответствуют исследованию. Применение положительного и отрицательного контроля должно быть частью исследования.

Посев и исследование на определение времени выделения осуществляют с использованием комбинированного метода измерения концентрации и метода разделения через равные интервалы времени (например, 1 на 20 проб, но не менее 1 в месяц).

Требования по подготовке к проведению положительного контроля и теста на определение эффективности выделения приведены в приложении D.

Примечание — Суспензии, подсчитанные с помощью проточной цитометрии и содержащие известное количество ооцист, имеются в продаже и должны быть использованы в соответствии с инструкциями изготовителей, сведения о которых приведены в приложении Н.

8.2 Очистка оборудования

Все оборудование, которое многократно использовалось, тщательно промывают водой с моющим средством, а затем ополаскивают деионизированной водой (см. 4.1.1), чтобы удалить все ооцисты и цисты, которые могут на нем оставаться.

Примечание 1 — Использование гипохлоритного раствора, содержащего не менее 1 000 мг/л свободного хлора, может способствовать удалению ооцист и цист из оборудования (не рекомендуется для очистки оборудования IDEXX Filta-Max®).

Оборудование, используемое при проведении положительного контроля, очищают отдельно (по возможности в отдельной зоне) от оборудования, используемого для анализа проб.

Примечание 2 — Использование одноразового материала идеально подходит, чтобы минимизировать перекрестное загрязнение. Однако, как показывает практика, возможно минимизировать перекрестное загрязнение и при многоразовом использовании материалов, которые прошли надлежащую очистку.

9 Представление результатов испытания

9.1 Выражение результатов

Исследуют весь осадок пробы.

Выражают количество ооцист криптоспоридий и/или цист лямблий (Giardia) на объем исследуемой пробы. Затем вычисляют концентрацию ооцист криптоспоридий и/или цист лямблий (Giardia) для стандартного объема, который обычно представлен (например, 10 или 1 000 л). Отсутствие организма, т. е. если организм не был обнаружен, следует выражать как «не обнаружен» в исследуемом объеме пробы.

Примечание — Число ооцист или цист в разных аликвотах осадка может значительно отличаться. Поэтому вычисление количества ооцист и/или цист в общем объеме от числа найденного в аликвоте осадка, может привести к переоценке или недооценке количества ооцист или цист.

9.2 Протокол испытания

Протокол испытания пробы в соответствии с настоящим стандартом включает:

a) подробную информацию для полной идентификации пробы, включая место исследования пробы, природу пробы и точку отбора проб;

b) дату отбора проб;

c) объем собранной пробы;

d) дату получения пробы лабораторией;

e) дату завершения исследования;

f) объем анализируемой пробы;

g) используемый метод;

h) любой (ые) особый (ые) инцидент (ы), наблюдаемый (ые) в ходе исследования, который (ые) мог (могли) повлиять на полученный результат;

i) количество выявленных ооцист криптоспоридий и цист лямблий (Giardia);

j) результаты, выраженные в соответствии с 9.1.

Приложение А
(обязательное)

Приготовление реактивов

А.1 Элюирующие буферы для Pall Envirochek ™ STD и капсулы HV

А.1.1 Трис-буфер

Трис, г	121,1
Деионизированная вода, мл	1 000

Растворяют трис в 700 мл деионизированной воды и регулируют pH до 7,4, используя раствор HCl или NaOH концентрацией 1,0 моль/л. Доводят объем раствора до 1 000 мл деионизированной водой. Проведение стерилизующей фильтрации не обязательное. Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 3 мес.

А.1.2 Раствор ЭДТА

ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль, дигидрат), г	186,1
Деионизированная вода, мл	100

Растворяют ЭДТА в 800 мл горячей деионизированной воды. Охлаждают до комнатной температуры (20 ± 5) °С и регулируют pH до 8,0, используя для первичной регулировки раствор NaOH концентрацией 6,0 моль/л, а для окончательной регулировки раствор HCl или NaOH концентрацией 1,0 моль/л. Доводят объем раствора до 1 000 мл деионизированной водой. Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 3 мес.

А.1.3 Элюирующий буфер

Лаурет-12, г	1
Трис-буфер (А.1.1), мл	10
Раствор ЭДТА (А.1.2), мл	2
Пеногаситель А, мкл	150
Деионизированная вода, мл	1 000

Взвешивают лаурет-12 в стакане и добавляют 100 мл фильтрованной деионизированной воды (см. 4.1.1).

Нагревают стакан с целью плавления лаурет-12 (около 1 мин) и переносят раствор в мерный цилиндр вместимостью 1 000 мл.

Промывают стакан несколько раз, чтобы гарантировать перенос очищающего вещества в цилиндр.

Добавляют 10 мл трис-буфера с pH 7,4, 2 мл раствора ЭДТА с pH 8,0 и 150 мкл пеногасителя А.

Доводят объем раствора до 1 000 мл фильтрованной деионизированной водой.

Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 2 мес.

Примечание — Для частого применения могут быть приготовлены объемы до 10 л.

А.1.4 Буфер предварительной обработки

Полифосфат натрия $(NaPO_3)_n$, г	5
Деионизированная вода, мл	1 000

Полифосфат натрия растворяют в воде.

Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 1 нед.

А.2 Буферы для фильтров IDEXX Filta-Max®, фосфатно-солевой буфер с объемной долей 0,01 % твина 20

А.2.1 Фосфатно-солевой буфер (PBS)

Хлорид натрия, г	8,0
Гидрофосфат натрия (Na_2HPO_4), г	1,15
Дигидрофосфат калия (KH_2PO_4), г	0,2
Хлорид калий, г	0,2
Деионизированная вода, мл	1 000

Растворяют все ингредиенты в воде и доводят значение pH до 7,3 ± 0,2, используя раствор HCl или NaOH концентрацией 1,0 моль/л.

Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 3 мес.

А.2.2 Элюирующий буфер

Полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат (твин 20), мл	1
PBS (см. А.2.1), л	10

Около 8 л PBS (см. А.2.1) разливают в емкость (с краном) вместимостью 10 л. Перемешивают жидкость в магнитной мешалке с использованием магнитного элемента. Вносят 1 мл твина 20 в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл и добавляют около 10 мл теплой деионизированной воды (см. 4.1.1).

Осторожно выливают содержимое центрифужной пробирки в вышеуказанную емкость вместимостью 10 л. Дважды промывают пробирку 10 мл деионизированной воды (см. 4.1.1), каждый раз выливая содержимое пробирки в ту же емкость. Доводят объем емкости до 10 л PBS (см. А.2.1).

Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 1 мес.

А.3 Реактивы для концентрирования проб воды и выявления криптоспоридий и лямблий

А.3.1 Иммунофлуоресцентная гистологическая среда

1,4-диазабицикло [2.2.2] октан (DABCO), г	2
Глицерин, мл	60
PBS (см. А.2.1), мл	40

Растворяют DABCO в глицерине и PBS. Доводят значение pH до 7,1 ± 0,2, используя раствор HCl или NaOH концентрацией 0,1 моль/л.

Хранят среду при температуре (5 ± 3) °С. Емкость со средой во время использования может находиться при комнатной температуре (20 ± 5) °С.

Примечание — Сведения об изготовителях приведены в приложении Н. Срок годности указывается изготовителем на каждой упаковке.

А.3.2 Исходный раствор DAPI

DAPI, мг	1
Метанол, мл	0,5

Добавляют 0,5 мл метанола в емкость, содержащую 1 мг DAPI (см. 4.4.5).

Хранят раствор при температуре (5 ± 3) °С не более 1 мес.

А.3.3 Рабочий раствор DAPI

Исходный раствор DAPI (см. А.3.2), мкл	10
PBS (см. А.2.1), мл	50

Разбавляют исходный раствор DAPI в PBS.

Хранят раствор при температуре (5 ± 3) °С не более одного дня.

А.3.4 Среда для хранения паразитов — исходный раствор

Азид натрия (NaN_3), мг	100
Деионизированная вода, мл	5

Растворяют азид натрия в воде.

Хранят среду при температуре (5 ± 3) °С не более 1 мес.

А.3.5 Среда для хранения паразитов — рабочий раствор

Среда для хранения паразитов – исходный раствор (см. А.3.4), мл	1
Деионизированная вода, мл	100

Вносят 1 мл исходного раствора среды для хранения паразитов в 100 мл деионизированной воды.

Хранят среду при температуре (5 ± 3) °С не более 1 мес.

Приложение В
(справочное)

Концентрирование ооцист и цист в небольших объемах (10 л) воды

В.1 Общие положения

Капсулы для фильтрации могут использоваться для небольших объемов воды (обычно 10 л), однако, учитывая их стоимость, это может оказаться нецелесообразным. В настоящем приложении описаны альтернативные методы концентрирования ооцист и цист из малых объемов воды. Некоторые из приведенных методов не требуют закупки дорогостоящего оборудования и материалов, а основаны на применении химических веществ для концентрирования проб воды (флокуляция). В приложении приведены три метода концентрирования проб воды: карбонатом кальция, сульфатом железа (II) и с помощью мембранной фильтрации. Методы позволяют анализировать небольшие объемы воды, которые могут быть собраны и доставлены в лабораторию в течение относительно короткого периода времени. Если необходимо срочно получить результаты, то они могут быть получены в течение нескольких часов. Можно использовать принципы IMS (см. 7.2), а также окрашивание и выявление (см. 7.3 и 7.4), установленные в настоящем стандарте, после концентрирования проб воды.

Примечание — Концентрирование проб воды с применением химических веществ (флокуляция) не подходит для воды, не содержащей взвешенных частиц. Вода, содержащая значительное количество взвешенных частиц, трудно поддается мембранной фильтрации.

В.2 Реактивы, необходимые для концентрирования проб воды карбонатом кальция

В.2.1 **Деионизированная вода,** фильтрованная по месту использования через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

В.2.2 Дигидрат хлорида кальция, раствор концентрацией 1 моль/л

Растворяют 1 470 г $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ в 10 л воды. Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 3 мес.

В.2.3 Гидрокарбонат натрия, раствор концентрацией 1 моль/л

Растворяют 840 г $NaHCO_3$ в 10 л воды. Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 3 мес.

В.2.4 Гидроксид натрия, раствор концентрацией 1 моль/л

Растворяют 400 г NaOH в 10 л воды. Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 3 мес.

В.2.5 Сульфаминовая кислота, раствор концентрацией 10 %

Растворяют 1 000 г NH_2SO_3H в 10 л воды. Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 3 мес.

В.2.6 **Полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат (твин 20),** раствор концентрацией 0,01 %.

В.3 Приготовление реактивов

Для приготовления реактивов добавляют необходимое количество соответствующего вещества к 9 л ± 200 мл фильтрованной деионизированной воды (см. В.2.1) и помещают в магнитную мешалку до полного растворения вещества.

Доводят объем раствора до 10 л ± 100 мл фильтрованной деионизированной воды (см. В.2.1) и хорошо перемешивают.

В.4 Оборудование, необходимое для концентрирования проб воды карбонатом кальция

В.4.1 **Мерные цилиндры вместимостью** 10, 100, 1 000 мл.

В.4.2 **Аспирационные трубки**.

В.4.3 **Источник вакуума** с вакуумными датчиками и емкостями для смывов.

B.4.4 **Центрифуга,** обеспечивающая центробежное ускорение 7 200 g и 1 100 g.

B.4.5 **Центрифужные флаконы,** пластиковые, с завинчивающейся крышкой, вместимостью 1 000 мл.

B.4.6 **Центрифужные пробирки,** конические, пластиковые, вместимостью 50 мл.

B.4.7 **Емкость для перемешивания** — оплетенная стеклянная бутыль вместимостью 10 л.

B.5 Методика концентрирования проб воды карбонатом кальция

Наливают 10 л пробы воды в емкость для перемешивания, добавляют 100 мл раствора $CaCl_2$ концентрацией 1 моль/л (см. B.2.2) и 100 мл раствора $NaHCO_3$ концентрацией 1 моль/л (см. B.2.3), затем встряхивают емкость для перемешивания (см. B.4.7).

Добавляют 100 мл раствора NaOH концентрацией 1 моль/л (см. B.2.4) и встряхивают емкость для перемешивания.

Содержимому емкости для перемешивания дают отстояться при комнатной температуре не менее 4 ч, но не более 24 ч.

После осаждения хлопьев осторожно (без взбалтывания осадка) удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуума, не превышающего 20 кПа (0,2 бар) (см. B.4.3).

Добавляют достаточное количество (100–200 мл) раствора сульфаминовой кислоты концентрацией 10 % (см. B.2.5) для полного растворения хлопьев.

Хорошо перемешивают содержимое емкости для перемешивания и переливают его в центрифужный флакон вместимостью 1 л (см. B.4.5), пронумерованный в соответствии с номером пробы.

Примечание 1 — Может потребоваться использование двух центрифужных флаконов при большом количестве осадка.

Добавляют (200 ± 20) мл 0,01%-ного раствора твина 20 (см. B.2.6) в емкость для перемешивания, энергично встряхивая, ополаскивают и переносят содержимое емкости для перемешивания в вышеуказанный центрифужный флакон вместимостью 1 л.

В емкость для перемешивания вновь добавляют (200 ± 20) мл 0,01%-ного раствора твина 20 и медленно вращают, чтобы подобрать пену у ее краев, затем содержимое емкости для перемешивания переносят в центрифужный флакон вместимостью 1 л.

Содержимое центрифужного флакона должно иметь pH 6–6,5. При несоответствии значение pH регулируют раствором NaOH концентрацией 1 моль/л (см. B.2.4).

Обеспечение значения pH в указанном диапазоне позволяет избежать повторного образования хлопьев.

Проводят балансировку центрифуги при центробежном ускорении 1 g с помощью центробежных флаконов вместимостью 1 л, наполненных фильтрованной деионизированной водой. Центрифугируют подготовленную пробу при максимальном центробежном ускорении 7 200 g в течение 12 мин без торможения во время фазы замедления.

Сразу после центрифугирования извлекают центрифужные флаконы и осторожно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуума, не превышающего 20 кПа (0,2 бар) (см. B.4.3).

Энергично встряхивают оставшуюся жидкость, чтобы ресуспендировать осадок, затем переносят его в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл (см. B.4.6).

Используя промывалку, добавляют (20 ± 2) мл 0,01%-ного раствора твина 20 в центрифужный флакон вместимостью 1 л для суспендирования возможно оставшихся остатков пробы и переносят в другую центрифужную пробирку вместимостью 50 мл. Доводят объем в каждой центрифужной пробирке до 50 мл, используя фильтрованную деионизированную воду.

Центрифужные пробирки вместимостью 50 мл центрифугируют при центробежном ускорении 1 100 g в течение 15 мин без торможения во время фазы замедления. Записывают объем осадка (объем сухого остатка) сразу после центрифугирования.

Примечание 2 — Испытательный комплект IMS обычно включает осадок определенного объема для использования во время испытания, например 0,5–2 мл.

Используя пипетку Пастера, осторожно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуума, не превышающего 20 кПа (0,2 бар), оставляя 2–5 мл жидкости над осадком. Если нет видимого осадка, принимают дополнительные меры предосторожности, чтобы избежать засасывания ооцист и цист при осуществлении данной процедуры.

Добавляют фильтрованную деионизированную воду в центрифужную пробирку, чтобы довести объем содержимого пробирки до 10 мл. Встряхивают содержимое центрифужной пробирки в течение 10–15 с, чтобы ресуспендировать осадок, и затем либо ставят пробу на хранение при температуре (5 ± 3) °C для будущего проведения IMS, либо сразу переходят к методике, установленной в 7.2.

Если объем осадка превышает объем, рекомендованный изготовителем испытательного комплекта IMS, повторно центрифугируют пробу в пробирке, которая позволяет точно измерить объем осадка. Разделяют пробу на аликвоты для IMS таким образом, чтобы каждая аликвота имела объем, не превышающий максимального объема осадка, рекомендованного изготовителем, и доводят каждую аликвоту до 10 мл фильтрованной деионизированной водой.

В.6 Реактивы, необходимые для концентрирования проб сульфатом железа (II)

В.6.1 **Деионизированная вода**, фильтрованная по месту использования через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

В.6.2 Гидроксид натрия, раствор концентрацией 1 моль/л

Растворяют 400 г NaOH в 10 л воды. Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 3 мес.

В.6.3 Сульфат железа (II), раствор концентрацией 1 моль/л

Растворяют 2 780 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ в 10 л воды.
Хранят раствор при комнатной температуре (20 ± 5) °С не более 3 мес.
В.6.4 **Щавелевая кислота, раствор** концентрацией 10 %.
В.6.5 **Полиоксиэтилен (20) сорбитан моноолеат (твин 80)**, раствор концентрацией 0,1 %.
В.6.6 **PBS-твин**, раствор 10 ммоль/л PBS (pH 7,4) и 0,1 % твин 80.
В.6.7 **Полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат (твин 20)**, раствор концентрацией 0,01 %.

В.7 Приготовление реактивов

В соответствии с разделом В.3.

В.8 Оборудование, необходимое для концентрирования проб воды сульфатом железа (II)

В соответствии с разделом В.4.

В.9 Методика концентрирования проб воды сульфатом железа (II)

Наливают 10 л пробы воды в емкость для перемешивания (см. В.4.7). Доводят значение pH до 9,0 ± 0,2, используя раствор NaOH концентрацией 1 моль/л (см. В.6.2).

Примечание 1 — Как правило, требуется около 2 мл раствора NaOH.

При перемешивании добавляют 20 мл раствора сульфата железа (см. В.6.3) и продолжают перемешивать в течение 5 мин при 280 об/мин.

Содержимому емкости для перемешивания дают отстояться в течение 18 ч при комнатной температуре (20 ± 5) °С. Затем осторожно удаляют надосадочную жидкость, оставляя над осадком слой жидкости высотой 4–5 см.

В центрифужном флаконе вместимостью 1 л собирают осадок в количестве 600–1 200 мл в зависимости от обрабатываемой пробы воды.

В емкость для перемешивания добавляют 100–150 мл 10%-ного раствора щавелевой кислоты (см. В.6.4) и ополаскивают, чтобы полностью растворить осадок сульфата железа.

Добавляют в емкость для перемешивания 150 мл 0,1%-ного раствора твина 80 (см. В.6.5), ополаскивают и содержимое емкости для перемешивания присоединяют к осадку.

Центрифугируют подготовленную пробу при центробежном ускорении 1 500 g в течение 10 мин без торможения во время фазы замедления. Осторожно (без взбалтывания осадка) отсасывают надосадочную жидкость, оставляя над осадком слой жидкости высотой около 1 см.

Измеряют объем осадка и ресуспендируют осадок, используя 5 объемных частей 0,1%-ного раствора твина 80 (5 объемных частей твина 80 на 1 объемную часть осадка).

Повторяют последний вышеуказанный этап ополаскивания перед центрифугированием.

Центрифугируют при центробежном ускорении 1 500 g в течение 10 мин и ресуспендируют осадок, используя 1 объемную часть PBS-твин (см. В.6.6).

Примечание 2 — Используемый объем PBS-твин эквивалентен объему осадка, и, как правило, общий объем составляет 60–80 мл.

Контролируют pH концентрированной пробы воды и при необходимости регулируют его до значения 7,2–7,4, используя PBS (10 ммоль/л, pH 7,4).

Переносят пробу в центрифужные пробирки вместимостью 50 мл (см. B.4.6). Добавляют (20 ± 2) мл 0,01%-ного раствора твина 20 (см. B.6.7) в центрифужный флакон вместимостью 1 л для суспендирования возможно оставшихся остатков пробы и переносят в другую центрифужную пробирку вместимостью 50 мл. Доводят объем в каждой центрифужной пробирке до 50 мл, используя фильтрованную деионизированную воду.

Центрифужные пробирки вместимостью 50 мл центрифугируют при центробежном ускорении 1 100 g в течение 15 мин без торможения во время фазы замедления. Записывают объем осадка (объем сухого остатка) сразу после центрифугирования.

Используя пипетку Пастера, осторожно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуума, не превышающего 20 кПа (0,2 бар), оставляя 2–5 мл жидкости над осадком. Если нет видимого осадка, принимают дополнительные меры предосторожности, чтобы избежать засасывания ооцист и цист при осуществлении данной процедуры.

Добавляют фильтрованную деионизированную воду в центрифужную пробирку, чтобы довести объем содержимого пробирки до 10 мл. Встряхивают содержимое центрифужной пробирки в течение 10 –15 с, чтобы ресуспендировать осадок и затем либо ставят пробу на хранение при температуре (5 ± 3) °C для будущего проведения IMS или сразу переходят к методике, установленной в 7.2.

Если объем осадка превышает объем, рекомендованный изготовителями испытательного комплекта IMS, повторно центрифугируют пробу в пробирке, которая позволяет точно измерить объем осадка. Разделяют пробу на аликвоты для IMS таким образом, чтобы каждая аликвота имела объем, не превышающий максимального объема осадка, рекомендованного изготовителем, и доводят каждую аликвоту до 10 мл фильтрованной деионизированной водой.

B.10 Реактивы, необходимые для смыва осадка с поверхности мембранных фильтров диаметром 142 мм

B.10.1 **Твин 80,** раствор концентрацией 0,1 %, приготовленный с использованием деионизированной воды.

B.10.2 **Деионизированная вода**, фильтрованная по месту использования через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

B.11 Подготовка реактивов

В соответствии с разделом B.3.

B.12 Оборудование, необходимое для концентрирования проб воды на мембранных фильтрах диаметром 142 мм

B.12.1 **Фильтровальная ячейка из нержавеющей стали под мембранный фильтр диаметром 142 мм.**

B.12.2 **Мембранные фильтры диаметром 142 мм** с размером пор не более 2,0 мкм, изготовленные из ацетата целлюлозы.

B.12.3 **Перистальтический насос** с номинальной подачей 1 л/мин.

B.12.4 **Силиконовые трубки** для использования с перистальтическим насосом.

B.12.5 **Емкость для мембранных фильтров, используемых для посева,** вместимостью 10 л, при использовании метода мембранных фильтров.

B.12.6 **Полиэтиленовый пакет** для промывки фильтра, например пакет типа «Стомахер».

B.12.7 **Центрифуга**, обеспечивающая центрифужное ускорение 1 100 g.

B.12.8 **Центрифужные пробирки,** конические, пластиковые, вместимостью 50 мл.

B.13 Методика концентрирования с помощью мембранной фильтрации

Помещают мембранный фильтр (см. B.12.2) в фильтровальную ячейку (см. B.12.1) и зажимают. С помощью насоса пропускают пробу воды через мембранный фильтр со скоростью, не превышающей 1,5 л/мин. Промывают емкость, в которой хранилась проба воды, 2 л фильтрованной деионизированной воды (см. B.10.2) и пропускают промывочную воду с помощью насоса через мембранный фильтр.

Извлекают фильтр из фильтровальной ячейки и помещают в чистый полиэтиленовый пакет для промывки фильтра (например, пакет типа «Стомахер») (см. B.12.6). Добавляют 25 мл 0,1%-ного раствора твина 80 (см. B.10.1) и осторожно протирают поверхность фильтра в течение 1 мин через мешок для смыва осадка.

Смывную жидкость из полиэтиленового пакета декантируют в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл (см. B.12.8). Повторяют процедуру смывания осадка, используя также 25 мл 0,1%-ного раствора твина 80, и полученную смывную жидкость присоединяют к ранее полученной.

Центрифужную пробирку вместимостью 50 мл центрифугируют при центробежном ускорении 1 100 × g в течение 15 мин.

Используя пипетку Пастера, осторожно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуума, не превышающего 20 кПа (0,2 бар), оставляя 2–5 мл жидкости над осадком. Если нет видимого осадка, принимают дополнительные меры предосторожности, чтобы избежать засасывания ооцист и цист при осуществлении данной процедуры.

Добавляют фильтрованную деионизированную воду в центрифужную пробирку, чтобы довести объем содержимого пробирки до 10 мл. Встряхивают содержимое центрифужной пробирки в течение 10–15 с, чтобы ресуспендировать осадок, и затем либо ставят пробу на хранение при температуре (5 ± 3) °C для будущего проведения IMS, либо сразу переходят к методике, установленной в 7.2.

Если объем осадка превышает объем, рекомендованный изготовителями испытательного комплекта IMS, повторно центрифугируют пробу в пробирке, которая позволяет точно измерить объем осадка. Разделяют пробу на аликвоты для IMS таким образом, чтобы каждая аликвота имела объем, не превышающий максимального объема осадка, рекомендованного изготовителем, и доводят каждую аликвоту до 10 мл фильтрованной деионизированной водой.

Приложение С
(справочное)

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 (мкм) на микрометре между двумя точками наложения.

Делят количество микрометров (мкм) на количество делений окулярной шкалы, чтобы рассчитать количество микрометров (мкм) 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 вместе с микроскопом. Калибровка микроскопа должна осуществляться часто.

Приложение D
(справочное)

Подготовка к проведению положительного контроля и теста на определение эффективности выделения

D.1 Общие положения

Суспензии положительного контроля готовят для моноклональных антител и красителей DAPI, используемых в микроскопии. Их также готовят для мембранных фильтров, используемых для посева, или проб воды в целях определения эффективности выделения для каждой методики испытания и профессиональности специалистов, проводящих данные процедуры. Пробы деионизированной воды для посева не могут должным образом служить для оценки степени выделения криптоспоридий или лямблий из проб воды.

D.2 Определение концентрации ооцист или цист в исходной суспензии

Используют гемоцитометр Нэйбауэра для определения концентрации ооцист криптоспоридий или цист лямблий (Giardia) в исходных суспензиях, полученных от изготовителей. Используют эти данные для приготовления точного разведения исходных суспензий.

При необходимости разведения исходной суспензии в микроцентрифужных пробирках вместимостью 1,5 мл готовят 1 мл суспензии путем разведения необходимого объема исходной суспензии (с учетом предполагаемой концентрации организмов в ней, указанной изготовителем) в 0,01%-ном растворе твина 20, профильтрованном через мембранный фильтр (с размером пор 0,2 мкм). Концентрация ооцист или цист в полученной суспензии должна составлять около 1×10^6 в миллилитре. Записывают значение используемого объема исходной суспензии (мкл) как объем A, V_A, для использования в дальнейшем.

Используют следующее уравнение:

$$\frac{c_{req}}{c_{stock}} \times V_{tot} = V_{stock}, \qquad (D.1)$$

где c_{req} — необходимая концентрация ооцист или цист в миллилитре;

c_{stock} — концентрация ооцист или цист в миллилитре исходной суспензии;

V_{tot} — общий объем, мл;

V_{stock} — необходимый объем исходной суспензии ооцист или цист, мл

и преобразуют значение объема в миллилитрах на микролитры:

$$V_A = V_{stock} \times 1000,$$

где V_A — необходимый объем исходной суспензии ооцист или цист, мкл.

Пример — Если концентрация в поставляемой исходной суспензии около 1×10^8 ооцист в миллилитре, добавляют 10 мкл исходной суспензии ооцист к 990 мкл фильтрованного раствора твина 20. Встряхивают исходную суспензию в течение не менее 30 с перед отбором аликвоты.

Подготавливают предметное стекло гемоцитометра и покровное стекло посредством промывки 90%-ным раствором этилового спирта и протирают объектив микроскопа с помощью безворсовой ткани.

С помощью безворсовой ткани смачивают линзы микроскопа фильтрованной деионизированной водой (см. 4.1.1) и наносят тонкий слой воды на поверхность предметного стекла гемоцитометра на место, которое будет контактировать с покровным стеклом. Плотно прижимают покровное стекло, пока не станут заметны кольца Ньютона.

Встряхивают разведенную исходную суспензию ооцист или цист в течение 30 с и заполняют ею подготовленный гемоцитометр с помощью микропипетки.

Примечание — Продолжительное встряхивание может повредить ооцисты и/или цисты. Исходную суспензию можно гомогенизировать путем наклона пробирки не менее 20 раз.

После 1 мин покоя (в течение которой ооцисты и цисты осядут на поверхность предметного стекла) подсчитывают ооцисты и/или цисты, используя микроскопию по методу дифференциально-интерференционного контраста (см. 7.4.4).

При осмотре с помощью DIC, поверхность предметного стекла гемоцитометра разделяется на пять основных квадратов, которые далее делятся на 25 или 16 квадратов для удобства подсчета. Должно быть определено первоначальное количество ооцист или цист, содержащихся в пределах центрального главного квадрата. Это включает в себя подсчет количества ооцист или цист, содержащихся в каждом из малых квадратов, последовательно разделяя квадраты, двигаясь слева направо по главному квадрату. Чтобы избежать двойного подсчета организмов, те из них, которые касаются граничных линий малых разделенных квадратов, должны учитываться только в том случае, если они касаются левой или верхней линий. Должно быть подсчитано не менее 100 ооцист или цист. Если общее количество подсчитанных организмов меньше указанного количества, должны быть подсчитаны остальные главные квадраты, пока не будет получено 100. Подсчитывают общее количество организмов, а затем записывают количество подсчитанных главных квадратов.

Площадь счетных камер на главном квадрате составляет 1 мм^2. Для того чтобы определить количество ооцист на миллилитр, количество на главном квадрате или среднее количество по всем квадратам умножают на 100, чтобы преобразовать его в квадратные сантиметры. Глубина счетной камеры составляет 0,1 мм, так что значение дополнительно умножают на 100, чтобы получить количество на миллиметр.

Указанное уравнение (D.2) следует использовать для определения числа ооцист или цист в разведенной исходной суспензии.

$$\frac{n_{(oo)cysts}}{n_{square}} \times 10\,000 = c_{(oo)cysts}, \qquad (D.2)$$

где $n_{(oo)cysts}$ — общее количество подсчитанных ооцист или цист;

n_{square} — количество подсчитанных главных квадратов;

$c_{(oo)cyst}$ — количество ооцист или цист на миллиметр.

Выполняют три повторных подсчета на разведенной исходной суспензии и вычисляют среднее количество организмов.

Используют следующую формулу для определения точного количества ооцист или цист в миллилитре неразведенной исходной суспензии. Полученное значение используют, чтобы вычислить последовательные коэффициенты разведения.

$$\frac{10\,000}{V_A} \times \bar{c}_{(oo)cysts} = c_{(oo)cysts}, \qquad (D.3)$$

где V_A — объем А, мкл;

$\bar{c}_{(oo)cysts}$ — среднее количество ооцист или цист в миллилитре (разведенная исходная суспензия);

$c_{(oo)cyst}$ — количество ооцист или цист в миллилитре.

D.3 Рабочие характеристики суспензий для положительного контроля

Готовят 10 мл суспензии ооцист криптоспоридий и цист лямблий в пластиковой универсальной пробирке вместимостью 25 мл путем разведения в среде для хранения паразитов (см. 4.4.11) необходимого объема соответствующей неразведенной исходной суспензии, чтобы получить конечную концентрацию организмов около 1×10^3 на миллилитр на, т. е. около 100 ооцист и цист каждого организма на 100 мкл.

Встряхивают суспензию криптоспоридий и лямблий в течение 30 с, а затем распределяют по 100 мкл аликвоты суспензии на поверхности лунки предметных стекол 10 микроскопов. Сушат, фиксируют и окрашивают предметные стекла (см. 7.3). Определяют количество ооцист и цист на предметных стеклах, используя эпифлуоресцентную микроскопию (см. 7.4.2). Рассчитывают среднее количество каждого организма на предметное стекло, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Записывают результаты.

Удостоверяются, что коэффициент вариации для каждой партии матричных доз, подготовленных с использованием ручных процедур, составляет не менее 20. Если наблюдается большее значение, готовят новую партию. Удостоверяются, что среднее количество организмов, присутствующих в каждой дозе, находится в диапазоне от 80 до 120.

Примечание — Коэффициент вариации суспензии, подготовленной с использованием проточной цитометрии, намного меньше (1 %–2 %).

Имеются в продаже суспензии, содержащие известное количество ооцист криптоспоридий. Данные ооцисты сортируют с помощью проточной цитометрии, что делает возможным добавление точного количества организмов при использовании любой процедуры выделения.

D.4 Тест на определение эффективности выделения

Для проведения теста каждую неделю готовят и подсчитывают свежую суспензию для испытания.

D.4.1 Небольшие объемы

Встряхивают суспензию для испытания в течение 30 с. Добавляют около 8 л пробы воды в емкость вместимостью 10 л. Вносят пипеткой 100 мкл суспензии для испытания в емкость и доводят ее объем приблизительно до 10 л. Обрабатывают пробу в соответствии с методиками, установленными в приложении В, или фильтруют пробы в соответствии с 7.1.1–7.1.3. Должны быть приняты меры, гарантирующие, что скорость потока не превышает скорость, указанную изготовителем. При использовании фильтров, сразу после пропускания пробы воды через фильтр добавляют в емкость еще 2 л фильтрованной деионизированной воды, ополаскивают емкость и пропускают промывочную воду через фильтр. Обрабатывают фильтры в соответствии с 7.1.1–7.1.3, в зависимости от типа используемого фильтра, и определяют процент выделения.

D.4.2 Большие объемы

Посев фильтров осуществляют в соответствии с D.4.1. Подключают фильтры к источнику воды, который будет тестироваться. Если фильтры необходимо транспортировать из места отбора пробы в лабораторию, они должны быть запечатаны, чтобы предотвратить потерю воды, и транспортироваться в соответствии с разделом 6. Скорость потока не должна превышать скорость, рекомендованную изготовителями фильтрационных устройств. Фильтр должен быть с расходомером для определения объема фильтрованной воды. Фильтр должен быть способен работать до тех пор, пока не будет обработан минимальный объем, эквивалентный тому, который обычно анализируется в лаборатории. Затем фильтр следует извлечь и отвезти в лабораторию для анализа.

Невозможно указать рекомендации о проценте выделения, который должен быть достигнут, поскольку его значение может отличаться в зависимости от типа воды. В качестве справочной информации могут быть использованы результаты, опубликованные в технической литературе, которые приведены в приложении Е. Эффективность выделения постоянно оценивается методиками, указанными в настоящем стандарте, при исследовании проб тех типов воды, которые регулярно анализирует лаборатория.

Приложение Е
(справочное)

Примеры эффективности различных методов

Е.1 Концентрирование проб воды карбонатом кальция

Весей и др. [9] описывают метод концентрирования проб воды карбонатом кальция для выделения криптоспоридий. 608 ооцист были внесены в 10 л деионизированной, водопроводной и речной воды, соответственно. После концентрирования пробы центрифугировали, осадки окрашивали и подсчитывали с помощью проточной цитометрии. Степень выделения для деионизированной воды составила 70,8 %–79,7 % % (n = 3), водопроводной воды — 69,0 % — 76,9 % (n = 3) и речной воды — 69,0 %–79,0 % (n = 3).

Стэнфилд и соавторы [6] оценивали метод концентрирования проб воды карбонатом кальция, сульфатом железа и сульфатом алюминия. Среднее значение степени выделения криптоспоридий в двух лабораториях находилось в диапазоне 75,0 %–95,4 % при концентрировании проб воды сульфатом алюминия и 60,6 %–64,1 % при концентрировании проб воды карбонатом кальция. Среднее значение степени эффективности выделения лямблий находилось в диапазоне 62,2 %–93,0 % при концентрировании проб воды сульфатом алюминия и 50,0 %–61,8 % при концентрировании проб воды карбонатом кальция.

Е.2 Концентрирование проб воды сульфатом железа (II)

Стэнфилд и др. [6] оценивали метод концентрирования проб воды сульфатом железа (II). Среднее значение степени выделения криптоспоридий при концентрировании проб воды сульфатом железа находилось в диапазоне 74,1 %–77,1 %, среднее значение степени выделения лямблий — в диапазоне 67,6 %–81,3 %.

Е.3 Концентрирование проб воды с помощью мембранной фильтрации

Е.3.1 Общие положения

Даусон и др. [5] использовали мембранную фильтрацию с использованием мембранных фильтров диаметром 142 мм с размером пор 1,2 мкм, изготовленных из акриловых сополимеров (Sartorius), для выделения ооцист из 10 л искусственно загрязненных проб водопроводной воды, содержащих конкретный материал. Пробы воды были очищены цитратом калия. Среднее количество внесенного материала составило 187,5 ооцист, а среднее значение степени выделения — 25,5 % (n = 19).

Несколько типов мембранных фильтров были исследованы Стэнфилдом и др. [6] для выделения как ооцист, так и цист. Ооцисты и цисты в концентрации 10^5 были внесены в 100 л воды, которую пропустили через фильтры без использования процесса очистки. Одна лаборатория достигла гораздо лучших результатов, чем вторая. Хорошие результаты получили с использованием мембранных фильтров, изготовленных из поликарбоната, — 42,3 %–83,5 % для криптоспоридий и 20,0 %–70,2 % для лямблий, с использованием мембранных фильтров, изготовленных из ацетата целлюлозы, — 52,5 %–80,8 % для криптоспоридий и 33,1 %–101,6 % — для лямблий и с использованием мембранных фильтров, изготовленных из акрилового сополимера, — 27,0 %–96,1 % для криптоспоридий и 31,6 %–75,6 % для лямблий. Сведения о диаметрах мембранных фильтров, размерах пор или изготовителях отсутствуют.

Фрэнсис и др. [8] сообщили о получении среднего значения степени выделения криптоспоридий из 10 л искусственно загрязненных проб водопроводной воды, равного 72,8 % при полученных в течение 12 мес результатах, находящихся в диапазоне 24,0 %–103,9 % (n = 45), а для лямблий — 64,3 % при диапазоне 15 %–103,1 %. Данные основаны на проведенных еженедельных испытаниях, включающих IMS, используя гранулы Dynal.

Е.3.2 Концентрирование проб воды с использованием фильтра IDEXX Filta-Max®

Сартори и др. [7] оценивали фильтр IDEXX Filta-Max® для выделения ооцист из искусственно загрязненной водопроводной (100–2 000 л) и речной (10–20 л) воды. Количество внесенных ооцист составляло 1 040–3 600. Значения степени выделения ооцист для водопроводной воды находились в диапазоне 76,9 %–106,7 % (n = 16), а для речной воды — 79,0 %–97,2 % (n = 8). Подсчет осуществлялся без дальнейшей обработки.

E.3.3 Концентрирование проб воды с использованием набора Aureon IMS – Cryptosporidium

Рок и др. [3] сравнили значения степени выделения ооцист криптоспоридий, полученные при использовании Aureon IMS и Dynal IMS. Для сравнения использовались 0,5; 1,0 и 2,5 мл осадка. Были получены сведения о том, что использование Aureon IMS предпочтительно при более высоких объемах осадка. Также были использованы концентрированные пробы воды из реки Рио-Гранде и две концентрированные пробы питьевой воды, полученные в результате контроля питьевой воды в Великобритании. Дополнительно было установлено, что значение pH при проведении испытания, с использованием гранул Dynal IMS менялось в зависимости от объема используемого осадка и времени. Регулировка pH до 7,00 при проведении испытания с использованием гранул Dynal IMS позволила улучшить степень выделения. При использовании Aureon IMS не требовалась регулировка pH.

При испытании концентрированных проб искусственно загрязненной воды результаты, полученные при использовании Aureon IMS, лучше, чем при использовании Dynal IMS (80,87 % против 55,7 %, n = 7) и (77,23 % против 27,77%, n = 12).

E.3.4 Концентрирование проб воды с использованием гранул Dynal IMS – Cryptosporidium

Кэмпбелл и др. [4] сравнивали значения степени выделения ооцист криптоспоридий из чистой и мутной воды с использованием гранул Dynal IMS при проведении испытаний, используя стандартные методы, действующие в Великобритании и США. В чистой воде, полученной методом обратного осмоса, в которую были внесены «старые» ооцисты ($2{,}1\times10^4$) степень выделения составила 97,4 %, в мутной воде — 65,8 % (n = 5). При использовании для искусственного загрязнения воды только 8 «зрелых» ооцист значение степени выделения равнялось для чистой воды — 7 % и для мутной воды — 6,8 % (n = 2). При использовании жизнеспособных ооцист шестимесячного возраста значение степени выделения равнялось для чистой воды — 90,4 %, для мутной воды — 64,3 % (n = 4). Работа проводилась путем посева концентрированных проб.

Уоткинс и др. [10] сравнивали эффективность метода с использованием гранул Dynal IMS с эффективностью метода с использованием гранул Isolate IMS при испытании 1 000 л пробы воды, отобранной в течение 24 ч, и с эффективностью при использовании фильтров IDEXX Filta-Max®, искусственно загрязненных 80–120 ооцистами. Значения степени выделения находились в диапазоне 45,2 %–58,1 % при среднем значении 52,0 % (n = 11). При проведении межлабораторного испытания с использованием тех же методов значения степени выделения находились в диапазоне 13,3 %–71,7 % при среднем значении 45,4 % (n = 30). Низкие значения, полученные в одной из лабораторий, участвовавших в межлабораторном испытании, могли быть вызваны химическим составом воды.

E.3.5 Концентрирование проб воды с использованием гранул Isolate IMS – Cryptosporidium

Уоткинс и др. [10] сравнивали эффективность метода с использованием гранул Isolate IMS с эффективностью метода с использованием гранул Dynal IMS при испытании 1 000 л пробы воды, отобранной в течение 24 ч, и с эффективностью при использовании фильтров, искусственно загрязненных 80–120 ооцистами. Значения степени выделения находились в диапазоне 34,7 %–79,8 % при среднем значении 58,8 % (n = 11). При проведении межлабораторного испытания, используя те же методы, значения степени выделения находились в диапазоне 2,7 %–90,3 % при среднем значении 42,5 % (n = 30). Низкие значения, полученные в одной из лабораторий, участвовавших в межлабораторном испытании, могли быть вызванным химическим составом воды.

E.3.6 Концентрирование проб воды с использованием гранул CelLabs mAb – Cryptosporidium

Уоткинс и др. [10] сравнивали эффективность метода с использованием гранул CelLabs mAb с эффективностью метода с использованием гранул Dynal IMS при испытании 1 000 л пробы воды, отобранной в течение 24 ч, и с эффективностью при использовании фильтров, искусственно загрязненных 80–120 ооцистами. Значения степени выделения находились в диапазоне 51,7 %–74,1 % при среднем значении 60,5 % (n = 10). При проведении межлабораторного испытания с использованием тех же методов значения степени выделения находились в диапазоне 4,6 %–84 % при среднем значении 41,1 % (n = 30).

Е.3.7 Концентрирование проб воды с использованием гранул Microgen mAb – Cryptosporidium

Уоткинс и др. [10] сравнивали эффективность метода с использованием гранул Microgen mAb с эффективностью метода с использованием гранул Dynal IMS при испытании 1 000 л пробы воды, отобранной в течение 24 ч, и с эффективностью при использовании фильтров, искусственно загрязненных 80–120 ооцистами. Значения степени выделения находились в диапазоне 34,2 %–72,5 % при среднем значении 54,2 % (n = 10). При проведении межлабораторного испытания с использованием тех же методов значения степени выделения находились в диапазоне 8,3 %–68 % при среднем значении 41,3 % (n = 30).

Приложение F
(справочное)

Альтернативные методы

Методы выявления и подсчета криптоспоридий и лямблий находятся в постоянном развитии. В настоящее время методы, установленные в настоящем стандарте, являются наиболее широко используемыми и подтвержденными. Существуют и методы, отличающиеся от установленных в настоящем стандарте, которые могут использоваться в определенных лабораториях. В будущем могут быть разработаны новые методы или будут усовершенствованы существующие.

Чтобы обеспечить достоверные результаты новые и отличающиеся методы могут быть оценены и сравнены с методами, установленными в настоящем стандарте (новые и отличающиеся методы следует использовать, только если они достигают таких же или лучших рабочих характеристик, что и методы, установленные в настоящем стандарте). Важно, чтобы степень выделения не была ниже, чем в методе, установленном в настоящем стандарте, который лучше всего подходит к исследуемому типу воды.

Приложение G
(справочное)

Дополнительные сведения о криптоспоридиях и лямблиях

Криптоспоридии

Криптоспоридия, паразит подкласса кокцидий, является членом таксонометрической группы Apicomplexa, класс Sporozoasida, подкласс Coccidiasina, отряд Eucoccidiorida, подотряд Eimeriorina, семья Cryptosporidiidae. Название рода описывает трансмиссивный этап (ооцисты), который содержит четыре спорозоита, которые не заключены в спороцисты. В отличие от других паразитов кокцидий, ооцисты которых требуют периода созревания (спороношения) вне хозяина, чтобы стать заразными для следующего хозяина, ооциста криптоспоридий полностью спорулирована и является инфекционной для другого восприимчивого хозяина после выделения из организма.

В этом роду было описано более двадцати видов на основе животных-хозяев, из которых они были выделены. Хозяйская специфичность в качестве критерия для видообразования кажется плохо обоснованной, так как у некоторых видов отсутствует такая специфичность вида. В настоящее время существует 16 признанных видов: C. hominis у человеке, C.parvum у млекопитающих, C. muris у грызунов, C. felis у домашних кошек, C. canis у собак, C. andersoni у жвачных животных, C. bovis у крупного рогатого скота, C. wrayii у млекопитающих, C. baileyi и C. meleagridis, инфицирующий птиц, и C. serpentis у рептилий, C. nasorum, инфицирующий рыбу, C. galli у чаек, C. molnari у рыб, C. suis у свиней и C. saurophilum у сцинков. Последние генетические анализы вызвали сомнения относительно обоснованности современных видов и ранее принятых критериев, включая морфологии ооцист. Хозяйская специфичность и размещение паразита — недостаточные отличительные признаки для видообразования.

В дополнение к C. Hominis и C. parvum были обнаружены у иммунокомпетентных лиц C. canis, C. felis и C. meleagridis, а C. muris у лиц с ослабленным иммунитетом. Выявление последовательности ДНК, основанной на выявленных различиях в рибосомальной РНК (рРНК) ранее действительных видов, означает вероятность дальнейших изменений в пределах этого рода.

Ооцисты C. hominis и C.parvum бесцветные преломляют свет, имеют сферическую или полусферическую форму, гладкую толстую стенку и размеры 4,5–5,5 мкм. Спорулированная ооциста содержит четыре удлиненных голых (т. е. не в спороцисте) спорозоита и цитоплазматическое остаточное тело. Ооцисты являются инфекционными после выделения из организма.

Лямблии

Жгутиковый паразит лямблия является членом таксонометрической группы Metamonada, класс Trepomonadea, отряд Diplomonadida, семья Hexamitidae. В роде Giardia существует около 40 видов, признанных видов на основе животных-хозяев, из которых они были выделены. Также как и для криптоспоридии, хозяйская специфичность в качестве критерия для видообразования кажется плохо обоснованной, так как у некоторых видов отсутствует такая специфичность. Фелис (1952) разделил род на три «типа» видов на основе морфологии и морфометрии трофозоита. Дальнейшие стабильные морфологические критерии были использованы для расширения рода Giardia до пяти видов: G. agilis, инфицирующая земноводных, G. muris, инфицирующая грызунов, G. duodenalis, инфицирующая млекопитающих, G. psittaci, инфицирующая волнистых попугайчиков и попугаев, и G. ardeae, инфицирующая большую голубую цаплю. Паразиты, инфицирующие человека, известные как G. intestinalis (= лямблии) относят к видам duodenalis Фелис (1952). Некоторые авторитетные авторы выделяют Giardia intestinalis в подвид G. duodenalis.

Выделенные G. intestinalis, инфицирующие человека, были разбиты на два комплекса, обозначенные A и B, основываясь на генотипировании. Комплекс A также подразделяется на две подгруппы, обозначенные I и II. Комплекс A группа I, которая была обнаружена у самых разнообразных животных, включая крупный рогатый скот, кошек, собак, бобров, морских свинок и медленных лори. Комплекс A группа II была обнаружена только у человека. Комплекс B также имеет широкий диапазон хозяев, включая собак, бобров, крыс, медленных лори, шиншилл и сиамангов.

Зрелые цисты G. intestinalis имеют овальную форму, размер составляет 8–12 мкм в длину и 7–10 мкм в ширину, имеют четыре ядра и содержат различимые остатки микрофиламентов и микротрубочек трофозоита. Цисты являются инфекционными после выделения из организма.

Приложение Н
(справочное)

Сведения об изготовителях

Фильтры

Sartorius

Sartorius AG,
Weender Landstrasse 94-108,
D-37075 Goettingen,
Germany.
Tel: +(49) 551 308 0
Fax: +(49) 551 308 3289
E-mail: gost.e-ecolog.ru

IDEXX Filta-Max® (включая установки для промывки и пробирки)

IDEXX (Genera Technologies) Limited,
Unit 5 F, Lynx Business Park,
Fordham Road,
Snailwell,
Newmarket,
Cambridgeshire, UK
CB8 7NY
Tel: +44(0) 1638 723011
Fax: +44(0) 1638 723012
E-mail: gost.e-ecolog.ru
Web site: gost.e-ecolog.ru

Pall Envirochek™ STD and HV (включая встряхиватель и Laureth 12)

Pall Corporation,
600 South Wagner Road,
Ann Arbor,
MI 48103-9019,
USA.
Tel: +734 665 0651
Fax: +734 913 6114
E-mail:
Web site: gost.e-ecolog.ru

Иммуномагнитные гранулы — Cryptosporidium

Aureon Biosystems GmbH,
Simmering Hauptstraße 24,
A-1110 Vienna,
Austria.
Tel: +43 1740 40 350
Fax: +43 1740 40 359
E-mail: gost.e-ecolog.ru
Website: gost.e-ecolog.ru

Dynal Biotech,
P.O. Box 114 Smestad,
0309 Oslo,
Norway.
Tel: +(47) 22 06 10 00
Fax: +(47) 22 50 70 15
E-mail: gost.e-ecolog.ru

TCS Biosciences Limited,
Botolph Claydon,
Buckingham,
England.
MK18 2LR
Tel: +(44) (0) 1296 714222
Fax: +(44) (0) 1296 714806
E-mail: gost.e-ecolog.ru
Web Site: gost.e-ecolog.ru

Иммуномагнитные гранулы — Giardia

Aureon
(См. выше)

Dynal
(См. выше)

Моноклональные антитела — Cryptosporidium

TCS Biosciences Limited,
Botolph Claydon,
Buckingham,
England.
MK18 2LR
Tel: +(44) (0) 1296 714222
Fax: +(44) (0) 1296 714806
E-mail: gost.e-ecolog.ru
Web Site: gost.e-ecolog.ru

Meridian Biosciences Inc.
3471, River Hills Drive
Cincinnati
Ohio 45244 USA
Tel: +513 271 3700
Fax: +513 271 3762
Web Site: gost.e-ecolog.ru

BTF Pty Ltd
Unit 1
35 - 41 Waterloo Road
North Ryde
New South Wales 1670
Australia
Tel: +61 2 8877 9150
Fax: +61 2 8877 9101
E-mail: gost.e-ecolog.ru
Web site: gost.e-ecolog.ru

Microgen Bioproducts Limited,
1, Admiralty Way,
Camberley,
Surrey, England.
GU15 3DT
Tel: +(44) (0) 1276 600081
Fax: +(44) (0) 1276 600151
E-mail:
Web Site: gost.e-ecolog.ru

Waterborne Inc.,
6047 Hurst Street,
New Orleans,
LAS 70118,
USA.
Tel: +504 895 3338
Fax: +504 895 3338
E-mail: gost.e-ecolog.ru
Web Site: gost.e-ecolog.ru

Novocastra Laboratories Ltd
Balliol Business Park West
Benton Lane
Newcastle upon Tyne, England.
NE12 8EW
Tel: +44 (0) 191 215 0567
Fax: +44 (0) 191 215 1152
Web site: gost.e-ecolog.ru

Моноклональные антитела — Giardia

BTF Ltd
(См. выше)

Cellabs
(См. выше)

Meridian
(См. выше)

Microgen
(См. выше)

Waterborne
(См. выше)

Ооцисты криптоспоридий

Moredun Scientific Limited,
Pentlands Science Park,
Bush Loan,
Penicuik,
Midlothian, Scotland.
EH26 0PZ
Tel:
Fax:
E-mail:

Waterborne Inc.
(См. выше)

TCS Biosciences Ltd
(См. выше)

BTF Pty Ltd
(См. выше)

Цисты Giardia

Waterborne Inc.
(См. выше)

TSC Biosciences Ltd
(См. выше)

BTF Ltd
(См. выше)

Библиография

[1] ISO 3696 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods
(Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

[2] ISO 19458 Water quality — Sampling for microbiological analysis
(Качество воды. Отбор проб для микробиологического анализа)

[3] Rock, C.M., Kuhn, R.C., Oshima, K.H. and Campbell, A. Interaction of matrix and immunimagnetic separation (IMS) recovery of Cryptosporidium oocysts from environmental samples. WQTC Proceedings, American Water Works Association, 2001
(Взаимодействие матрицы и иммуномагнитное разделение (IMS) при выделении ооцист криптоспоридий из проб, отобранных в окружающей среде)

[4] Campbell, A.T., Gron, B. and Johnsen, S.E. Immunomagnetic separation of Cryptosporidium oocysts from high turbidity water sample concentrates, International symposium on waterborne Cryptosporidium. American Water Works Association, Denver, CO, 1997, pp. 91-96
(Иммуномагнитное разделение ооцист криптоспоридий из концентрированных проб воды высокой степени мутности)

[5] Dawson, D.J., Maddocks, M., Roberts, J. and Vidler, J.S. Evaluation of recovery of Cryptosporidium parvum oocysts using membrane filtration. Letters in Applied Microbiology, 17(6), 1993, pp. 276-279
(Оценка степени выделения ооцист криптоспоридий parvum методом мембранной фильтрации)

[6] Stanfield, G., Carrington, E., Albinet, F., Compagnon, B., Dumoutier, N., Hambsch, B., Lorthioy, A., Medema, G., Pezoldt, H., De Roubin, M.R., De Lohman, A. and Whitmore, T. An optimised and standardised test to determine the presence of the protozoa Cryptosporidium and Giardia in water. Water Science and technology, 44(7), 2000, pp. 103-110
(Оптимизированное и стандартизированное испытание для определения присутствия простейших криптоспоридий и лямблий в воде)

[7] Sartory, D.P., Parton, A., Parton, A.C., Roberts, J. and Bergmann, K. Recovery of Cryptosporidium oocysts from small and large volume water samples using a compressed foam filter system. Letters in Applied Microbiology, 27(6), 1998, pp. 381-322
(Улавливание ооцист криптоспоридий из проб воды малых и больших объемов, используя фильтр из прессованного поролона)

[8] Francis, C., Corscadden, D., Watkins, J. and Wyer, M. An evaluation of the current methods for the detection of Cryptosporidium in water. In: Cryptosporidium: The Analytical Challenge, Eds. Smith, M. and Thompson, K. C., Royal Society of Chemistry, 2001, pp. 133-142
(Оценка современных методов выявления криптоспоридий в воде)

[9] Vesey, G., Slade, J.S., Bryne, M., Shepherd, K. and Fricker, C.R. A new method for the concentration of Cryptosporidium oocysts from water. Journal of Applied Bacteriology, 75(1), 1993, pp. 82-87
(Новый метод концентрирования ооцист криптоспоридий из воды)

[10] Watkins, J., Francis, C. and Wyer, M. The evaluation of new methods for the detection and enumeration of Cryptosporidium spp in drinking water. In: Proceedings of a workshop, Regulatory Cryptosporidium 11 months on, 2001
(Оценка новых методов выявления и подсчета криптоспоридий (Cryptosporidium spp) в питьевой воде)

[11] Rushton, P. Place, B.M. and Lightfoot, N.F. An evaluation of a laser scanning device for the detection of Cryptosporidium parvum in treated water samples. Letters in Applied Microbiology, 30, 2000, pp. 303-307
(Оценка лазерного сканирующего устройства для выявления криптоспоридий (Cryptosporidium parvum) в пробах очищенной воды)

УДК 628.1.03:579.842.17(083.74)(476) МКС 07.100.20 IDT

Ключевые слова: качество воды, выделение из воды, идентификация, ооциста криптоспоридий, Cryptosporidium, циста лямблий, Giardia

Ответственный за выпуск *О. В. Каранкевич*

Сдано в набор 12.10.2017. Подписано в печать 26.10.2017. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 4,77 Уч.-изд. л. 2,63 Тираж 2 экз. Заказ 2167

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/303 от 22.04.2014
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru