МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

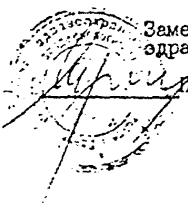
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО КОНТРОЛЮ И ОЦЕНКЕ ВИРУСНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Москва, 1986 год

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР



Заместитель Министра
здравоохранения СССР
Л.Н.Бургасов

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО КОНТРОЛЮ И ОЦЕНКЕ ВИРУСНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Москва, 1986 год

Методические рекомендации разработаны Ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательским институтом общей и коммунальной гигиены им. А.Н.Сысина АМН СССР (Р.А. Дмитриева, Т.В.Доскина, Л.А.Мышляева, А.Е.Недачин) при участии Куйбышевского НИИ гигиены МЗ РСФСР (П.М.Шарлот).

Методические рекомендации предназначены для республиканских, краевых, областных, городских и районных СЭС и научно-исследовательских институтов.

Методические рекомендации рассмотрены Лабораторным Советом при Минздраве СССР и рекомендованы к утверждению.

Настоящие методические рекомендации разрешается размножить в необходимом количестве.

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач СССР
П.Н.БУРГАСОВ
24 сентября 1986 г.
№ 4146-86

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО КОНТРОЛЮ И ОЦЕНКЕ ВИРУСНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Введение.

В системе гигиенических и противоэпидемических мероприятий по ограничению циркуляции возбудителей вирусной природы и снижению заболеваемости важная роль принадлежит контролю и оценке качества объектов окружающей среды в отношении вирусного загрязнения.

Контроль качества объектов окружающей среды должен основываться на эффективных современных методах индикации максимально широкого спектра возбудителей вирусной природы, в передаче которых человеку ведущая роль отводится объектам окружающей среды. Однако, существующие методы индикации вирусов в объектах окружающей среды трудоемки, дороги, длительны по срокам выполнения и позволяют получать только ретроспективные данные, что снижает их эпидемическую значимость.

В связи с вышеизложенным, на современном этапе текущий санитарный контроль за вирусным загрязнением объектов окружающей среды должен осуществляться по косвенным показателям – индикаторам вирусного загрязнения; по эпидпоказаниям – проводится непосредственное выделение возбудителей вирусной этиологии из объек-

тов окружающей среды с регистрацией их уровней.

Методические рекомендации разработаны с целью дальнейшего совершенствования мер неспецифической профилактики вирусных заболеваний, принципов нормирования вирусного загрязнения объектов окружающей среды и включают: обоснование выбора косвенных показателей вирусного загрязнения, методы их индикации и лимитирующие уровни, комплексную схему санитарно-вирусологического исследования, поэтапные схемы выделения вирусов с учетом особенностей каждого объекта окружающей среды.

Настоящие методические рекомендации предназначены для использования в республиканских, краевых, областных, (и районных) городских СЭС, осуществляющих контроль за санитарно-гигиеническим состоянием объектов окружающей среды и в научно-исследовательских учреждениях гигиенического профиля.

I. Сокращения, используемые в тексте.

Колифаг – бактериофаг кишечной палочки

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

НВЧ – наиболее вероятное число

ИГКМ – индекс гемолитической кокковой микрофлоры

С – сумма отношений концентраций химических веществ с одним лимитирующим показателем вредности к их предельно допустимой концентрации

БОЕ/л – бляшкообразующие единицы в литре

СЭС – санитарно-эпидемиологическая станция

ТЦД – тканевая цитопатогенная доза

ФП – фильтры Петрянова

2. Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды

Для проведения исследований используют:

аппарат для встряхивания жидкостей в колбах и пробирках универсальный АВУ-10П или АВУ-6П;

весы равноплечие, ручные ВР-100 ГОСТ 395-54;

весы лабораторные ГОСТ 19491-74;

воронки стеклянные ГОСТ 86-13-64;

вата медицинская гигроскопическая ГОСТ 5556-66;

гомогенизатор или размельчитель тканей РТ-1 или РТ-2;

держатель фильтров размером 30, 70, 140 мм;

Инструменты зажимные медицинские с кремальерой ГОСТ 21138-77

изотермические сумки;

колбы стеклянные лабораторные ГОСТ 10394-72;

колбы стеклянные с градуированной горловиной ГОСТ 12738-77

лейкопластырь ГОСТ 97709-81;

магнитный смеситель с магнитом цилиндрическим МЗЗ-94-6245;

микроскоп МБИ-1 ГОСТ 8284-67 или серии БИОЛАМ типа Р (рабочие), отечественные;

марля медицинская ГОСТ 9412-67;

насос водоструйный ГОСТ 10696-75;

насос вакуумный портативный ГОСТ 21710-76;

потенциометр постоянного тока измерительный ГОСТ 9245-68;

прибор для бактериологического анализа воздуха, модель 818;

прибор для отбора проб воздуха ПОВ-1;

прибор для отбора аэрозолей ПАБ-1;

перчатки хирургические резиновые А7 ГОСТ 3-75;

полиэтиленовая пленка ГОСТ 7852-76;

пробки резиновые конусные ГОСТ 7852-56;

пинцеты медицинские ГОСТ 21241-77;

приборы медицинские стеклянные ГОСТ 20292-74:

бюретки;

посуда мерная лабораторная;

пипетки вместимостью 2,0-5,0-10,0 с ценой деления на 0,1, на полное выливание;

пастеровские пипетки;

флаконы стеклянные вместимостью 50,0 и 100,0 мл;

пробирки стеклянные ГОСТ 10516-75;

разновесы ГОСТ 7328-65;

склянки с тубусом ГОСТ 10238-74;

скальпель и ножи медицинские ГОСТ 21240-77;

стекла предметные ГОСТ 9284-59;

стекла покровные ГОСТ 6672-59;

сосуды стеклянные лабораторные ГОСТ 10565-75;

стаканы и колбы стеклянные лабораторные ГОСТ 10973-75;

термостат электрический для выращивания бактерий с автоматическим терморегулятором до температуры 50°С с ценой деления 0,2°С

ткани фильтровальные ГОСТ 10146-74 (стекловата);

ткань фильтровальная ФП (Петрянова) марки ФПП-3/30-3; ФПП-70-15-1,5;

ультразвуковой диспергатор УЗДН-1 (отечественный);

фольга алюминиевая для упаковки по ГОСТ 745-73;

холодильник бытовой электрический с температурой в камере 4-6°С;

центрифуга лабораторная рефрижераторная ЦЛР-1.Р ТУ 42-2145-67;

цилиндры измерительные емкостью 500,0 мл ГОСТ 1770-74;

чашки Петри ГОСТ 11232-65;

агар микробиологический ГОСТ 11206-71;

аммоний сернокислый ГОСТ 3758-75;

вода дистиллированная ГОСТ 6709-72;

калий фосфорнокислый однозамещенный ГОСТ 4198-75;

калий фосфорнокислый двузамещенный ГОСТ 3204-66;

калий гидрат окиси ГОСТ 4203-65;

кислота уксусная ГОСТ 61-75;

кислота серная ГОСТ 4204-66;

магний хлористый кристаллический ГОСТ 4209-67;

магний сернокислый ГОСТ 4523-77;

натрий лимоннокислый трехзамещенный ГОСТ 22280-76;

натрий гидрат окиси ГОСТ 4328-66;

натрий фосфорнокислый однозамещенный ГОСТ 245-66;

натрий фосфорнокислый двузамещенный безводный по ГОСТ 11773-66;

натрий хлористый ГОСТ 4233-66;

натрий двууглекислый ГОСТ 4201-66;

нейтральный красный

полиэтиленгликоль с м.в. 6000, 4000;

спирт этиловый ректификованный ГОСТ 5962-67;

фреон 113 (1,1,2-трихлортрифторэтан);

эфир этиловый или бутиловый уксусной кислоты ГОСТ 22300-76;

мясо-пептонный бульон ГОСТ 20730-75;

раствор Эрла - 10кратный;

раствор Версена;

раствор Хенкса, pH 7,4;

раствор трипсина 0,25%;

раствор Эрла, pH 7,6;

среда с 0,5% гидролизата лактальбумина на растворе Хенкса с pH 7,0;

среда с 0,5% гидролизата лактальбумина на растворе Эрла с pH 7,6;

среда 199 на растворе Хенкса pH 7,2;

среда 199 на растворе Эрла;

среда Игла pH 7,2;

среда Игла МЕМ для культуры клеток pH 7,2;

полиглюкин;

сыворотка крупного рогатого скота без консерванта;

хлороформ;

бензилпенициллина натриевая соль;

хлоркальциевый комплекс стрептомицина;

нистатин;

смола АВ-17-8, АВ-17-ИК;

Бактерии *E coli* B, штаммы АТСС 11330, *Adams* (Государственный контрольный институт бактериальных препаратов им. Л.А.Тарасевича, НИИ общей и коммунальной гигиены им. А.Н.Сысина АМН СССР).

3. Обоснование косвенных показателей вирусного загрязнения объектов окружающей среды.

В действующих нормативах и законодательных документах оценка эпидемической безопасности объектов окружающей среды осуществляется с использованием косвенных бактериальных показателей. Однако, существующие показатели не всегда адекватны в отношении вирусного загрязнения.

В настоящее время для оценки вирусного загрязнения водных объектов и почвы предлагается использовать колифаг. Колифаг-вирус бактериальной клетки, способный лизировать кишечную палочку (*E. coli*) и давать негативные колонии через 18-24 часа при 37°С на 1,5% МПА. Колифаги в полной мере отвечают требованиям, предъявляемым к индикаторным микроорганизмам: имеют единый с вирусами источник поступления в объекты окружающей среды, по размерам, строению, свойствам приближается к человеческим вирусам, обнаруживается во всех объектах, где могут встретиться энтеровирусы, его концентрации значительно превышают концентрации вирусов, он

безвреден для человека, более устойчив, чем бактерии группы кишечной палочки к естественным факторам окружающей среды и обеззараживающим средствам; по срокам выживаемости в объектах окружающей среды приближаются к вирусам. Методы выделения колифагов не требуют сложного оборудования, чувствительны, надежны, эффективны, просты. Количественный учет, проводимый либо по бляшкообразующим единицам, либо по НВЧ сопоставим с современными методами количественного учета энтеровирусов.

Для воздуха закрытых помещений и, в первую очередь, для больничных палат адекватным показателем санитарно-гигиенического состояния является индекс гемолитической кокковой микрофлоры (ИГКМ). ИГКМ-количество микробных клеток гемолитической кокковой микрофлоры в I $м^3$ воздуха, приходящиеся на 1000 микробных клеток общей микрофлоры. Увеличение количества гемолитических стафилококков и стрептококков на поверхности слизистой верхних дыхательных путей наблюдается у больных и ослабленных людей. При этом происходит массивное их выделение в воздух. Гемолитическая микрофлора (гемолитические стрептококки и стафилококки) - отвечают требованиям, предъявляемым к индикаторным микроорганизмам и широко используются для оценки санитарного состояния воздушной среды помещений. В то же время ИГКМ отражает не только санитарное, но и эпидемическое состояние воздушной среды закрытых помещений в отношении различных аэрогенных инфекций.

4. Комплексная схема контроля и оценки качества объектов окружающей среды по вирусологическим показателям

На современном уровне развития гигиенической науки критериями эпидемической безопасности объектов окружающей среды в отношении вирусного загрязнения является отсутствие в них опасных для человека возбудителей вирусной и бактериальной природы в опреде-

ченных объемах. Исходя из этого положения, в основу комплексной схемы санитарно-вирусологического контроля и оценки качества объектов окружающей среды положены следующие критерии:

- отсутствие вирусов в определенных объемах исследуемых объектов с учетом чувствительности предлагаемых методов;

- нормативные допустимые уровни косвенных показателей, обеспечивающие безопасность объектов в отношении вирусного загрязнения.

Контроль объектов окружающей среды на наличие колифагов проводится бактериологическими лабораториями, обследованию подлежат пробы, исследуемые на коли-индекс.

Материалы, включающие показания к проведению исследований на наличие вирусов или их косвенных показателей, перечень методов выделения и нормативы оценочных показателей, систематизированные в комплексную схему контроля и оценки качества объектов окружающей среды в отношении вирусного загрязнения, представлены в таблице № 4.I.

Таблица 4.I.

Комплексная схема контроля и оценки качества объектов окружающей среды по вирусологическим показателям

Объект	Показания к проведению исследований на наличие:		Методы выделения		Оценочные показатели и их нормативные уровни
	вирусов	колифагов	вирусов	колифагов	
I	2	3	4	5	6
Сточные воды	Контроль за эффективностью очистки и обеззараживания, при индексе колифага > 1000	Контроль за эффективностью очистки и обеззараживания	Осаждение $Al_2(SO_4)_3$; сорбция на естественных сорбентах	посев 1,0мл	Индекс колифага для межэпидемического периода ≤ 1000
Сточные воды, используемые в оборотных системах технического водоснабжения	Контроль за эпидемической безопасностью сточных вод, используемых в замкнутых системах при коли-индексе > 1000 и индексе колифага > 1000	Контроль за эффективностью очистки и обеззараживания доочищенных сточных вод в замкнутых системах водоснабжения	-"-	-"-	Индекс колифага ≤ 1000
	Контроль за эпидемической безопасностью сточных вод, используемых в открытых технологических процессах при превышении коли-индекса и индекса колифага > 100	Контроль за эффективностью обеззараживания доочищенных сточных вод, используемых в открытых технологических процессах	-"-	-"-	Индекс колифага ≤ 100
Поверхностные водоемы морские и	При неблагоприятной санитарно-эпидемической ситуации	При выборе источников централизованного водопользова-	Сорбция на искусственных и ес-	посев 10мл или метод подращива-	

1	2	3	4	5	6
пресные: а)чистые и с уровнем химического загрязнения $C \leq 5^{x)}$ б)с уровнем химического загрязнения $C > 5^{x)}$		ния для характеристики завершенности процессов самоочищения	тественных сорбентах	ния	Индекс колифаг ≤ 100 Индекс колифаг ≤ 100
Зоны рекреации водных объектов (пресных и морских)	При неблагоприятной санитарно-эпидемической ситуации, при индексе ЛКП > 1000 и индексе колифага>100 в случае использования для купания; при индексе ЛКП > 10000 в случае использования для лодочно-парусного спорта	При плановых исследованиях в период водопользования не менее 1 раза в месяц	-"-	-"-	Индекс колифаг ≤ 100

x) С - в соответствии с ГОСТ 2761-84 "Источники централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения. Гигиенические, технические требования и правила выбора".

1	2	3	4	5	6
Почва населенных мест	Контроль за санитарно-эпидемическим состоянием территорий детских учреждений, зон отдыха, по эпидпоказаниям, при индексе колифага > 10	При текущем контроле, когда невозможно прямое выделение вирусов	Десорбция с последующим осаждением полиэтиленгликолем или фильтрация через фильтр Петрянова-ФП	Десорбция и прямой посев 10,0 мл	Индекс колифага ≤ 10
Воздух больничных палат	Контроль за санитарно-гигиеническим состоянием больничных помещений, а также при индексе гемолитической кокковой микрофлоры >30	При текущем контроле за санитарно-гигиеническим состоянием воздуха палат	Приборы ПОВ-1 или ПАБ-1, концентрирование методом двухфазных полимерных систем	Отбор проб аппаратом Кротова, на МПА или кровяной МПА	Индекс гемолитической кокковой микрофлоры ≤30

5. Методы выделения колифагов из объектов окружающей среды

5.I. Исследование слабозагрязненных вод

Для анализа слабозагрязненных вод, индекс колифагов в которых колеблется от единиц до десятков БОЕ/л, используют метод обогащения[x] или метод осаждения солями магния[xx].

5.I.I. Метод обогащения

Метод заключается в обогащении исследуемой воды бактериями *E. coli* и создании оптимальных условий для размножения колифагов.

В исследуемую воду объемами 500, 200, I00, 50, 20 мл вносят суспензию *E. coli* в концентрации $I0^9$ кл/мл (стандарт мутности I0 ед.) в количествах, соответственно, I мл, 0,5 мл, 0,5 мл, 0,2 мл и 0,2 мл и концентрированный МПБ с десятикратным содержанием солей и пептона в количестве I0% от объема исследуемой пробы и инкубируют при 37°С в течение I6-I8 часов. Параллельно I0 мл пробы освобождают от сопутствующей бактериальной флоры хлороформом, добавляя I мл на I0 мл пробы. Затем пробу интенсивно встряхивают и после осаждения хлороформа в течение I5-20 минут, надосадочную жидкость исследуют методом агаровых слоев. С этой целью на 4 чашки с подсушенным I,5% агаром вносят по 2,5 мл пробы и сверху наслаивают 2-3 мл расплавленного и остуженного до 45°С I,5% агара, содержащего 0,2 мл 4-часовой бульонной культуры *E. coli* (штамм АТСС II330, *Adams* или выделенный из исследуемого объекта). После застывания агара чашки инкубируют при 37° в течение I6-I8 часов. На следующий день производят подсчет образовавшихся колоний колифага на всех чашках, делают пересчет на I л исследуемой воды, т.е. вычисляют индекс колифага. При отсутствии колоний, из каждого объема, поставленного на обогащение, отливают

---

x) метод может быть использован в СЭС любого уровня

xx) метод может быть использован СЭС, имеющей центрифугу ЦЛР

в пробирки по 5 мл пробы, освобождают хлороформом от бактериальной флоры вышеизложенным способом и исследуют на наличие колифага методом агаровых слоев, высевая по I мл из каждого исследуемого объема параллельно на 4 чашки и сверху заливают 2-3 мл расплавленного и остуженного до 45°С 0,9% агара, содержащего 0,2 мл 4-часовой бульонной культуры *E. coli* . Метод агаровых слоев можно заменить капельной методикой.

При использовании капельной методики, предварительно залитые I,5% агаром чашки Петри делят на 4 сектора. На чашку наносят 2-3 капли 4-часовой бульонной культуры *E. coli* (один из вышеперечисленных штаммов) и растирают шпателем по плоскости агаровой пластины для получения равномерного сплошного газона бактериальной культуры. Через 5-I0 минут на подсушенную поверхность агара секторально наносят по I капле исследуемой проб из пробирок. На одной чашке выделяют колифаг из одного исследуемого объема. После того как жидкость впитается в агар, чашки переворачивают вверх дном и инкубируют при 37°С в течение I6-I8 часов.

Учет результатов при использовании обоих методов проводят аналогичным образом, качественно оценивая появление на 4 чашках или 4 секторах негативных колоний или зон лизиса. Проба считается положительной при обнаружении колифага хотя бы на одной из 4 чашек или на одном из 4 секторов. Содержание колифага в пересчете на I л исследуемой воды получают, пользуясь таблицей и ориентируясь на первый анализируемый объем, из которого выделен колифаг (таблица 5.I.I.).

Например: при исследовании объемов 20, 50, I00 мл положительной на колифаг оказалась проба в 50 и I00 мл, следовательно концентрация колифага составляет 20 БОЕ/л; при исследовании объемов в I00, 200, 500 мл положительным на колифаг были пробы в 200 и

500 мл-концентрация колифага составляет 5 БОЕ/л.

Таблица 5.I.I.

Определение содержания колифага в I л воды[x)]

Исследуемые объемы воды в мл	Содержание колифага в БОЕ/л
20	50
50	20
I00	I0
200	5
500	2

5.I.2. Метод осаждения солями магния

Пробу питьевой воды объемом I л при необходимости дехлорируют добавлением гипосульфата натрия ($Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$) из расчета I0-20 мг на I л воды. Затем доводят температуру воды до I8-20°С; вносят в нее, перемешивая I0 мл IM раствора сульфата магния ($MgSO_4 \times 7H_2O$) и по каплям 3,5 мл IM раствора фосфорнокислого однозамещенного калия (KH_2PO_4). Затем по каплям вносят 2N раствор едкого натрия($NaOH$) до образования помутнения (pH 9,0) и оставляют при комнатной температуре на 45 минут для осаждения образовавшихся хлопьев. Затем надосадочную жидкость отсасывают водоструйным насосом, а осадок нейтрализуют добавлением - 2N раствора HCI до pH 7,0 и центрифугируют при 3000 об/мин в течение I0 минут, после чего надосадочную жидкость удаляют, а в осадок добавляют 20 мл МПБ и распределяют по 4 мл в стерильные пробирки (8-I0 пробирок). В каждую пробирку добавляют по I мл 4-х

x) В целях снижения трудоемкости работ, экономии питательных сред, лабораторного оборудования целесообразно пользоваться всеми объемами только при первичном анализе, чтобы при последующих исследованиях ориентироваться на три объема для получения обязательно одного отрицательного ответа

часовой бульонной культуры E.coli и 4 мл расплавленного и остуженного до 45°С I,5% ~~агаре~~ МПА. Смесью заливают чашки с I,5 агаром (МПА) и инкубируют их в течение I6-I8 часов при 37°С. Затем проводят учет выросших колоний колифага, суммируют их, полученное число будет соответствовать индексу колифага.

5.2. Исследование загрязненных вод поверхностных водоемов на наличие колифага

Анализ воды поверхностных пресных и морских водоемов, индекс колифагов в которых превышает I000, проводится методом агаровых слоев. Исследуемую воду, объемом I0 мл освобождают от бактериальной флоры (см.пункт 5.I.I.). Затем делают посев по 2,5 мл пробы на 4 чашки, сверху заливая I,5% агаром. После инкубирования учитывают выросшие колонии колифага и делают пересчет на I литр исследуемой воды.

5.3. Исследование сточных вод на наличие колифага

Анализ сточных вод на наличие колифага проводят методом агаровых слоев. Исследуемую пробу объемом I0 мл освобождают от сопутствующей бактериальной флоры (см.пункт 5.I.I), затем I мл исходной пробы и I мл из десятикратных разведений исследуют методом агаровых слоев (см.пункт 5.I.I). После инкубирования чашек учитывают выросшие колонии колифага и делают перерасчет на I л исследуемой пробы.

5.4. Исследование почвы на наличие колифага

Для анализа почвы предварительно готовят почвенную суспензию. С этой целью к I0 г почвы добавляют 20 мл стандартной среды I99, содержащей 5% инактивированной нагреванием бычьей сыворотки (рН 9,0). Затем проводят обработку ультразвуком на отечественном диспергаторе УЗДН-I соответственно: для серозема 30 минут, чернозема - I0 минут, дерново-подзолистой почвы - 5 минут. Этот этап

можно заменить механической обработкой, интенсивно встряхивая почвенную суспензию 10-15 минут вручную или на аппарате для встряхивания жидкостей. Обработанную суспензию центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 минут, в надосадочной жидкости устанавливают pH 7,0, освобождают ее от сопутствующей бактериальной флоры (см.пункт 5.1.1.) и делают посев 1,0 мл исходной пробы и 1,0 мл десятикратного разведения методом агаровых слоев. После инкубирования учитывают выросшие колонии колифага и делают перерасчет на 1 г исследуемой почвы.

6. Поэтапное вирусологическое исследование объектов окружающей среды

Поэтапное вирусологическое исследование объектов окружающей среды (от отбора проб до концентрирования вирусов и их количественного учета) представлены на схемах, включающих общую схему санитарно-вирусологического исследования объектов окружающей среды и развернутые схемы исследования каждого объекта в отдельности.

Общая схема (рис. 6.1) предназначена для унификации поэтапной обработки проб из различных объектов окружающей среды при проведении санитарно-вирусологического контроля воды различной степени загрязнения, воздуха и почвы. Она позволяет планировать одномоментное проведение анализов проб из различных объектов окружающей среды.

Развернутые схемы санитарно-вирусологического контроля (рис. 6.2.-6.5.) в значительной степени облегчают проведение анализов по отдельным объектам окружающей среды, так как в них представлен полный ход исследования от отбора и концентрирования вирусов до их количественного учета в исследуемом образце и идентификации. Схемы уточняют область использования каждого метода, объем исследуемых проб, как для воды различной степени загрязнения, так воздуха закрытых помещений и почвы населенных мест.

Рис. 6.I.

ОБЩАЯ СХЕМА САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ[x])

Вид объекта	Сточная жидкость	Вода поверхностных водоемов		Почва	Воздух
I этап – отбор и обработка проб	I л	3 л		I0 г	500 л
	↓	↙	↘	Приготовление почвенной суспензии, десорбция вирусов ↘	Отбор проб приборами ПОВ-I или ПАБ-I ↘
II этап – концентрирование	Осаждение	Сорбция на искусственных сорбентах	Фильтрация через материалы ФП ↙	Полиэтиленгликоль	
III этап – антибактериальная обработка	Очистка проб от балластных белков и бактериальной флоры одним из способов (фреон II3, эфир, хлороформ) и антибиотиками				
IУ этап – вирусологическое исследование	Выделение вирусов на первичных и перевиваемых культурах ткани, куриных эмбрионах Количественный учет в $ТЦД_{50}$, БОЕ, НВЧ в пересчете на исследуемый объем				
У этап – идентификация вирусов	Идентификация выделенных вирусов в реакции нейтрализации				

x) В соответствии с документом "Методические рекомендации по санитарно-вирусологическому контролю объектов окружающей среды", М., I982.

Рис. 6.2.

СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ВИРУСОВ НА ИОНООБМЕННЫХ СМОЛАХ (АВ-I7-8, АВ-I7-ИК)

Объем исследуемой пробы – 3 л

I этап – сорбция на ионообменной смоле

коррекция pH исследуемой пробы до 5,5–6,0
фильтрация через колонку с ионообменной смолой со скоростью I0–I2 мл/мин

II этап – элюция вирусов с сорбента (одним из способов)

I0 мл бульона Хоттингера с I0% бычьей сыворотки, pH 8,2, время контакта I час при комнатной температуре при горизонтальном положении колонки или I6–

I0 мл 0,5 М раствора фосфатного буфера, pH 8,2, время контакта I час при комнатной температуре при горизонтальном положении колонки или I6–I8 час. при 4–6°

коррекция pH элюата до 7,0–7,2

III этап – антибактериальная обработка элюата (одним из способов)

I – этиловый эфир (50% к объему концентрата), антибиотики

II – фреон (три части фреона II3 с уд.весом I,36 и одна часть концентрата), антибиотики

III – хлороформ (I0% к объему концентрата), антибиотики

I000 ЕД – *Na* соль бензилпенициллина, I мг хлоркальциевый комплекс стрептомицина, I000 ЕД нистатина

IУ этап – вирусологическое исследование, количественный учет

У этап – идентификация выделенных вирусов в реакции нейтрализации

Рис. 6.3.

ХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ И СТОЧНЫХ ВОД (ПОСЛЕ ОЧИСТКИ И ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЛЯ ОСАЖДЕНИЯ ВИРУСОВ СЕРНОКИСЛОГО АЛЮМИНИЯ

Объем исследуемой пробы

Природные воды – 3 л Сточные воды – I л

I этап – концентрирование вирусов методом осаждения

нагревание пробы воды до температуры I8–20°, внесение в нее сернокислого алюминия из расчета 2 мл I0% раствора $Al_2(SO_4)_3$ на I л исследуемой пробы; коррекция pH до значений 5,4–5,8, осаждение хлопьев в течение I6 часов при 4°С; центрифугирование рыхлого осадка при 2000 об/мин в течение 20 мин, супернатант удаляют

II этап – элюция вирусных частиц

осадок ресуспендируют в 5 мл раствора Хэнкса (на I л исследуемой пробы), pH 7,4; центрифугируют I5 минут при 2000 об/мин надосадочную жидкость удаляют, осадок ресуспендируют в 4 мл раствора Хэнкса (расчет на I л исследуемой пробы, pH 7,4).

III этап – антибактериальная обработка (см. рис. 7.2.).

У этап – вирусологическое исследование, количественный учет

У этап – идентификация выделенных вирусов в реакции нейтрализации

Рис. 6.4.

СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВЫ

Объем исследуемой пробы - 10 г

I этап - десорбция вирусных частиц одним из способов

в 10 г почвы вносят 20 мл фосфатного буфера или среды 199 с 5% инактивированной бычьей сыворотки (pH 8,0-8,5), интенсивно встряхивают 10-15 мин и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин	в 10 г почвы вносят 20 мл среды 199 с 5% инактивированной бычьей сыворотки и обрабатывают на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-1 (серозем - 30 минут, черноземе - 10 минут, дерново-водзолистую - 5 минут), суспензию центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин

осадок удаляют

II этап - концентрирование

в надосадочной жидкости корректируют pH до 7,0-7,2 после чего проводят фильтрацию через материал ФП или осаждают полиэтиленгликолем

III этап - антибактериальная обработка (см.рис. 7.2.)

IV этап - вирусологическое исследование, количественный учет

V этап - идентификация выделенных вирусов

Рис. 6.5.

СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗДУХА

Объем исследуемой пробы 0,5-2 $м^3$

I этап - отбор проб

пробы отбирают при помощи приборов ПОВ-I (0,5 $м^3$) или ПАБ-I (I-2 $м^3$) в улавливающую жидкость: мясо-пептонный бульон + полиглюкин в соотношении 2:I. Общий объем - для ПОВ-I - I0 мл, для ПАБ-I - 30 мл

II этап - концентрирование вирусов

в пробирки с улавливающей жидкостью добавляют I-2 капли 5 М раствора NaCl и 3-5 мл 30%-го полиэтиленгликоля по каплям до помутнения, интенсивно в течение I0 мин встряхивают и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20-30 мин. Верхний слой (кроме 2 мм) удаляют, оставшуюся жидкость подвергают антибактериальной обработке (см.рис. 6.2.) и исследуют в культуре ткани или др.биологических моделях.

III этаж - вирусологическое исследование, количественный учет

IУ этап - идентификация выделенных вирусов

7. Заключение

Методические рекомендации предназначены для проведения систематических исследований по контролю эпидемической безопасности объектов окружающей среды в отношении вирусного загрязнения. Оценка санитарно-вирусологического состояния проводится по индикаторным микроорганизмам - колифагам - для водных объектов и почвы и по ИГКМ - для воздуха больничных помещений. Превышение указанных в методических рекомендациях уровней индикаторных микроорганизмов свидетельствует о возможном появлении ситуаций опасных в отношении возникновения вирусных кишечных или респираторных инфекций. При превышении допустимых уровней косвенных показателей необходимо проведение исследований по прямому выделению вирусов из объектов окружающей среды и сопоставление полученных результатов с комплексом данных, включающих сведения о санитарной и эпидемиологической обстановке на территории обследования.

.....

/полное наименование организации, предприятия, где

.....

заполняется карта/

Заполненная карта направляется по адресу: 119121, Москва, Погодинская ул., д.10, НИИ общей и коммунальной гигиены А.Н.Сысина АМН СССР

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Методические рекомендации по контролю и оценке качества объектов окружающей среды в отношении вирусного загрязнения

.....

.....

.....

1. Принято к внедрению в практику здравоохранения или в производство /где?. когда?/

.....

.....

.....

2. Материалы не могут быть использованы по следующим причинам / указать причины/

.....

.....

3. Ваши замечания и предложения

.....

М. П.

Подпись ответственного лица,
должность

М-57356 от 03.10.86 п. л. 1,75 Зак. № 197 Тир. 500

Типография Министерства здравоохранения СССР

gost.e-ecolog.ru