Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Санитарно-паразитологические исследования плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции

Методические указания
МУК 4.2.3016—12

Издание официальное

Москва • 2012

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Санитарно-паразитологические исследования плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции

Методические указания
МУК 4.2.3016—12

ББК 51.9
С18

С18 **Санитарно**-паразитологические исследования плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—31 с.

ISBN 978—5—7508—1129—8

1. Разработаны Институтом медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского ГБОУ ВПО Первого Московского государственного медицинского университета (МГМУ) им. И. М. Сеченова (А. И. Чернышенко, Н. А. Турбабина, Т. В. Старкова, О. П. Зеля, В. Г. Супряга, К. Ю. Кузнецова, В. Д. Завойкин, Е. А. Черникова, Е. Н. Морозов, М. Н. Лебедева, В. П. Сергиев); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Т. М. Гузеева, В. Н. Брагина); ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (Т. Г. Сыскова, Т. А. Семенова, М. М. Асланова); ФБУН Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора (Ю. И. Васерин, Т. И. Твердохлебова, Е. П. Хроменкова, Л. Л. Димидова, Е. Ю. Криворотова); Всероссийским НИИ гельминтологии им. К. И. Скрябина (А. В. Успенский, В. В. Горохов, Н. П. Сорокина); ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» (Н. И. Тимошенко, Т. Н. Цыбина, М. В. Гузеева); ФБУН «Тюменский НИИ краевой и инфекционной патологии (Т. Ф. Степанова); Курским государственным университетом (Н. С. Малышева, Н. А. Самохвалова); ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области» (М. И. Беляева); Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области (М. Ю. Соловьев, Е. В. Ковалев, Г. В. Портнова); ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» (Г. Т. Айдинов, Г. В. Стрельникова); ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Липецкой области» (Е.П.Сиротина); ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области» (Л. И. Шишкина, Е. Ю. Державина); Управлением Роспотребнадзора по Республике Адыгея (А. Х. Агиров, Л. А. Долева, Н. З. Шовгенова); ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ханты-Мансийском автономном округе» (Н. А. Остапенко, М. Г. Соловьева, И. И. Козлова, О. В. Моськина, С. В. Куклин); ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Адыгея» (С. А. Завгородний, Н. Д. Труфанов, И. В. Пипченко, А. Ю. Шураш).

2. Рекомендованы к практическому применению на бюро секции по физико-химическим методам исследования объектов окружающей среды при Проблемной комиссии «Научные основы экологии человека и гигиены окружающей среды».

3. Рекомендованы Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 22.12.2011 № 2).

4. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г. Г. Онищенко 12 мая 2012 г.

5. Введены взамен МУК 4.2.1881—04 «Санитарно-паразитологические исследования плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции».

ББК 51.9

© Роспотребнадзор, 2012
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

1. Назначение и область применения 4
2. Нормативные ссылки 4
3. Правила отбора проб для санитарно-паразитологических исследований 6
4. Условия хранения проб 7
5. Оборудование и реактивы 8
6. Подготовка проб к исследованию на наличие яиц гельминтов, личинок и цист (ооцист) кишечных патогенных простейших 10
6.1. Метод замачивания 10
6.2. Метод простых смывов 11
6.3. Метод инструментальных смывов с применением аппарата «ПробоКонГ» 12
6.4. Исследование свежеотжатых соков 12
7. Методы исследования проб на яйца и личинки гельминтов, на цисты (ооцисты) кишечных простейших 13
7.1. Метод исследования осадка с применением флотационных растворов 13
7.2. Метод исследования смывов без применения флотационных растворов 14
7.3. Метод исследования осадка с интенсивным почвенным загрязнением 15
7.4. Метод фильтрации с использованием прозрачных трековых мембран 15
7.5. Методы полимеразно-цепной реакции (ПЦР) 16
7.6. Метод иммуномагнитной сепарации (ИМС) с последующим иммунофлуоресцентным мечением на обнаружение ооцист криптоспоридий и цист лямблий 24
8. Методы исследования проб на наличие личинок гельминтов 29
8.1. Подготовка к исследованию 29
8.2. Метод Бермана 29
8.3. Метод Бермана в модификации Супряги 30
8.4. Метод Корта 31
Список литературы 31

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
12 мая 2012 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Санитарно-паразитологические исследования плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции

Методические указания МУК 4.2.3016—12

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают методы санитарно-паразитологической экспертизы плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции на соответствие установленным требованиям санитарно-эпидемиологической безопасности.

1.2. Методические указания предназначены для органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также могут быть использованы другими испытательными лабораториями, аккредитованными в установленном порядке.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон Российской Федерации от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

2.2. Федеральный закон Российской Федерации от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2.3. Федеральный закон Российской Федерации от 2.01.2000 № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».

2.4. Федеральный закон Российской Федерации от 26.12.2008 № 294-ФЗ «О защите прав юридических лиц и индивидуальных предпринимателей при осуществлении государственного контроля (надзора) и муниципального контроля».

2.5. Международные санитарные правила (2005 г.) – ВОЗ, Женева, 2006 и Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 11.05.2007 № 27 (зарегистрировано в Минюсте РФ 31.05.2007 № 9575) «О реализации Международных медико-санитарных правил (2005)».

2.6. Постановление Правительства Российской Федерации от 14.12.2009 № 1009 «О порядке совместного осуществления Министерством здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Министерством сельского хозяйства Российской Федерации функций по нормативно-правовому регулированию в сфере контроля за качеством и безопасностью пищевых продуктов и по организации такого контроля».

2.7. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 19.07.2007 № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

2.8. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 17.03.2008 № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней».

2.9. СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».

2.10. Решение Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 № 880 «О принятии технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011).

2.11. Решение Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 № 882 «О принятии технического регламента Таможенного союза «Технический регламент на соковую продукцию из фруктов и овощей» (ТР ТС 023/2011).

2.12. Федеральный закон от 27.10.2008 № 178-ФЗ «Технический регламент на соковую продукцию из фруктов и овощей».

2.13. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), утвержденные решением Комиссии Таможенного союза от 28 мая 2010 г. № 299.

2.14. СанПиН 3.2.1333—03 «Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации».

2.15. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и дополнение СП 1.3.2518—09; СП 1.3.2885—11 «Дополнения и изменения 2 к СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2.16. СП 1.1.2193—07 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно – эпидемиологических (профилактических) мероприятий». Изменения и дополнения 1 к СП 1.1.1058—03.

2.17. ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

2.18. ГОСТ 26313—84 «Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб».

2.19. МУ 3.2.1756—03 «Эпидемиологический надзор за паразитарными болезнями».

2.20. МУК 4.2.2661—10 «Методы санитарно-паразитологических исследований».

2.21. МУК 4.2.2314—08 «Методы санитарно-паразитологического анализа воды».

2.22. МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

3. Правила отбора проб для санитарно-паразитологических исследований

Правила отбора проб (образцов) плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции устанавливаются с целью санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции и определения степени ее контаминации яйцами и личинками гельминтов, а также цистами (ооцистами) кишечных простейших.

3.1. Отбор проб для лабораторных исследований производится методом случайной выборки. Объединенная проба формируется методом отбора трех точечных проб от каждой фиксированной партии однородной продукции.

3.2. Пробы свежих и свежемороженых зелени столовой, овощей, фруктов и ягод отбираются в чистые емкости (чистые полиэтиленовые пакеты или другие упаковочные материалы, разрешенные для контакта с пищевой продукцией).

3.3. Объем пробы плодов, овощей составляет по 0,5 кг с каждых 100 кг продукции.

3.4. Объем объединенной пробы столовой зелени, листовых овощей и грибов, выращенных в тепличных условиях, должен составлять не менее 0,1 кг из каждой потребительской тары.

3.5. Отбор проб ягодной продукции проводят по 0,2 кг с каждых 100 кг продукции.

3.6. Отбор проб свежеотжатых соков проводят в объеме 0,1 л.

3.7. При отборе продукции непосредственно на производстве по выращиванию продукции (теплица, поле) отбирают 0,5 кг с каждых 10 м² объекта по методу «конверта». Метод «конверта»: площадь теплицы (поля) условно делится на площадки по 10 м², определяются 5 точек отбора по углам и центру выделенных площадок, в них отбираются по одной пробе весом 0,1 кг продукции и составляется одна объединенная проба весом не более 0,5 кг выращенной продукции.

3.8. Отбор проб методом смывов допускается с плодов и бахчевых культур крупных размеров с гладкой поверхностью; проводится на месте выемки проб двумя методами: методом простых смывов; методом инструментальных смывов.

3.9. Результаты лабораторных исследований оформляются в виде протоколов исследований (испытаний).

Объемы проб плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции для проведения санитарно-паразитологических исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1

Отбор проб свежих и свежемороженых плодов, овощей, ягод и столовой зелени

Вид продукции	Объем, вес объединенной пробы для исследования
Столовая зелень Листовые овощи Грибы, выращенные в тепличных условиях	Не менее 0,1 кг из каждой потребительской тары. Отбор проб капусты, салатов допускается с поверхностных (прикорневых) листьев
Овощи, фрукты	Не менее 0,5 кг с каждых 100 кг продукции
Ягодная продукция	По 0,2 кг с каждых 100 кг продукции
Свежеотжатые соки	0,1 л
Плоды бахчевых культур крупных размеров с гладкой поверхностью	Смывы с поверхности не менее 20—25 экземпляров плодов

4. Условия хранения проб

4.1. Доставленные в лабораторию пробы овощей, фруктов, ягод и столовой зелени исследуют в день доставки, при невозможности проведения исследования пробы хранят в холодильнике при температуре 4—

5 °С в доставленной упаковке. Срок исследования зависит от объема пробы (не более 10 суток).

4.2. Образцы свежезамороженной продукции хранят при температуре морозильной камеры в соответствии с маркировкой на этикетке. Размораживание и повторное замораживание продукции в процессе хранения в лаборатории не допускается.

4.3. Пробы плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции после исследования возвращаются заказчику, либо утилизируются.

5. Оборудование и реактивы

Пробоотборник-концентратор гидробиологический (аппарат «ПробоКонГ») (или аналоги)	ТУ 4312-001-46428453—00
Отборник флотанта фильтрующий «ОФФ-25»	ТУ 4389-002-73502324—2006
Вакуумные фильтровальные установки ПВФ-142, ПВФ-35, ПВФ-47	
Приборы напорного фильтрования ПНФ, УППВ (или аналоги)	
Термоконтейнер для транспортирования свежей и свежемороженой продукции	
Лабораторные центрифуги со сменным ротором или другие марки с аналогичными параметрами, обеспечивающие 1 500—3 000 об./мин, позволяющие центрифугировать пробы в центрифужных пробирках от 10 до 250 мл	
Холодильный шкаф или холодильник бытовой, поддерживающий температуру ± (2—6) °С	
Морозильная камера, поддерживающая температуру до –18 °С	
Термометр для контроля температуры внутри холодильного шкафа, холодильника бытового, морозильной камеры	
Термостат, поддерживающий температуру 28—37 °С и обеспечивающий в камере градиент температуры ±1 °С	
Весы лабораторные механические равноплечие с наибольшим пределом взвешивания 1 000 г, с допустимой погрешностью не более 0,1 г с разновесами или электронные весы с наибольшим пределом взвешивания 200 г, с допустимой погрешностью не более 0,01 г	

Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды не ниже требований	ГОСТ 6709—72
Ареометры с пределами измерений от 1,000 до 1,400 кг/м³	
Шкаф сушильный	
Шкаф вытяжной	
Световые микроскопы, оснащенные окулярами с увеличением ×10 (дополнительно могут быть ×7, ×5), объективами ×10, ×40, ×100, окуляр-микрометр и объект-микрометр	
Шейкер S-3 (аналоги)	
Мембранные фильтры на основе ацетатов целлюлозы с размерами пор от 2,5 до 5,0 мкм, МФАС-СПА	
Прозрачные трековые мембраны АТМ на основе полиэтилентерефталата с размерами пор от 1,0 до 5,0 и более мкм	
Диаметр фильтровальных дисков 25, 35, 47, 70 и до 142 мм, в зависимости от диаметра фритты фильтродержателя используемого фильтровального оборудования	
Таз круглый с ручками объемом 32 л или эквивалентные емкости объемом 25—40 л, с диаметром дна 35—40 см и более	ГОСТ Р 50962—96
Посуда лабораторная стеклянная:	
Пробирки (многоразового или одноразового использования)	ГОСТ 25336—82
Цилиндры, вместимостью 100, 250, 500 мл или мензурки, вместимостью 250, 500, 1 000 мл	ГОСТ 1770—74
Чашки бактериологические (Петри)	ГОСТ 23932—90
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Пипетки, вместимостью 1, 2, 5, 10 мл с ценой деления 0,1 мл (многоразового или одноразового использования)	ГОСТ 29227—91
Стекла предметные	ГОСТ 9284—85
Стекла покровные	ГОСТ 6672—85
Стеклянные бюретки, диаметром 12—13 мм и высотой 35—40 см	
Флаконы стеклянные или пластиковые (одноразовые) емкостью: 5, 100, 200, 500 и 1 000 мл	

Банки (широкогорлые) объемом более 2 000 мл и
высокие кюветы для замачивания продукции и т. п.
Пинцеты, кисточки акварельные (широкие,
мягкие, полужесткие, жесткие)
Моющее жидкое средство.

Примечание: Допускается использование средств измерения иных производителей с аналогичными характеристиками, но не ниже указанных.

Реактивы

Натрий едкий (NaOH)
Натрий хлористый (NaCl)
Нитрат натрия ($NaNO_3$)
Нитрат калия ($K NO_3$)
Нитрат аммония или гранулированная аммиачная селитра (NH_4NO_3)
Хлорид цинка ($ZnCl_2$)
Сульфат цинка ($ZnSO_4$)
Тиосульфат натрия ($Na_2S_2O_3$)
Сульфат магния ($Mg SO_4$)
40 % раствор формалина
1 % и 2 % водный раствор Люголя
Иммерсионное масло.

6. Подготовка проб к исследованию на наличие яиц гельминтов, личинок и цист (ооцист) кишечных патогенных простейших

6.1. Метод замачивания

6.1.1. Объединенную пробу однородной продукции закладывают в чистые широкогорлые стеклянные банки или эмалированные, пластиковые емкости (типа кастрюль, мисок, кюветов), заполненные водой, объемом 1,5—2,0 л с таким расчетом, чтобы исследованный материал был полностью погружен в воду и замачивают на 2 ч. Для лучшего отделения микрочастиц, в т. ч. яиц гельминтов, с поверхности исследуемой продукции в воду следует добавить жидкое моющее средство из расчета 1 капля на 2 л воды, используемой для замачивания.

6.1.2. В течение указанного времени емкость периодически встряхивают вручную или на аппаратах для встряхивания (шейкерах) в течение 5—10 мин.

6.1.3. Через 2 ч исследуемые пробы обмывают щетками или кисточками в зависимости от размера образца и состояния их поверхности. Плоды и овощи с шероховатой поверхностью обмывают тщательно. Столовую зелень тщательно прополаскивают.

6.1.4. Исследуемые пробы удаляют из воды.

6.1.5. Промывную воду отстаивают 60 мин.

6.1.6. Надосадочную жидкость осторожно сливают в центрифужные пробирки и исследуют по методу исследования смывов без применения флотационных растворов.

6.1.7. Образовавшийся осадок в зависимости от объема переносят в центрифужные пробирки объемом 10 мл или 250 мл и исследуют одним из методов:

- с применением флотационных растворов;
- методом иммуномагнитной сепарации (ИМС) с последующим иммунофлуоресцентным мечением на обнаружение ооцист криптоспоридий и цист лямблий;
- методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР)*.

6.1.8. При интенсивном почвенном загрязнении проб образовавшийся осадок переносят в центрифужные пробирки объемом 250, 80, 100 мл (по объему исходного материала) и исследуют по методу исследования почвы.

6.2. Метод простых смывов

Метод простых смывов применяется для исследования крупных плодов, овощей и бахчевых культур на месте отбора проб.

6.2.1. Для каждого образца исследуемых продуктов от партии берут отдельные пробирку и кисточку, которые нумеруют соответственно записи в акте отбора проб.

6.2.2. Предварительно в лаборатории центрифужные пробирки устанавливают в штатив, наливают в каждую по 4—5 мл 2—3 % раствора пищевой соды (Na_2CO_3), или 20 % раствор глицерина, и помещают кисточку.

6.2.3. Кисточкой, смоченной в растворе соды или глицерина, многократно и с нажимом делают смывы с поверхности 10—15 экземпляров одноименного продукта с таким расчетом, чтобы общая обследуемая поверхность составляла 0,5—1,0 м^2. При этом после каждого смыва кисточку ополаскивают в одноименно пронумерованной пробирке и отжимают о край пробирки.

6.2.4. После отбора смывов кисточку тщательно ополаскивают и складывают в отдельную емкость для последующей обработки в лабораторных условиях.

6.2.5. Центрифужные пробирки со смывами закрываются плотно пробками и доставляются в лабораторию для исследования по методу исследований смывов без применения флотационных растворов.

---

* Метод разработан для качественного определения ооцист криптоспоридий в исследуемых образцах, в последующем возможно использование в методе ПЦР новых праймеров с возбудителями гельминтозов и протозоозов.

6.3. Метод инструментальных смывов с применением аппарата «ПробоКонГ»

Метод предназначен для исследования плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции от партии больших объемов (вагоны, фуры и т. п.) или продукции крупных размеров на месте отбора проб.

6.3.1. На головку насоса «ПробоКонГ» надеть защитный предфильтр, поместить его на дно чистой пластмассовой ёмкости, залить примерно 20—25 л питьевой воды, добавив 5—10 капель жидкого моющего средства.

6.3.2. Выходной и сбросовый шланги прибора направить в ёмкость, закрепив их на его стенке при помощи прищепки.

6.3.3. Включить насос прибора «ПробоКонГ» по схеме рециркуляции в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

6.3.4. По инструкции по эксплуатации прибора нанести на опорную сетку порошковый фильтр ПФГ, установить по манометру давление 0,5 атм и положить в ёмкость часть данной пробы овощей, плодов, бахчевых в таком количестве, чтобы они достаточно интенсивно омывались моющим раствором. При данном режиме работы аппарата интенсивный поток моющего раствора проходит, в основном, через сбросовый шланг и моет овощи, фрукты в течение 10 мин. Через 10 мин, не прерывая работу прибора, вынуть из ёмкости эту часть пробы и загрузить следующую часть на 10 мин.

Повторять эту операцию до тех пор, пока вся данная проба продукции не будет помыта.

6.3.5. Записать показания водосчётчика.

6.3.6. Прибор переключить в режим фильтрования, для этого по манометру нужно установить давление примерно 3 атм. В этом режиме поток моющего раствора проходит в основном через намывной фильтр ПФГ.

6.3.7. Фильтрацию проводить в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора и профильтровать (по водосчетчику) 80—100 л (примерно тройной объем залитой воды).

6.3.8. Остановить фильтрование и отобрать концентрат для лабораторного исследования по инструкции к прибору.

6.3.9. Полученный концентрат обрабатывать и анализировать по МУК 4.2.2314—08 как концентрат воды, полученный методом порошковой фильтрации (например, при помощи прибора «ПробоКонГ»).

6.4. Исследование свежеотжатых соков

6.4.1. Перед проведением исследования свежеотжатые соки, нектары, напитки разбавляются дистиллированной водой в соотношении 1 : 1.

6.4.2. Полученную смесь разливают в центрифужные пробирки объемом 10, 80, 100, 250 мл (по объему исходного материала) и далее исследуют одним из методов:

• с применением флотационных растворов;

• по методу фильтрации с использованием прозрачных трековых мембран;

• методом иммуномагнитной сепарации (ИМС) с последующим иммунофлуоресцентным мечением на обнаружение ооцист криптоспоридий и цист лямблий;

• методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР)*.

7. Методы исследования проб на яйца и личинки гельминтов, на цисты (ооцисты) кишечных простейших

7.1. Метод исследования осадка с применением флотационных растворов

Ход исследования:

7.1.1. В центрифужные пробирки с осадком проб приливают 3 % раствор щелочи (NaOH или KOH) в соотношении 1 : 2, тщательно перемешивают стеклянными палочками и оставляют на 30 мин.

7.1.2. Центрифугируют 5 мин при 1 500—2 000 об./мин и надосадочную жидкость сливают.

7.1.3. К осадку в пробирках добавляют один из флотационных растворов, указанных в табл. 2, с удельным весом 1,38—1,4, в соотношении 1 : 2 и тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

Таблица 2

Флотационные растворы

№№ п/п	Наименование реактива	Химическая формула	Кол-во вещества (г) на 1 л воды	Удельный вес, плотность раствора
1*	Азотно-кислый натрий	$NaNO_3$	700,0—1 000,0	1,38—1,4
2*	Нитрат аммония (аммиачная селитра)	NH_4NO_3	1 500	1,3
3*	Тиосульфат натрия (гипосульфит)	$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	1 750	1,4
4*	Нитрат натрия + нитрат калия (раствор Брудастова)	$NaNO_3 + KNO_3$	900,0 + 400,0	1,47—1,48 (через 2 ч снижается до 1,4)
5*	Хлорид цинка	$ZnCl_2$	2 000,0	1,82
6*	Сульфат цинка	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	400,0	1,24
7*	Сульфат магния	$MgSO_4$	920,0	1,26—1,28
* Реактивы растворяют в горячей воде				

* Метод разработан для качественного определения ооцист криптоспоридий в исследуемых образцах, в последующем возможно использование в методе ПЦР новых праймеров с возбудителями гельминтозов и протозоозов.

7.1.3.1. Приготовление флотационных растворов

А) Раствор нитрата натрия с плотностью 1,38—1,40 готовят из расчета 1 000 г соли на 1 л воды. Соль насыпают в эмалированное ведро с горячей водой порциями при постоянном помешивании до полного растворения. Раствор доводят до кипения, пока не появится на его поверхности кристаллическая пленка. Приготовленный раствор после остывания переливают в другие крупные емкости (бутыли). О насыщенности раствора судят по наличию на дне сосудов кристаллов соли или измеряют ареометром его плотность.

Б) Раствор нитрата аммония, или гранулированной аммиачной селитры, с плотностью 1,3 готовят таким же способом, что и предыдущий раствор, из расчета 1500 г соли на 1 л горячей воды.

В) Раствор Брудастова: натриевая селитра – 900 г, калиевая селитра – 400 г, вода – 1 л. После подогревания и растворения солей плотность насыщенного раствора – 1,47—1,48. Раствор следует готовить перед проведением исследований, так как через 24 ч плотность раствора падает до 1,40—1,42.

Г) Раствор тиосульфата натрия (гипосульфита натрия $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) плотностью 1,4 готовят из расчета 1 750 г вещества на 1 л воды.

Образующийся на дне сосуда осадок используют при следующем приготовлении насыщенного раствора.

7.1.4. Пробирки устанавливают в штатив, добавляют флотационный раствор до образования выпуклого мениска по краю центрифужной пробирки и накрывают покровным стеклом до соприкосновения с мениском и оставляют на 20—30 мин.

7.1.5. Поверхностную пленку снимают покровным стеклом, переносят висячую каплю на предметное стекло и микроскопируют при увеличении: окуляр ×10, ×40.

7.1.6. При исследовании на цисты кишечных простейших перед переносом висячей капли на предметное стекло наносят каплю 1 % раствора Люголя.

Примечание: Рекомендуется одновременно проводить исследование не более 4—5 пробирок, т. к. при большем количестве исследований увеличивается время экспозиции, что приведет к кристаллизации флотационного раствора и высыханию капли.

7.2. Метод исследования смывов без применения флотационных растворов

Ход исследования:

7.2.1. Пробирки со смывами проб центрифугируют при 1 500 об./мин в течение 5 мин.

7.2.2. Надосадочную жидкость удаляют.

7.2.3. Осадок переносится на предметное стекло.

7.2.4. Микроскопировать при увеличении окуляр ×10, объектив ×10, ×40.

7.2.5. При исследовании на цисты кишечных простейших в препарат вносят каплю 1 % раствора Люголя.

7.3. Метод исследования осадка с интенсивным почвенным загрязнением

Ход исследования:

7.3.1. В центрифужные пробирки с осадком приливают 3 % раствор щелочи (NaOH, KOH) в соотношении 1 : 1.

7.3.2. Содержимое пробирок тщательно размешать и отстоять в течение 20—30 мин.

7.3.3. Пробирки с осадком центрифугировать в течение 5 мин при 800 об./мин.

7.3.4. Надосадочную жидкость удалить.

7.3.5. Оставшийся осадок промыть водой 1—5 раз в зависимости от типа почвы до получения прозрачной надосадочной жидкости.

7.3.6. После промывки к осадку добавить 150 мл (45 мл в пробирки объемом 100 мл) насыщенного раствора нитрата калия (уд. вес 1,38—1,40), тщательно размешать и центрифугировать.

7.3.7. Пробирки установить в штатив, долить тем же раствором нитрата калия до образования выпуклого мениска по краю центрифужной пробирки и накрыть предметным стеклом на 20—30 мин.

7.3.8. Поверхностную пленку снимают покровным стеклом, висячую каплю переносят на предметное стекло.

7.3.9. Микроскопируют при увеличении: окуляр ×10, объектив ×10, ×40.

7.3.10. При исследовании на цисты кишечных простейших перед переносом висячей капли на предметное стекло наносят каплю 1 %-го раствора Люголя.

7.4. Метод фильтрации с использованием прозрачных трековых мембран

7.4.1. Подготовка аппарата к работе

Предварительно на устройство прибора для фильтрования ПВФ-142 крепится предфильтр в виде капроновой сетки с размерами ячейки 67—70 мкм (поставляется в комплекте с АТМ). Аналитическую трековую мембрану (АТМ) с диаметром пор 1—2,5 мкм помещают на фритту фильтродержателя прибора для фильтрования и сверху уклады-

вают фильтр с размером пор 2,5 мкм, уплотняют кольцом из эластичной резины*. Далее закрепляют крышкой и проводят фильтрацию в соответствии с инструкцией к прибору.

7.4.2. Ход исследования:

7.4.2.1. На фритту фильтродержателя вакуумного фильтровального прибора поместить прозрачный фильтр АТМ (с диаметром пор 2—5 мкм).

7.4.2.2. Закрепить воронку или диск прибора и провести фильтрацию раствора сока в соответствии с инструкцией к прибору.

7.4.2.3. После окончания фильтрования мембраны АТМ осторожно снять пинцетом с фильтродержателя и перенести на предметное стекло. На поверхность предметного стекла предварительно нанести 50 %-й раствор глицерина в виде тонкого слоя.

7.4.2.4. Сверху мембраны нанести каплю 1 %-го раствора Люголя и накрыть покровными стеклами всю поверхность мембраны.

7.4.2.5. Препарат микроскопировать при увеличениях: окуляр ×10; объектив ×10 для идентификации яиц гельминтов и объектив ×40 – для исследования на цисты лямблий.

*** Примечание:** Для плотного (без складок) прилегания АТМ к фритте рекомендуется АТМ вместе с калькой уложить мембраной на фритту и провести ладонью несколько раз по кальке. За счет появления электростатики мембрана прилипнет к фритте, а калька легко отделится от мембраны.

7.5. Методы полимеразно-цепной реакции (ПЦР)

Все представленные методы являются качественными для определения ооцист криптоспоридий и состоят из следующих этапов: выделение ДНК, амплификация целевой ДНК с соответствующими праймерами, электрофорез продуктов амплификации в агарозном геле, документирование и анализ результатов.

Исследования могут быть выполнены на стандартном оборудовании с использованием стандартного набора реагентов в любой ПЦР-лаборатории.

7.5.1. Аппаратура, оборудование

Амплификатор типа «Терцик МС-2» со скоростью нагрева/охлаждения активного элемента не менее 1,5 °С/с.
Прибор для горизонтального электрофореза типа «Sub Cell GT System» с комплектом кювет и гребенок
Источник напряжения типа «Power Pac 300» с диапазоном регулируемого напряжения 50—300 В

Видеосистема типа «Gel Doc 2000^{TM}», предназначенная для ввода в компьютер, анализа и документирования изображений люминесцирующих следов ДНК в гелях, окрашенных бромистым этидием: диапазон излучения 300—400 нм, чувствительность – не менее 10 нг ДНК (по бромистому этидию)	
Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 26678
Камера морозильная, обеспечивающая температуру минус 20 °С	
Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф (частота вращения не менее 13 000 мин$^{-1}$)	
Термостат типа «TERMO 24-15» под пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 мл, диапазон температур от 15 до 120 °С, количество гнезд – не менее 20 каждого типа, точность поддержания температуры – 0,2 °С, разность температур между соседними ячейками – не более 0,5 °С	
Аппарат для встряхивания типа «Вортекс», скорость вращения 250—3 000 мин$^{-1}$	
Печь микроволновая (мощностью не менее 400 W)	
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH = 0,01	ГОСТ 19881—74
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные.	ГОСТ 19569—89Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды по ГОСТ 6709—72	
Гомогенизатор перистальтического типа «Стомайкер» или других моделей	
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или других видов	ТУ 16-535—84
Фотопленка «Микрат Изопан»	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Дозаторы с переменным объемом дозирования: 0,2—2,0 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью 1,2 %; 0,5—10,0 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью 0,8 %; 2—20 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью 0,8 %;	

20—200 мкл с шагом 0,1 мкл, с точностью 0,6 %;
100—1000 мкл с шагом 1 мкл, с точностью 3 %;
2—10 мл с шагом 0,1 мл, с точностью 0,5 %.

Примечание: Допускается использование другой аппаратуры и инструментов с аналогичными техническими характеристиками, но не хуже указанных.

7.5.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Мембраны Millipore 0,4 мкм	
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические, вместимостью 25, 50, 100, 200, 1 000 мл	ГОСТ 12738—77
Цилиндры стеклянные мерные лабораторные, вместимостью 25, 100, 1 000 мл	ГОСТ 1770—74
Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф, вместимостью 0,2; 0,5; 1,5 мл	
Наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования до: 10; 20; 200; 1 000 $мм^3$; 10 $см^3$	
Набор Diatom DNA Prep 100/200	

Примечание: Допускается использование другой лабораторной посуды и материалов с аналогичными техническими характеристиками.

7.5.3. Реактивы

Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Кислота борная, хч	ГОСТ 9656—75
Натрия гидроокись, чда	ГОСТ 4328—77
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), хч	ТУ 6-09-11-1721—83
Гексадецилтриметиламмоний бромид (СТАВ) Корпорация «Сигма Олдрич» (Sigma) кат. № Н 5882	
Трис (оксиметил) аминометан, хч	ТУ 6-09-4292—76
Альбумин бычий сывороточный сухой (БСА) «Сигма Олдрич» (Sigma) кат. № В 4287	
Этидий бромистый, хч	ТУ 6-09-13-452—75
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ Р 51652—00
Спирт изопропиловый, хч	ТУ 6-09-402—85
Масло вазелиновое медицинское	ГОСТ 3164—78
Хлороформ, хч	ГОСТ 20015—88
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Вода деионизированная	ОСТ 11.029.003—80

2-Меркаптоэтанол, хч ТУ 6-09-08-1024—81
Термостабильный фермент Taq-полимераза, оптимум работы в области 70—72 °С. «Сигма Олдрич» (Sigma) кат. № Д 1806
Буфер для ПЦР с $MgCl_2$. «Сигма Олдрич» (Sigma) кат. № Р 2192
Агароза для электрофореза (тип II). «Сигма Олдрич» (Sigma) кат. № А 6877
Маркер молекулярной массы ДНК. «Сигма Олдрич» (Sigma) кат. № Р 1473
Сорбент NucleoS™
Экстра Гена ™
Праймеры: Прямой праймер -5'–CCG AGT TTG ATC CAA AAA GTT ACG AA–3'; Обратный праймер -5'–CGT TAA CGG AAT TAA CCA GAC – 3'

Примечание: Допускается использование других реактивов с аналогичными техническими характеристиками, имеющих международный сертификат качества ИСО 9 000 или EN 29 000.

7.5.4. Подготовка к анализу

Приготовление растворов

7.5.4.1. Приготовление 1 М ТРИС – HCl (pH 7,5).

В мерной колбе на 100 мл растворить 12,11 г Трис (оксиметил) аминометана (молекулярная масса 121) в 80 мл дистиллированной воды, довести pH концентрированной соляной кислотой до 7,5, затем довести объем раствора до метки деионизованной водой, перемешать, хранить при температуре – 20 °С не более года.

7.5.4.2. Приготовление 5 М NaCl.

Растворить 29,22 г натрия хлористого (молекулярная масса 58,5) в 100 мл дистиллированной воды, перемешать, хранить в колбе с притертой пробкой при комнатной температуре до 1 года.

7.5.4.3. Приготовление 30 % NaOH.

Растворить 3 г натрия гидроокиси (молекулярная масса 40) в 7 мл дистиллированной воды.

7.5.4.4. Приготовление 0,5М ЭДТА (pH 8,0).

В мерной колбе на 100 мл растворить 18,62 г этилендиаминтетрауксусной кислоты (молекулярная масса 372,2) в 80 мл дистиллированной воды. 30 %-м раствором натрия гидроокиси довести pH раствора до 8,0, дистиллированной водой – объем раствора до метки, перемешать. Хранить в колбе с притертой пробкой при комнатной температуре до 1 года.

Приготовленные растворы автоклавировать при 1 атм., 121 °С 15—20 мин или фильтровать через мембраны Millipore 0,4 мкм.

7.5.4.5. Приготовление хлороформа, насыщенного водой.

Смешать 100 мл хлороформа с 20 мл деионизированной воды и оставить на 24 ч для насыщения. Срок хранения при температуре от 4 до 5 °С – не более 6 мес.

7.5.4.6. Приготовление 70 %-го раствора этилового ректификованного спирта.

Смешать 70 мл 96 % этилового спирта с 26 мл деионизированной воды. Срок хранения при температуре от 4 до 5 °С – не более 2 мес.

7.5.4.7. Приготовление раствора БСА (20 мкг/мл).

Растворить 0,002 г сухого альбумина бычьего сывороточного в 1 мл деионизированной воды, 10 мкл полученного раствора смешать с 990 мкл деионизированной воды.

Срок хранения в морозильной камере при температуре минус 20 °С – не более 6 месяцев.

7.5.4.8. Приготовление лизирующего буфера (2 % раствора «СТАВ»).

• Растворить 0,5 г гексадецилтриметиламмония бромида в 10 мл деионизированной воды (при плохом растворении подогреть на водяной бане), добавить 2,5 мл 1М Трис – HCl, 7 мл 5 М NaCl, 1 мл 0,5 М ЭДТА, довести объем раствора деионизированной водой до 25 мл, перемешать. Срок хранения при температуре от 4 до 5 °С – не более 6 месяцев, допустимо образование осадка.

• Перед использованием раствор выдерживают при комнатной температуре или подогревают в термостате при температуре 65 °С до полного растворения осадка.

• Непосредственно перед использованием в приготовленный лизирующий буфер вносят меркаптоэтанол из расчета 4 $мм^3$ на 1 $см^3$ лизирующего буфера и перемешивают.

7.5.4.9. При проведении электрофореза использовать один из ниже перечисленных буферов:

А) Приготовление 1х ТВЕ буфера для электрофореза.

В мерной колбе на 1 000 мл растворить 10,8 мг Трис (оксиметил) аминометана, 5,5 г борной кислоты и 0,92 г этилендиаминтетрауксусной кислоты, довести дистиллированной водой до метки, перемещать до полного растворения.

Срок хранения однократного раствора (1х) – 10 дней, обычно готовят десятикратный (10х) и перед употреблением разбавляют до однократного (1х), используют максимум три раза.

Б) Приготовление 1х ТАЕ буфера для электрофореза.

В мерную колбу вместимостью 1 000 мл внести 242 г Трис-основания, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты, 10 мл 0,5 М ЭДТА, долить

деионизованной водой до метки. Полученный 50х раствор перед употреблением развести в 50 раз.

Использовать для проведения электрофореза не более двух раз.

В) Приготовление раствора бромистого этидия – $C_{21}H_{20}N_3Br$ (10 мг/мл).

Растворить 1 г бромистого этидия в 100 мл дистиллированной воды.

Срок хранения в посуде темного стекла (обязательно при температуре от 4 до 5 °С) – не более 12 месяцев.

Г) Приготовление 2 % раствора агарозного геля

При температуре 70—90 °С растворить 2,0 г агарозы в 98 мл (1х буфере) для электрофореза.

Допускается хранение готового геля в 1х буфере для электрофореза в холодильнике при температуре от 4 до 5 °С – не более 2 суток.

Проведение анализа

7.5.5. Выделение ДНК

Метод выделения ДНК с помощью набора Diatom DNA Prep 100/200

Приготовление рабочего раствора солевого буфера

7.5.5.1. Содержимое флакона с 10-кратным солевым буфером, 10 мл, перенести в мерный цилиндр, довести бидистиллированной водой до метки 100 мл, и 96 %-м этиловым спиртом до метки 300 мл и перемешать. Готовый рабочий раствор солевого буфера хранить в герметично закрытой посуде при температуре 4 °С.

7.5.5.2. В пробирку объемом 1,5 мл внести 100 мкл исследуемой пробы, добавить 400 мкл лизирующего реагента и перемешать содержимое пробирки переворачиванием (5—10 раз). Интенсивное встряхивание смеси не рекомендуется.

7.5.5.3. Термостатировать пробирку со смесью 5—7 мин при температуре 65 °С. Если выделение ДНК проводится из твердого сухого мелкоизмельченного материала, то следует термостатировать 30—40 мин.

7.5.5.4. После термостатирования центрифугировать пробирку со смесью 10 с при 5 000 об./мин в том случае, если смесь содержит несолюбилизированный клеточный дебрис или другой нерастворимый осадок. Прозрачный супернатант целиком перенести в чистую пробирку.

7.5.5.5. В пробирку с чистой смесью добавить 20 мкл суспензии сорбента NucleoS™ (перед использованием NucleoS™ следует интенсивно встряхнуть на вортексе).

7.5.5.6. Пробирку перемешивать 10 мин (10—20 об./мин).

7.5.5.7. Центрифугировать 10 с при 5 000 об./мин.

7.5.5.8. Осторожно, не задевая осадка, удалить супернатант.

7.5.5.9. К осадку добавить 200 мкл лизирующего реагента, тщательно перемешать на вортексе до гомогенного состояния.

Примечание: Если суспендирование затруднено (при большой нагрузке ДНК из-за сильного слипания сорбента), то осадок необходимо вначале осторожно перемешать пипетированием, а затем перемешать на вортексе.

7.5.5.10. Добавить в пробирку 1 мл рабочего раствора солевого буфера.

7.5.5.11. Перемешать содержимое пробирки переворачиванием пробирки 5—10 раз.

7.5.5.12. Центрифугировать 10—20 с при 2 000 об./мин.

7.5.5.13. Осторожно, не задевая осадка, удалить супернатант.

7.5.5.14. Добавить в пробирку 1 мл солевого буфера, перемешать содержимое пробирки на вортексе, центрифугировать 10 с при 5 000 об./мин и осторожно удалить супернатант с помощью насоса.

7.5.5.15. Повторить положение 7.5.5.14.

7.5.5.16. Посушить осадок при температуре 65 °С в течение 4—5 мин.

7.5.5.17. В эту же пробирку внести 50—100 мкл Экстра Гена™ (100 мкл, если выделение ДНК проводится из 200 мл цельной крови или другой богатой ДНК пробы).

Внимание! Экстра Ген™ следует отбирать от общего объема при постоянном перемешивании!

7.5.5.18. Суспендировать содержимое пробирки на вортексе 5—10 с до получения гомогенной суспензии, затем термостатировать 4—5 мин при 65 °С.

7.5.5.19. Еще раз суспендировать содержимое пробирки на вортексе перед центрифугированием.

7.5.5.20. Центрифугировать 1 мин при 10 000 об./мин.

7.5.5.21. Перенести супернатант с ДНК в чистую пробирку. ДНК хранить при температуре – 20 °С.

7.5.6. Амплификация

7.5.6.1. Общие требования к постановке идентификационной ПЦР.

При проведении идентификации обязательно готовят следующие пробы:

А) ДНК-матрица положительного контроля с праймерами к соответствующим возбудителям.

Б) ДНК-матрица отрицательного контроля с праймерами к соответствующим возбудителям.

В) ДНК-матрица отрицательного контроля с теми же праймерами.

Г) Исследуемые образцы ДНК паразитов с праймерами.

7.5.6.2. Метод идентификации ДНК.

Праймеры для идентификации C.parvum:

Прямой праймер 5'-CCG AGT TTG ATC CAA AAA GTT ACG AA-3'

Обратный праймер 5'– CGT TAA CGG AAT TAA CCA GAC – 3'

А) В пробирку типа Эппендорф вносятся на холоде следующие реактивы:

реакционная смесь для проведения полимеразной цепной реакции, рассчитанная на 10 проб, представлена в табл. 3.

Таблица 3

№ пп	Реактивы	Объем реакционной смеси 30 мкл	Объем реакционной смеси 50 мкл
1	Деионизированная вода	190 мкл	322 мкл
2	Буфер для полимеразной цепной реакции с $MgCl_2$ (10х)	30 мкл	50 мкл
3	Смесь нуклеотидов	30 мкл	50 мкл
4	Праймер 1 (5 пМ/мкл)	20 мкл	30 мкл
5	Праймер 2 (5 пМ/мкл)	20 мкл	30 мкл
6	Taq-полимераза (5 ед./мкл)	10 мкл	18 мкл

Примечание: Реакционную смесь готовят на необходимое количество проб, но не меньше чем на 5.

Б) Подготовка к проведению амплификации:

- реакционную смесь разлить в каждую пробирку для проведения ПЦР по 18 мкл;
- в каждую пробирку с 18 мкл добавить 2 мкл раствора ДНК;
- смесь перемешать, центрифугировать (30 с при 3 000 об./мин);
- при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

Условия амплификации *C.parvum* представлены в табл. 4 .

Таблица 4

Стадия	Начальная денатурация	Денатурация	Отжиг праймеров	Удлинение	Конечное удлинение	Количество циклов амплификации
Режим	95 °С – 5 мин	95 °С – 1 мин	45 °С – 2 мин	72 °С – 3 мин	72 °С – 4 мин	35

В) После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле

7.5.7. Проведение электрофореза в агарозном геле

7.5.7.1. Приготовление агарозного геля:

А) Для приготовления 2 %-й агарозы необходимо к 1 г агарозы добавить 50 мл 1х буфера ТВЕ и тщательно перемешать.

Б) Полученный раствор поместить в микроволновую печь (на 2—5 мин в зависимости от мощности печи – следить за интенсивностью кипения суспензии!) или прокипятить на водяной бане 15 мин до полного растворения агарозы.

В) Расплавленную агарозу охладить до 56 °С и добавить 5 мкл бромистого этидия (концентрация 10 мг/мл), тщательно перемешать.

Г) Расплавленную агарозу с бромистым этидием разлить в подготовленную форму. Толщина геля 0,5—0,7 см.

Д) Через 30—40 мин удалить гребенку. Готовый гель можно использовать сразу, можно хранить в 1х буфере в холодильнике при 4 °С.

7.5.7.2. Проведение электрофореза.

А) Смешать в отдельной пробирке 2 мкл буфера для нанесения и 10 мкл смеси. Внести смесь в лунки геля (можно использовать соотношение буфер/реакционная смесь – 2/8). В одну из лунок (чаще в крайнюю) внести маркер молекулярной массы (можно 1 000 b.p.).

Б) Поместить заполненный гель в камеру для электрофореза, заполненную буфером 1х ТБЕ. Толщина слоя буфера над поверхностью геля примерно 2—3 мм.

В) В режиме постоянного напряжения 100 V электрофорез длится примерно 70—90 мин.

Г) Гель (без формы) поместить на фильтр трансиллюминатора и посмотреть в проходящем ультрафиолетовом свете.

7.5.8. Оформление результатов

Документировать результат электрофореза – либо на фотопленку «Микрат Изопан» (изопанхроматическая фотопленка чувствительностью 3 ед. ГОСТ, фотографическая широта 10, разрешение – 300 линий/мм), либо при помощи гельдокументирующей системы на основе цифрового фотоаппарата или видеокамеры. Фотокопия геля должна быть приложена к отчету по идентификации (при цифровой съемке – распечатывается на принтере с разрешением не менее 300 dpi).

При оценке результата ПЦР ожидаемый размер продукта (относительно маркера) для *C. parvum* – 451в.р.

7.6. Метод иммуномагнитной сепарации (ИМС) с последующим иммунофлуоресцентным мечением на обнаружение ооцист криптоспоридий и цист лямблий

7.6.1. Материал, оборудование и реактивы

Магнитный штатив
Автоматические пипетки на 1—10 мкл, 20—200 мкл и 100—1 000 мкл

Наконечники для автоматических пипеток
Градуированная пипетка на 10 мл
Лабораторный вортекс
Лабораторный ротатор
Пробирки для иммуномагнитной сепарации (ИМС-пробирки или плоскостенные пробирки)
Пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл
Штатив для ИМС-пробирок
Штатив для пробирок типа Эппендорф
Флюоресцентный микроскоп с набором необходимых фильтров и принадлежностей в рекомендованной комплектации
Слайды SuperStick™ : S100-1 (одно окно), S100-2 (два окна), S100-3 (три окна)
Пастеровские пипетки
Буфер для иммуномагнитной сепарации Grab™ Buffer A (1), 2-концентрированный. Иммуномагнитная суспензия Giardia-Grab™ IMS Beads (2), специфичная к цистам лямблий. Иммуномагнитная суспензия Crypto-Grab™ IMS Beads (3), специфичная к ооцистам криптоспоридий
Моющий буфер Grab™ Buffer B (4)
Таблетированный фосфатный буфер PBS (6)
DAPI концентрированный раствор (7), 2 мг/мл DAPI в метаноле
Моющий буфер SureRinse™ (8)
Иммунореагент Aqua-Glo™G/C (9) в рабочем разведении
Положительный контроль (10)
Контрастирующий краситель (11), C101
Защитная среда (12) No-Fade™, M101 или Elvanol No-Fade™, M102
Метанол
0,1 Н раствор соляной кислоты
1 Н раствор NaOH

Примечание: Допускается использование материалов, оборудования и реактивов иных производителей с аналогичными характеристиками, но не ниже указанных.

7.6.2. Подготовка проб к исследованию

После фильтрации смыва с овощей осадок с фильтров смывают в 10 мл дистиллированной воды, переливают в центрифужную пробирку и

центрифугируют 10 мин при 1 500 об./мин. Удаляют надосадочную жидкость и осадок исследуют. При этом осадок должен быть не более 1 мл. Если получился большой объем осадка, его необходимо ресуспендировать дистиллированной водой.

В одной ИМС-пробирке обрабатывается не более 0,5 мл концентрата пробы, ресуспендированного в 3 мл дистиллированной воды. Больший объем осадка необходимо перемешать с дистиллированной водой, разделить на части, в каждой из которых должно содержаться не более 0,5 мл исходного осадка, и далее обрабатывать как две и более пробы.

Примечание: диагностические наборы с иммунореагентами и буферными растворами перед использованием выдержать в течение одного часа при комнатной температуре.

7.6.3. Иммунохимическое связывание, магнитная сепарация и промывка

7.6.3.1. С помощью градуированной пипетки на 10 мл, предварительно омытой дистиллированной водой, перенести в пробирку для иммуномагнитной сепарации (ИМС-пробирку или плоскостенную пробирку) исследуемый концентрат, ресуспендированный в 3 мл дистиллированной воды. Омыть пробирку, в которой находился концентрат, двумя порциями дистиллированной воды по 1 мл, оба смыва перенести в пробирку для иммуномагнитной сепарации. Общий объём раствора в пробирке для ИМС составит 5 мл.

7.6.3.2. Внести в пробирку для ИМС 5 мл 2-концентрированного буфера Grab™ Buffer A(1). Плотно закрыть крышку пробирки и перемешать раствор, переворачивая пробирку 3 раза. По выполнении всех процедур переноса пробы общий объем раствора в ИМС-пробирке составляет 10 мл.

7.6.3.3. Перемешать иммуномагнитную суспензию Giardia-Grab™ IMS Beads (2) на вортексе в течение 20 с, отобрать 100 мкл суспензии и перенести ее в ИМС-пробирку, в которой уже находится проба. Перемешать иммуномагнитную суспензию Crypto-Grab™ IMS Beads (3) на вортексе в течение 20 с, отобрать 100 мкл суспензии и перенести ее в пробирку для ИМС, в которой уже находится проба. Закрепить пробирку для ИМС в штативе лабораторного ротатора перпендикулярно к оси вращения. Перемешивать в течение одного часа при скорости 18 об./мин при комнатной температуре.

7.6.3.4. Извлечь ИМС-пробирку из ротатора. Поместить ее в магнитный штатив плоской стороной к магниту. Бережно покачивать штатив с пробиркой вручную в течение 3 мин, поворачивая ее на 90 градусов от себя/на себя, при этом плоская сторона пробирки должна находиться снизу.

7.6.3.5. Остановив покачивание в вертикальном положении пробирки и не вынимая ее из магнитного штатива, осторожно вылить надосадочную жидкость из пробирки. Не вынимая ИМС-пробирку из штатива и не касаясь магнитного осадка на стенке, отобрать остатки жидкости со дна пробирки с помощью пастеровской пипетки.

7.6.3.6. Извлечь пробирку из штатива, добавить в пробирку 0,48 мл. буфера Grab™ Buffer B (4). Поворачивая пробирку, осторожно смыть суспензию с плоской стенки. С помощью пастеровской пипетки омыть плоскую стенку пробирки.

7.6.3.7. С помощью пастеровской пипетки перенести 0,48 мл суспензии в пробирку типа Эппендорф на 1,5 мл. Дважды омыть плоскую стенку ИМС-пробирки 0,48 мл буфера Grab™ Buffer B, осторожно поворачивая пробирку и используя ту же пастеровскую пипетку. Последовательно перенести оба смыва в пробирку типа Эппендорф на 1,5 мл с помощью одной пастеровской пипетки, при этом избегать образования пузырей. Подождать примерно 15 с и перенести остатки жидкости из ИМС-пробирки в ту же пробирку типа Эппендорф.

7.6.3.8. Закрыть крышку пробирки типа Эппендорф и поместить её в магнитный штатив. Бережно покачивать штатив с пробиркой вручную в течение 1-й минуты, поворачивая ее на 180 градусов от себя/на себя, при этом пробирка должна находиться сверху.

7.6.3.9. Не вынимая пробирку типа Эппендорф из магнитного штатива и не касаясь суспензии на стенке пробирки, с помощью пастеровской пипетки осторожно отобрать всю жидкость из пробирки

7.6.4. Диссоциация

7.6.4.1. Извлечь пробирку типа Эппендорф из магнитного штатива, добавить в пробирку 50 мкл 0,1 Н раствора соляной кислоты. Перемешать суспензию на вортексе в течение 50 с.

7.6.4.2. Инкубировать пробирку в течение 10 мин при комнатной температуре.

7.6.4.3. Перемешать суспензию в микроцентрифужной пробирке на вортексе в течение 30 с.

7.6.4.4. Установить пробирку в магнитный штатив. Через 30 секунд осторожно, не касаясь осадка на стенке пробирки, с помощью автоматической пипетки отобрать 50 мкл супернатанта и перенести его в окно слайда SuperStick™ (5), в котором находится 6 мкл 1,0 Н раствора NaOH.

7.6.4.5. Повторить процедуры диссоциации по пп. 7.6.4.1—7.6.4.4. Обе порции исследуемого раствора можно внести в одно и то же или в два окна слайда SuperStick™ для последующего иммунофлюоресцентного мечения. Внести в окно слайда положительный контроль, предварительно ресуспендированный с помощью вортекса за 20 с.

7.6.4.6. Подсушить слайд SuperStick™ в потоке тёплого (не горячего!) воздуха или с помощью устройства для сушки слайдов (примерно 15—30 мин).

7.6.5. Подготовка к иммунофлуоресцентному мечению

7.6.5.1. Растворить 1 таблетку таблетированного фосфатного буфера (6) в 100 мл дистиллированной воды.

7.6.5.2. Приготовить рабочий раствор DAPI: развести 1 мкл 5 000х-концентрированного раствора (7) из комплекта поставки в 5 мл готового фосфатного (PBS) буфера. Рабочий раствор DAPI необходимо готовить в день выполнения исследования. Использовать только свежеприготовленный рабочий раствор DAPI. Избегать воздействия прямого солнечного света.

Примечание: *для фиксации цист и ооцист на слайде внести в каждое окно слайда по 45 мкл абсолютного метанола и высушить (примерно 30 мин). После фиксации метанолом интенсивность флуоресценции DAPI возрастает.*

7.6.6. Флуоресцентное и иммунофлуоресцентное мечение

7.6.6.1. Убедиться в завершении сушки слайда. Внести в окна слайда 50 мкл рабочего раствора DAPI. Инкубировать при комнатной температуре приблизительно 1 мин. Внести в окна слайда 50—100 мкл моющего буфера SureRinse™ (8), подождать 1 мин. Осторожно наклонить слайд (узким краем вниз) и с помощью фильтровальной бумаги удалить моющий буфер. Не касаться поверхности окна.

7.6.6.2. Внести одну каплю (ок. 45 мкл) иммунореагента Aqua-Glo™G/C (9) в окна слайда. При необходимости, с помощью аппликатора или стеклянной палочки распределить реагент по лунке. Не касаться поверхности окна!

7.6.6.3. Поместить препараты в ячейку влажности и инкубировать не менее 25 мин при 37 °С или не менее 40 мин при комнатной температуре. Допускается более длительное время инкубации.

7.6.6.4. Внести в окна слайда 50—100 мкл моющего буфера SureRinse™ (8), подождать 1 мин. Осторожно наклонить слайд (узким краем вниз) и с помощью фильтровальной бумаги удалить моющий буфер. Не касаться поверхности окна!

Примечание: *чтобы снизить неспецифическую флюоресценцию и выделить контрастный фон для лучшего наблюдения зеленой флюоресценции цист и ооцист, используется следующая процедура: нанести по одной капле контрастирующего красителя (11) в каждую лунку, инкубировать 1 мин при комнатной температуре. Внести в окна слайда 50—100 мкл моющего буфера SureRinse™ (8), подождать 1 мин. Осторожно наклонить слайд (узким краем вниз) и с помощью фильтровальной бумаги удалить моющий буфер. Не касаться поверхности окна!*

7.6.6.5. Разложить препараты на наклонном штативе для слайдов, подсушить в токе теплого воздуха.

7.6.6.6. Нанести 1 каплю защитной среды (12) No-Fade™ в каждую лунку. Нанести покровное стекло. Заклеить бесцветным лаком.

Примечание: Меченные препараты должны храниться в темноте при температуре (5 ± 3) °С. Не допускать замораживания! Меченные препараты, защищённые средой No-Fade™, могут храниться при температуре (5 ± 3) °С в течение по крайней мере 6 месяцев.

7.6.7. Люминесцентная микроскопия

Исследуют препараты не менее чем при 200-кратном общем увеличении на наличие яблочно-зеленой флюоресценции, микроскопируя все поля зрения лунки слайда. При использовании каждой новой партии реагентов и перед началом микроскопии препаратов исследуемых проб следует предварительно просмотреть препарат положительного контроля, для чего используется контрольная суспензия с точно подсчитанными цистами лямблий и ооцистами криптоспоридий прилагаемая в диагностическом наборе.

Результат

– цисты лямблий – светящиеся и флюоресцирующие яблочно-зеленым светом объекты, от овальных до сферических (от 8 до 14 мкм в диаметре), с ярко подсвеченными краями;

– ооцисты криптоспоридий – сверкающие и флюоресцирующие яблочно-зеленым светом объекты, от овальных до сферических (от 3 до 6 мкм в диаметре), с ярко подсвеченными краями.

8. Методы исследования проб на наличие личинок гельминтов

8.1. Подготовка к исследованию

Столовую зелень, листовые овощи (другую растительную продукцию) по методу замачивания готовят к исследованию. Полученные смывные воды исследуются на наличие личинок нематод (стронгилид, анкилостомид) по методу Бермана или по методу Бермана в модификации Супряги.

8.2. Метод Бермана

8.2.1. Необходимое оборудование

Штатив
Стеклянная воронка (диаметром 10 см)
Металлическое сито или сетка «мельничный газ»

Резиновая трубка с зажимом
Предметные стекла
Стеклянные или деревянные палочки
Чашки Петри
Центрифуга
Микроскоп

8.2.2. Подготовка аппарата Бермана к работе

Собрать аппарат Бермана, для чего закрепить в штативе стеклянную воронку с металлическим ситом. На нижний конец воронки надеть резиновую трубку с зажимом.

8.2.3. Ход исследования

8.2.3.1. Пробу осадка объемом 20—50 г поместить на металлическое сито или мелкоячеистую металлическую сетку, или сетку «мельничный газ».

8.2.3.2. Сетку с пробой осадка приподнять и в воронку налить воду таким образом, чтобы нижняя часть сетки с калом была погружена в воду.

8.2.3.3. Через 24 ч зажим на резиновой трубке быстро открыть и жидкость спустить в центрифужную пробирку.

8.2.3.4. Полученную жидкость центрифугировать 1—2 мин.

8.2.3.5. Надосадочную жидкость быстро слить.

8.2.3.6. Осадок нанести на предметное стекло или в чашку Петри.

8.2.3.7. Можно спустить жидкость в чашку Петри и исследовать без центрифугирования с использованием МБС. При обнаружении личинок для их обездвиживания внести одну каплю 2 % раствора Люголя, личинку перенести на предметное стекло и прикрыть покровным.

8.2.3.8. Микроскопировать при увеличении: объектив ×8 или ×10, окуляр ×7 или ×10, уточнение морфологического строения при увеличении: объектив ×40, окуляр ×10.

8.3. Метод Бермана в модификации Супряги

8.3.1. Необходимые реактивы и оборудование

Дистиллированная вода
Химические стаканчики
Стеклянные палочки
Чашки Петри
Пробирки центрифужные
Стереоскопический микроскоп МБС

8.3.2. Ход исследования

8.3.2.1. В химический стаканчик положить пробу осадка объемом 10—15 г.

8.3.2.2. Залить теплой (40 °С) дистиллированной водой, чтобы проба осадка была полностью покрыта.

8.3.2.3. Через 20—30 мин слить жидкость в центрифужные пробирки.

8.3.2.4. Отстаивают 10—15 мин или центрифугируют 1 мин при 1 500 об./мин.

8.3.2.5. Слить осторожно надосадочную жидкость, осадок поместить в чашку Петри.

8.3.2.6. Исследовать осадок в чашке Петри под бинокулярным стереоскопическим микроскопом МБС (с нижней подсветкой), объектив ×2, окуляр ×12, ×14; обращая внимание на подвижных, слабоподвижных и неподвижных личинок.

8.3.2.7. Неподвижные личинки микроскопируют при увеличении: объектив ×8, ×10 и ×40; окуляр ×10.

8.4. Метод Корта

Применяется для идентификации личинок паразитических нематод от свободноживущих.

Принцип метода Корта заключается в воздействии на личинок нематод формалином. При этом личинки свободноживущих нематод погибают быстрее, чем паразитические.

8.4.1. Ход исследования

8.4.1.1. Жидкость с личинками поместить в чашку Петри или на часовое стекло.

8.4.1.2. Добавить 40 %-й раствор формалина к жидкости с личинками нематод в соотношении 1 : 5.

8.4.1.3. Микроскопировать с увеличением (объектив ×8, ×10 и ×40; окуляр ×10) через 5—8 мин.

8.4.2. Результат: личинки свободноживущих нематод гибнут, а паразитические остаются живыми в течение 15—20 мин, но подвижность их замедляется.

Примечание: При добавлении формалина в соотношении 1 : 25 к жидкости с личинками свободноживущие гибнут через 12 мин, а паразитические личинки остаются подвижными.

Список литературы

1. Романенко Н. А., Падченко И. К., Чебышев Н. В. Санитарная паразитология. М.: Медицина, 2000, 319 с.

2. Державина Т. Ю., Гузеева Т. М. Сб. «Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период». Тюмень, 2008, С. 70—72.

Санитарно-паразитологические исследования плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции

Методические указания
МУК 4.2.3016—12

Редактор Н. В. Кожока
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 9.11.12

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,0

Тираж 200 экз. Заказ 65

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru