



Совместный проект
ККП и ЗАО «РОСА»

Главная тема: Профессионалы — о качестве контроля

Читайте и узнаете:

- какими методами определяется наличие одноклеточных паразитов в воде;
- как будет регламентироваться определение в воде ооцист криптоспоридий и цист лямблий после введения в действие ТР ЕАЭС 044/2017

Ключевые слова:

иммуномагнитная сепарация, специфическое мечение моноклональными антителами, флуоресцентная микроскопия, иммунофлуоресцентные диагностикумы, оптика дифференциально-интерференционного контраста, ооцисты криптоспоридий, цисты лямблий

Исследования санитарно-паразитологических показателей воды

С.Н. Власова

начальник сектора паразитологии и гидробиологии ЗАО «РОСА»

В.Н. Закатов

паразитолог ЗАО «РОСА»

В.Е. Ларин

начальник отдела биологических методов анализа ЗАО «РОСА», канд. биол. наук

Описаны зарубежные методики санитарно-паразитологических исследований воды и их трансформация в России. Дана характеристика нормативных документов, регламентирующих паразитологический контроль качества воды, оценена возможность использования новейших методических достижений в этой области

С 01.01.2019 г. вступит в силу технический регламент ТР ЕАЭС 044/2017¹, в соответствии с которым определение ооцист криптоспоридий и цист лямблий будет регламентировать ГОСТ ISO 15553–2017².

¹ Технический регламент ЕАЭС 044/2017 «О безопасности упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду» принят Решением Совета ЕЭК № 4 от 23.06.2017 г.

² Решение Коллегии ЕЭК № 164 от 05.12.2017 г. «О перечне стандартов, в результате применения которых на добровольной основе обеспечивается соблюдение требований технического регламента Евразийского экономического союза «О безопасности упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду» (ТР ЕАЭС 044/2017), и перечне стандартов, содержащих правила и методы исследований (испытаний) и измерений, в том числе правила отбора образцов, необходимые для применения и исполнения требований технического регламента Евразийского экономического союза «О безопасности упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду» (ТР ЕАЭС 044/2017) и осуществления оценки соответствия объектов технического регулирования».

Необходимость контроля паразитологических показателей качества воды возникла в конце 60-х гг. прошлого века, когда была доказана возможность прохождения цист лямблий (споровой формы одноклеточных паразитов, возбудителей распространенного инфекционного заболевания) через барьер водоочистных сооружений и связь заболеваемости населения лямблиозом с состоянием систем питьевого водоснабжения [1]. В России исследования воды на содержание цист лямблий начались в конце 80-х гг. Результатом совместных работ Института медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского и НИИ коммунального водоснабжения и очистки воды Академии коммунального хозяйства им. К.Д. Памфилова [2] стала

методика определения цист лямблий и яиц гельминтов в воде, положенная в основу методических указаний МУК 4.2.668–97³, обеспечивавших СанПиН 2.1.4.559–96⁴.

Ныне действующие МУК 4.2.1884–04⁵ и МУК 4.2.2314–08⁶

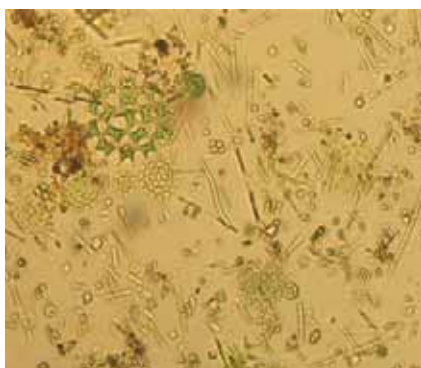
³ МУК 4.2.668–97 «Санитарно-паразитологическое исследование воды» утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом РФ 19.06.1997 г.

⁴ СанПиН 2.1.4.559–96 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества» утверждены и введены в действие постановлением Госкомсанэпиднадзора России № 26 от 24.10.1996 г.

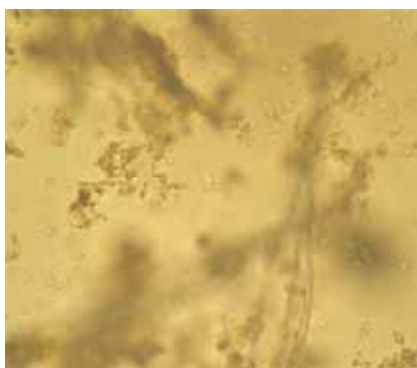
⁵ МУК 4.2.1884–04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов» утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом РФ 03.03.2004 г.

⁶ МУК 4.2.2314–08 «Методы санитарно-паразитологического анализа воды» утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом РФ 18.01.2008 г.

Главная тема: Профессионалы — о качестве контроля



а (общее увеличение $\times 320$)



б (общее увеличение $\times 640$)

Рис. 1

Препараты, приготовленные методом флотации по МУК 4.2.1884-04

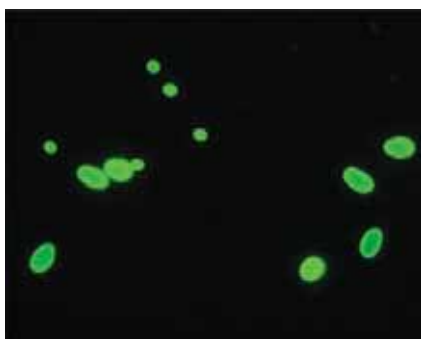


Рис. 2

Препарат с цистами лямблий и ооцистами криптоспоридий, приготовленный по ISO 15553:2006 с применением FITC (общее увеличение $\times 640$)



Рис. 3

Препарат с цистами лямблий, приготовленный по ISO 15553:2006 с применением дифференциально-интерференционного контраста (DIC)

описывают модификации метода, разработанного в 1984 г. американцем У. Якубовски [3]. Особенности вышеуказанных МУК обусловлены российскими реалиями: картриджная фильтрация заменена на мембранную, соответственно уменьшен объем отбираемой пробы с 380 до 25 л природной воды и 50 л питьевой.

Разработчики МУК предложили осадить очищенный после флотации концентрат пробы, а не переносить на предметное стекло верхний слой раствора флотанта. Кроме того, была сделана попытка расширить возможности метода на определение не нормируемого СанПиН 2.1.4.559–96 показателя (яйца гельминтов)

путем увеличения плотности флотанта до 1,30 г/см³.

Необходимо отметить, что метод, разработанный У. Якубовски, предлагался в качестве исследовательского и подлежал дальнейшему усовершенствованию⁷, так как характеризовался низкой чувствительностью, воспроизводимостью и трудоемкостью: на анализ одной пробы уходило до 40 ч и более [4] (рис. 1).

За рубежом за истекшее время метод обнаружения в воде цист лямблий был значительно усовершенствован. Из клинической диагностики в исследовании воды были перенесены методики их специфического мечения моноклональными антителами⁸, светящимися в ультрафиолетовом свете (рис. 2). Этот подход позволил сократить трудозатраты на микроскопические исследования и повысить объективность идентификации.

В целях повышения надежности получаемых результатов были усилены требования: данные эпифлюоресцентной микроскопии должны были быть под-

⁷ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater / APHA, AWWA and WPCF. — Washington, D.C., 1992. — 989 p. (Стандартные методы исследования воды и сточных вод).

⁸ Моноклональные антитела вырабатываются иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, то есть произошедшими из одной плазматической клетки-предшественницы.

Хронометраж основных этапов паразитологического анализа показал, что использование процедур иммуномагнитной сепарации и специфического мечения (ISO 15553:2006 и ГОСТ ISO 15553-2017) позволяет в разы увеличить эффективность выделения и обнаружения паразитарных объектов размером 4,5–12 мкм, а также сократить время микроскопических исследований

тверждены с применением оптики дифференциально-интерференционного контраста (DIC) (рис. 3). Затем для удаления лишних взвесей при пробоподготовке стала применяться иммуномагнитная сепарация (IMS)⁹ (рис. 4), а для облегчения подтверждения искомым объектам — окраска диаминофенилиндиолом (DAPI) (рис. 5).

Для одновременного обнаружения цист лямблий и ооцист криптоспоридий методом иммуномагнитной сепарации за рубежом в настоящее время повсеместно применяются коммерческие наборы иммуномагнитных частиц и иммунофлуоресцентные диагностикумы¹⁰. Диагностикумы должны применяться в соответствии с инструкциями производителя, которые являются единственными утвержденными методиками для IMS (ISO 15553:2006¹¹).

Описанные в международном стандарте ISO 15553:2006 мето-

⁹ Иммуномагнитная сепарация — быстрый метод разделения клеток, основанный на применении парамагнитных полистирольных микро-частиц, покрытых антителами к специфическим антигенам.

¹⁰ Иммунофлуоресцентный метод (РИФ, реакция иммунофлуоресценции, реакция Кунса) — метод выявления специфических антигенов с помощью антител, конъюгированных со специальным флуоресцентным красителем — флуорохромом (такие красители способны поглощать свет и излучать его через короткий промежуток времени (10⁻⁶–10⁻⁹ сек). Интенсивность флуоресценции пропорциональна интенсивности возбуждающего излучения, и при малых концентрациях вещества возможно количественно определить флуоресцирующее вещество на микроскопическом или цитологическом препарате). Обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Диагностикум — (греч. *diagnōstikos* — способный распознавать) — стандартный диагностический препарат для выявления антител (используется в качестве антигена) в серологических исследованиях.

¹¹ ISO 15553:2006. *Water quality — Isolation and identification of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts from water* (Качество воды. Выделение и идентификация ооцист криптоспоридий и цист лямблий в воде).

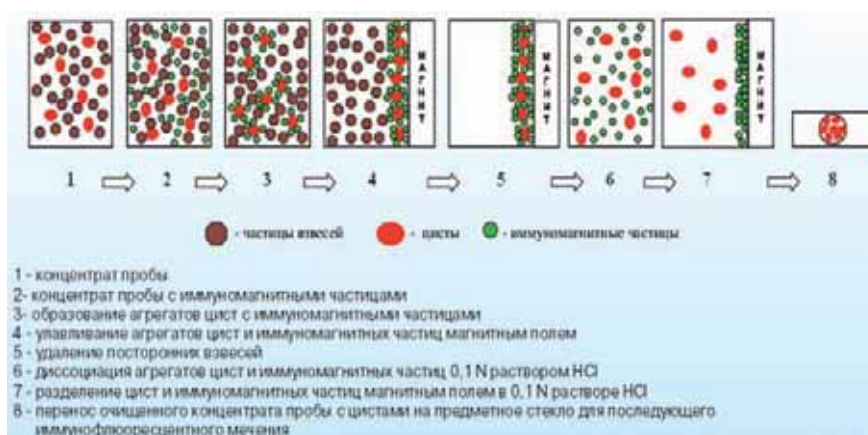


Рис. 4
Этапы иммуномагнитной сепарации (общее увеличение × 1500)

Трудозатраты на выполнение паразитологических анализов [таблица]

Этап анализа, кол-во проб	Диапазон временных затрат на процедуру	
	МУК 4.2.1884-04 МУК 4.2.2314-08	ISO 15553:2006 (ГОСТ ISO 15553-2017)
Фильтрация одной пробы	0,5–3,0 ч	0,5–3,0 ч
Элюция (отмывка) одной пробы	30 мин	30 мин
Центрифугирование 1–2 проб	20–45 мин	20–45 мин
Флотация / иммуномагнитное разделение: одной пробы серии проб (до 10 шт.)	10–15 мин —	— 1 ч 10 мин — 1 ч 40 мин
Мечение серии проб (до 10 шт.)	—	1–1,5 ч
Приготовление препаратов на одну пробу	На 4–20 препаратов — 10–50 мин	На один препарат — 2 мин
Микроскопия одной пробы	4–20 препаратов за 2–20 ч (на один препарат — 30–60 мин)	На один препарат — 15–20 мин
ИТОГО	3 ч 42 мин — 25 ч 33 мин	3 ч 47 мин — 6 ч 47 мин

Справка

Иммунофлуоресценция (Immunofluorescence) — метод определения количества и/или распределения антитела или антигена в тканевом срезе. Антитела маркируются (прямо или косвенно) с помощью флуоресцентного красителя (например, флуоресцина) и затем воздействуют на ткань, срез которой изучается с помощью ультрафиолетового микроскопа. В случае прямой иммунофлуоресценции (*direct immunofluorescence*) маркировка антитела производится непосредственно перед его воздействием на ткань. При косвенной иммунофлуоресценции (*indirect immunofluorescence*) маркировка антитела производится после его соединения с антигеном при помощи флуоресцентно-маркирующей антииммуноглобулиновой сыворотки.

«Медицинский словарь»

Главная тема: Профессионалы — о качестве контроля

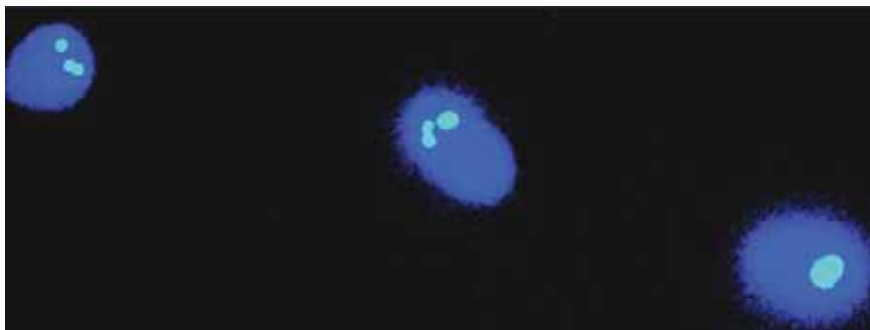


Рис. 5
Препарат с цистами лямблий, приготовленный по ISO 15553:2006 с применением DAPI

ды дают наиболее достоверные результаты, особенно часто используются, постоянно дорабатываются и уточняются, но среди них нет методов, основанных на неспецифическом окрашивании. Метод с применением иммуно-флуоресцентного окрашивания в 1996 г. был впервые апробирован в ЗАО «РОСА», а с 2003 г. подготовка паразитологических проб к анализу проводится с применением иммуномагнитной сепарации. Хронометраж основных этапов паразитологического анализа показал, что использование процедур иммуномагнитной сепарации и специфического мечения (ISO 15553:2006 и ГОСТ ISO 15553-2017¹²) позволяет в разы увеличить эффективность выделения и обнаружения паразитарных объектов размером 4,5–7 мкм (ооцист) и 8–12 мкм (цист), а также сократить время самого сложного этапа — микроскопических исследований (см. табли-

цу). При этом количество препаратов на одну пробу сокращается с 4–20 (при проведении анализа по МУК 4.2.1884–04 и МУК 4.2.2314–08) до одного препарата с диаметром сканируемого поля 15 мм (при использовании метода ISO 15553:2006) (см. таблицу, рис. 1).

Использованная литература:

1. Craun J. Waterborne outbreaks of giardiasis, current

status // In: Giardia and giardiasis: biology, pathogenesis and epidemiology / S.L. Erlandsen and E.A. Meyer (ed.). — New York: Plenum Publishing Corp., 1984. — P. 243–261.

2. Романенко Н.А., Новосильцев Г.И. Санитарно-паразитологические показатели качества питьевой воды // Стандарты и качество. — 1995. — № 11. — С. 33–36.

3. Jakubowski W. Detection of Giardia cysts in drinking water // In: Giardia and giardiasis: biology, pathogenesis and epidemiology / S.L. Erlandsen and E.A. Meyer (ed.). — New York: Plenum Publishing Corp., 1984. — P. 263–286.

4. Sorenson S.K., Riggs, J.L., Dileanls P.D., Suk T.J. Isolation and detection of Giardia cysts from water using direct immunofluorescence // Water Resources. — 1986. — № 22 (5). — P.843–845.



Резюме

Определение ооцист криптоспоридий и цист лямблий после вступления в силу 01.01.2019 г. ТР ЕАЭС 044/2017 будет регламентировать ГОСТ ISO 15553-2017. Выявлены сложности, тормозящие его распространение: отсутствие отечественных диагностикумов для IMS, высокая стоимость диагностикумов иностранного производства, а также необходимость использования дорогостоящей оптики. Проведение качественного санитарно-паразитологического исследования по этому стандарту возможно только в хорошо оборудованных аналитических лабораториях (центрах) с компетентным персоналом, обеспеченных необходимыми расходными материалами, в том числе дорогостоящими диагностикумами. В настоящее время в РФ существуют единичные организации, специалисты которых могут обучать данной методике с проведением практических занятий на рабочих местах.

¹² ГОСТ ISO 15553-2017 «Качество воды. Выделение из воды и идентификация ооцист криптоспоридий и цист лямблий» введен в действие Постановлением Госстандарта Республики Беларусь № 63 от 31.07.2017 г. в качестве государственного стандарта Республики Беларусь с 01.07.2018 г., применяется в ЕАЭС. Входит в доказательную базу Технического регламента ЕАЭС 044/2017 «О безопасности упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду», принятого Решением Совета ЕЭК № 4 от 23.06.2017 г.