

## ОСОБЕННОСТИ ВЫПОЛНЕНИЯ САНИТАРНО-ПАЗАРИТОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛИЗОВ В ЗАО "РОСА"

*В.Е. Ларин, кандидат биологических наук, начальник отдела биологических методов анализа, ЗАО "РОСА"*

Неспециалистам бывает непросто разобраться в хитросплетении аналитических процедур. Непросто понять, чем различаются методы определения одного и того же показателя. Казалось бы, определяемый аналит - тот же самый, но стоимость его определения различается в несколько раз. В данной публикации мы рассмотрим в публицистическом аспекте санитарно-паразитологический анализ воды.

Паразитологические показатели питьевой воды, наверное, одни из самых недавно возникших в водном законодательстве. До середины 90-х годов XX века они не нормировались ни в одной стране мира. Под санитарными паразитологическими показателями понимались только яйца гельминтов.

Но в 1993 году в г.Милуоки, США, произошла вспышка, в ходе которой заболело криптоспориديозом более 400 000 горожан, были и смертельные случаи. И с этого времени под санитарно-паразитологическими показателями в первую очередь подразумеваются цисты патогенных кишечных простейших.

Методы определения в воде цист патогенных кишечных простейших – лямблий и криптоспоридий – начали развиваться при росте заболеваемости СПИДом в США. Оказалось, что эти паразиты быстро приводили к гибели пациентов в манифестной стадии СПИДа. То есть, являются оппортунистическими – сопутствующими поражению иммунитета. У людей с нормальным иммунитетом лямблии и криптоспоридии вызывают различной тяжести заболевания пищеварительной системы, проходящие, как правило, в течение нескольких дней при соответствующем лечении.

Цисты этих паразитов имеют микроскопические размеры – 5-15 микрометров. Из-за толстой оболочки они устойчивы к традиционным уровням дезинфекции при питьевой водоподготовке. А их малые размеры и гладкая форма позволяют проникать через быстрые песчаные фильтры станций водоподготовки.

Одна из первых статей по методам их определения в воде имела подзаголовок «State of the art» - «На уровне искусства». Такой это был сложный, трудоемкий и невоспроизводимый метод. Работа водного паразитолога похожа на труд золотоискателя. Чтобы найти единичные мельчайшие частицы золота, он должен перелопатить, сконцентрировать и очистить тонны породы. Но, в отличие от золотоискателей, самородков у паразитологов не встречается никогда. ☺ Цисты простейших инертны. Во внешней среде, в воде они не размножаются. Поэтому нельзя их нарастить, для облегчения обнаружения. Это покоящиеся стадии жизненного цикла, предназначенные эволюцией для распространения и заражения. Цисты попадают в воду в результате фекального загрязнения. Показано, что заразиться лямблиями или криптоспоридиями можно, проглотив единичные цисты – настолько они вирулентны. То есть, важно уметь находить их в «штуках». А методы, как уже говорилось, очень несовершенны. Поэтому, чтобы повысить вероятность обнаружения, концентрируется большой объем питьевой воды. По отечественной методике – 50 литров на пробу. По великобританской – не менее 1000 литров. Представляете, какое количество осадка получается при тонкой фильтрации такого объема? Даже из питьевой воды при плохой коагуляции может получаться до нескольких десятков кубических сантиметров осадка!

Как же найти в нем цисты? Осадок надо очистить от посторонних частиц. По отечественной методике это делается флотацией. Паразитолог, как бармен, работает при этом с наслаиванием жидкостей с разной плотностью. Но триумфом развития методики стала иммуномагнитная сепарация. Звучит страшно, а на самом деле очень красивая и умная процедура.

Для нее применяются парамагнитные частицы – то есть намагничивающиеся в магнитном поле, но не проявляющие магнитных свойств вне поля. Частицы имеют строго калиброванный размер. На их поверхность нанесены моноклональные антитела – то есть белки, выработанные либо лабораторными животными, либо клеточными культурами в ответ на заражение искомыми паразитами. Эти антитела взаимодействуют как ключ с замком с антигенами – белками на поверхности цист. Такое взаимодействие очень специфично – антитело не «склеится» с белком, отличным от своего антигена.

Взвесь частиц вносят в концентрат пробы воды и положенное время перемешивают. Во время перемешивания частицы облепляют поверхность цист – если цисты есть в концентрате. Затем пробирку помещают в магнитное поле. Пробирка специальная – одна стенка у нее плоская, и всей поверхностью прилегает к магниту.

Под действием поля частицы прилипают к стенке пробирки, утянув с собой и цисты. А всю жидкость с ненужными взвесями удаляют. Затем пробирку убирают из магнитного поля и вносят в нее раствор, разрывающий связь антиген-антитело. Пробирку опять помещают в магнит, но теперь уже не налет на стенке представляет ценность, а очищенный от частиц раствор.

Достижимая степень концентрирования – примерно 200 микролитров из 50 литров воды – в 250 000 раз!

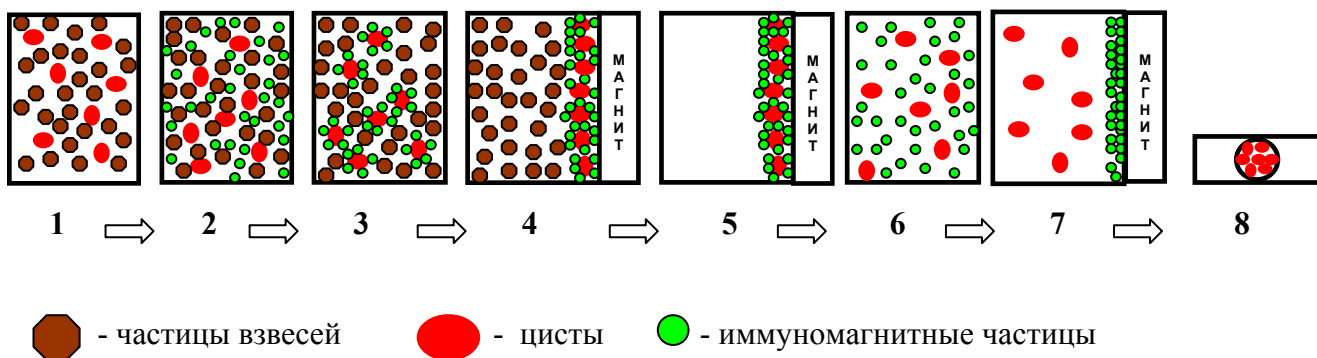
Но и это еще не всё – концентрат надо перенести на специальное стекло, особым образом высушить, чтобы «приклеить» к стеклу цисты. А затем обработать препарат еще одним труднопроизносимым реактивом – моноклональными антителами, сконъюгированными с пигментом, светящемся при облучении ультрафиолетом.

Благодаря такому специфическому мечению на препарате должны светиться только искомые цисты. Это позволяет повысить объективность и достоверность микроскопии.

Метод остается настолько трудоемок и сложен, что в Великобритании, например, в 2001 году на работу с ним было аккредитовано всего 13 лабораторий на всю страну.

Надеюсь, вам было интересно и познавательно прочесть о водной паразитологии.

### ЭТАПЫ ИММУНОМАГНИТНОЙ СЕПАРАЦИИ



1 – концентрат пробы

- 2- концентрат пробы с иммуномагнитными частицами
- 3- образование агрегатов цист с иммуномагнитными частицами
- 4 – улавливание агрегатов цист и иммуномагнитных частиц магнитным полем
- 5 – удаление посторонних взвесей
- 6 – диссоциация агрегатов цист и иммуномагнитных частиц 0,1 N раствором HCl
- 7 - разделение цист и иммуномагнитных частиц магнитным полем в 0,1 N растворе HCl
- 8 - перенос очищенного концентрата пробы с цистами на предметное стекло для последующего иммунофлюоресцентного мечения

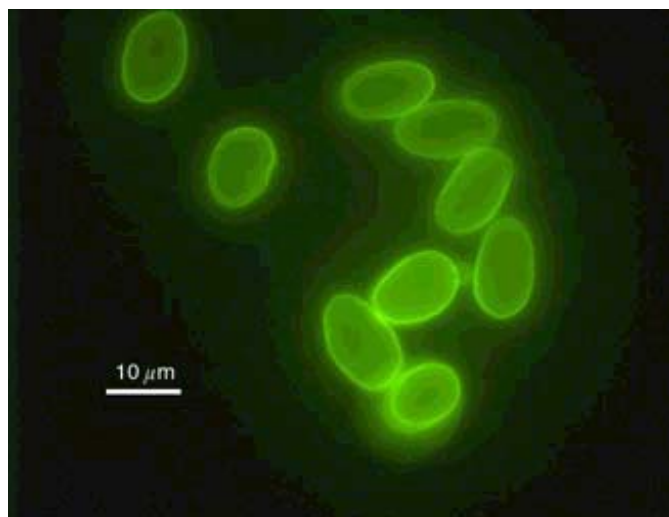


Рис. 9. Так цисты лямблий светятся при УФ-микроскопии