

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь
Н.П. Жукова
«10» июня 2019 г.
Регистрационный № 003-0519



**МЕТОД ОТБОРА ПРОБ СМЫВОВ И СОСКОБОВ С
ТЕХНОГЕННЫХ ОБЪЕКТОВ ВОДОПОТРЕБЛЕНИЯ ДЛЯ
ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ ЛЕГИОНЕЛЛ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»; государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья».

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Тонко О.В., д.м.н., профессор Коломиец Н.Д., к.м.н., доцент Ханенко О.Н., к.м.н., доцент Красько А.Г., Федорович Е.В., Абрамчук Д.Д.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н. П. Жукова
20.06.2019
Регистрационный № 003-0519

**МЕТОД ОТБОРА ПРОБ СМЫВОВ И СОСКОБОВ С ТЕХНОГЕННЫХ
ОБЪЕКТОВ ВОДОПОТРЕБЛЕНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ
ЛЕГИОНЕЛЛ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. О. В. Тонко, д-р мед. наук, проф. Н. Д. Коломиец, канд. мед. наук, доц. О. Н. Ханенко, канд. мед. наук, доц. А. Г. Красько, Е. В. Федорович, Д. Д. Абрамчук

Минск 2019

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) устанавливает метод выявления культур бактерий рода *Legionella* — возбудителей легионеллеза из проб воды и смывов/соскобов с техногенных объектов водопотребления, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний, связанных с водным путем передачи. Метод также позволяет осуществить эффективное расследование случаев заболевания, которые могут быть связаны с исследуемым объектом, и оценить осуществление противоэпидемических и профилактических мероприятий, проведенных при выделении из воды и/или из техногенных объектов водопотребления возбудителей легионеллеза.

Преимуществом предложенного метода является повышение эффективности обнаружения биопленочных культур легионелл, в составе которых они чаще всего находятся в пробах воды и смывов/соскобов с техногенных объектов водопотребления.

Настоящая инструкция предназначена для микробиологических лабораторий, осуществляющих микробиологические исследования на наличие возбудителя легионеллеза в объектах, потенциально опасных в отношении распространения данного заболевания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

1. Стерильные контейнеры для отбора проб объемом 1 л (при возможности рекомендуется использование одноразовых пластиковых контейнеров, поскольку существует риск повреждения стеклянных контейнеров при транспортировке). Допускается использование 2 контейнеров объемом по 0,5 л.

2. Стерильные пластиковые пробирки (со штативом для пробирок) для транспортировки тампонов с пробами биопленок.

3. Одноразовые тампоны с деревянными или пластиковыми держателями (при возможности рекомендуется использование тампонов из дакрона/полипропилена, поскольку ватные тампоны могут задерживать рост легионелл).

4. Салфетки, содержащие спиртовой антисептик с концентрацией спиртов не менее 70 %. Возможно нанесение спиртосодержащего антисептика на стерильную салфетку перед применением.

5. Пипетки для добавления 0,5 мл 0,1N раствора тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) в пробы воды.

6. 0,1N стерильный раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (15,81 г/л в дистиллированной воде, стерилизовать).

7. Таймер.

8. Термометр откалиброванный, которым можно измерять температуру от 10 до 100 °С.

Меры безопасности

Предприятие должно быть заранее уведомлено об отключении (но не дренаже и не дезинфекции) любых устройств, генерирующих аэрозоль, чтобы минимизировать риск для группы по отбору проб. Люди с повышенным риском

развития «болезни легионеров» при воздействии легионелл (например, с ослабленным иммунитетом) не должны входить в группу по отбору проб.

Дополнительные средства индивидуальной защиты (СИЗ):

Перчатки могут быть необходимы для отбора проб в гидромассажных СПА-фильтрах или других местах, которые могут быть сильно загрязнены органическими материалами.

Ношение правильно подогнанного респиратора с фильтром НЕРА и защитных очков (щитки) для защиты органов дыхания и глаз может быть необходимо при отборе проб с образованием аэрозоля в закрытых помещениях с устройством, которое нельзя выключить в качестве меры предосторожности.

Во всех случаях взятия проб руки должны быть вымыты и тщательно высушены после взятия проб, а также перед едой, питьем или курением. Персонал, производящий отбор проб, должен пройти обучение. Во избежание контакта или вдыхания изоляционного материала при работе в потолочных пространствах следует надевать защитную одежду и маски от пыли.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Мониторинг за циркуляцией возбудителей легионеллеза в питьевой воде и водных системах, потенциально опасных в отношении распространения легионеллезной инфекции.

Эпидемиологическое исследование очага легионеллеза с целью определения его границ; выявления факторов передачи возбудителя и условий, способствовавших возникновению очага, а также разработка санитарно-противоэпидемических мероприятий по его локализации и ликвидации.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Образцы воды в точках использования

В большинстве случаев рекомендуется брать только горячую воду. Тем не менее, существуют ситуации, когда необходимо взять образцы холодной воды. Например, в теплое время года холодная вода может быть достаточно теплой для быстрого размножения легионелл (>20 °C). Опреснение может повысить температуру холодной воды. Холодная вода также может быть теплой из-за отсутствия изоляции между трубами горячей и холодной воды.

Отбирают один мазок (смыв/соскоб биопленки) и одну пробу основного объема воды из каждого места отбора проб (т. е. из каждого душа или крана).

Отбор смывов/соскобов биопленки

1. Просят обслуживающий персонал объекта снять насадку для душа. Для кранов необходимо попросить снять аэратор. При невозможности снятия насадки и/или аэратора отбор проб производится из места отбора в неизменном состоянии. Соответствующие отметки делают в листе данных для образцов.

Взятие тампонов для отбора мазка (смыв/соскоб биопленки):

2. Включают воду на 2 с, чтобы увлажнить трубу, а затем выключают ее. Вставляют стерильный тампон глубоко в кран/трубу. Необходимо постараться выйти за пределы изгиба и с нажимом протереть внутреннюю поверхность, не ломая стержень тампона (при наличии на внутренней стороне насадки для душа или аэратора видимого налета биопленки их также необходимо протереть).

3. Помещают тампон в стерильную пластиковую пробирку и добавляют 3–5 мл воды из того же крана, чтобы во время транспортировки кончик тампона был влажным. Защелкивают деревянный или пластиковый стержень тампона примерно на расстоянии 2,5 см от верха пробирки. При необходимости добавляют каплю 0,1N раствора тиосульфата натрия для нейтрализации остаточных дезинфицирующих средств. Закрывают верхнюю часть пробирки, чтобы предотвратить утечку.

4. Маркируют пробирку. Записывают тип и местоположение образца на листе данных для образцов и помещают пробирку в сумку-холодильник.

Взятие пробы воды:

5. После отбора пробы биопленки включают горячую воду на 1 мин, холодную — на 2 мин (если производится отбор проб холодной воды). Цель состоит в том, чтобы получить пробу воды в настоящее время в распределительной водной системе вместе с любым содержимым, поступающим из биопленок. Необходимо избегать чрезмерного нагрева воды (примерно 50 °C или выше), так как свободно плавающая планктонная форма легионелл быстро умрет при повышенных температурах. Собирают 1 дм³ воды из крана в стерильную емкость объемом 1 дм³, оставив пространство 2,5 см сверху.

6. При необходимости добавляют 0,5 мл 0,1N раствора тиосульфата натрия к пробе воды, чтобы нейтрализовать остаточные дезинфицирующие средства. Закрывают крышку емкости, чтобы предотвратить утечку.

7. Маркируют емкость. Записывают тип и местоположение образца на листе данных для образцов и помещают в сумку-холодильник.

Измерение параметров воды:

8. Спускают горячую воду в течение 1 мин. Спускают холодную воду в течение 2 мин (если производится отбор проб холодной воды). Собирают 100–300 мл воды в отдельный контейнер. Этот контейнер можно использовать для измерения параметров воды на каждом участке отбора проб. Измеряют температуру в образце, записывают данные. Дезинфицируют термометр салфеткой, содержащей спиртовой антисептик.

2. Образцы горячей воды из водонагревателя (бойлера)

Взятие пробы воды:

1. Собирают только пробу основного объема воды. Образец биопленки редко может быть получен из водонагревателя, так как это потребует полного опорожнения резервуара. В тех случаях, когда прямой отбор проб невозможен, собирают пробу из отверстия для горячей воды, ближайшего к водонагревателю. Предпочтительно собирать образцы, представляющие воду в резервуаре для хранения из крана, а не смесителя или душа, чтобы избежать смешивания различных потоков воды в образце. Но если ближайшим к водонагревателю

выходом является душ, выполняется отбор пробы воды из душа; если это один кран-смеситель, выполняется отбор пробы воды из смесителя.

2. Просят обслуживающий персонал объекта открыть сливной клапан водонагревателя и собирают 1 дм³ воды в контейнер емкостью 1 дм³, оставляя пространство 2,5 см сверху.

3. При необходимости добавляют 0,5 мл 0,1N раствора тиосульфата натрия к пробе воды, чтобы нейтрализовать остаточные дезинфицирующие средства. Закрывают крышку контейнера, чтобы предотвратить утечку.

4. Маркируют контейнер. Записывают тип и местоположение образца на листе данных для образцов и помещают в сумку-холодильник.

Измерение параметров воды:

5. Измеряют температуру в пробе воды, собранной из водонагревателя. Дезинфицируют термометр салфеткой, содержащей спиртовой антисептик, записывают данные.

3. Образцы из плавательных бассейнов и вихревых ванн (джакузи, гидромассажная ванна)

Взятие тампонов для отбора мазка (смыв/соскоб биопленки):

1. Отбирают пробу биопленки тампоном из нескольких форсунок и у линии раздела воды.

2. Помещают каждый тампон в стерильную пластиковую пробирку (один тампон на пробирку) и добавляют 3–5 мл воды из бассейнов и вихревых ванн, чтобы во время транспортировки кончик тампона был влажным. Защелкивают деревянный или пластиковый стержень тампона примерно на расстоянии 2,5 см от верха пробирки. Добавляют каплю 0,1N раствора тиосульфата натрия для нейтрализации остаточных дезинфицирующих средств. Закрывают пробирку, чтобы предотвратить утечку.

3. Маркируют пробирку. Записывают тип и местоположение образца на листе данных для образцов и помещают пробирку в сумку-холодильник.

Взятие пробы воды:

4. Если бассейн, вихревая ванна не слиты, берут 1 дм³ пробы воды в контейнер объемом 1 дм³. Если бассейн, вихревая ванна частично слиты, можно использовать стерильную пробирку объемом 10–15 мл, чтобы собрать оставшуюся воду. Если SPA-салон полностью опорожнен, необходимо обратиться к обслуживающему персоналу учреждения за доступом к компенсационному резервуару (для сбора переливной воды) и взять оттуда пробу воды.

5. Добавляют 0,5 мл 0,1N раствора тиосульфата натрия к пробе воды, чтобы нейтрализовать остаточные дезинфицирующие средства. Закрывают крышку, чтобы предотвратить утечку.

6. Маркируют контейнер. Записывают тип и местоположение образца на листе данных для образцов и помещают в сумку-холодильник.

Измерение параметров воды:

7. Собирают 100–300 мл воды из бассейна, вихревой ванны (или компенсационного бака в случае слива) в отдельный контейнер. Измеряют температуру, записывают данные. Дезинфицируют термометр салфеткой, содержащей спиртовой антисептик.

8. Очень важен сбор образца фильтра из бассейна, вихревой ванны. Необходимо запросить доступ к фильтру (который обычно находится в отдельной комнате обслуживания) у обслуживающего персонала объекта. Рекомендуются надеть перчатки из-за больших органических нагрузок, которые обычно присутствуют в фильтрах, а также из-за абразивной или едкой природы некоторых фильтрующих наполнителей. Методология отбора проб фильтра зависит от типа фильтра:

8.1. песочные фильтры: собирают немного песка и достаточно воды из фильтра, чтобы покрыть песок и сохранить его влажным. Собирают 300–500 мл воды из камеры фильтра в контейнер емкостью 1 дм³. Используют тот же или новый контейнер, чтобы выкопать песок из камеры, высыпают песок в контейнер, убедившись, что он полностью покрыт водой;

8.2. картриджные фильтры: отрезают часть фильтра, чтобы он поместился внутри контейнера емкостью 1 дм³, и добавляют достаточно воды из камеры фильтра, чтобы накрыть ее и сохранить влажность;

8.3. фильтры с диатомовой землей: собирают 300–500 мл воды из камеры фильтра в контейнер емкостью 1 дм³ и используют стерильный тампон для извлечения диатомового порошка. Помещают порошок в контейнер, убедившись, что он полностью покрыт, по крайней мере, на 2–3 см водой.

9. Добавляют 0,5 мл 0,1N раствора тиосульфата натрия к образцу для нейтрализации остаточных дезинфицирующих средств. Закрывают крышку, чтобы предотвратить утечку.

10. Маркируют контейнер. Записывают тип и местоположение образца на листе данных для образцов и помещают в сумку-холодильник.

4. Образцы из градирен и испарительных конденсаторов

Не рекомендуется отбирать пробы в течение как минимум 72 ч после дезинфекции или очистки системы. Это должно позволить условиям стабилизироваться перед отбором проб. Там, где это практически невозможно осуществить, до отбора проб вода должна циркулировать по всей системе в течение не менее 30 мин. Рекомендуется при возможности отбор проб осуществлять во время работы системы.

Проба должна быть взята из градирни или точки отбора проб, расположенной на линии возврата охлаждающей воды в градирню.

Отбирают образцы для выделения легионелл (или другого микробиологического исследования) перед любой другой пробой, предназначенной, например, для химического анализа.

При отборе образцов из градирен или испарительных конденсаторов рекомендуется использовать респиратор, защитные очки (щитки) для глаз, перчатки.

1. Физический осмотр градирни или испарительного конденсатора.

Проверяют водный резервуар на чрезмерное накопление осадка и органических веществ, которых не должно быть. Убеждаются в том, что содержимое не имеет чрезмерных отложений, водорослей или слизи, а также, что каплеуловители чистые и на них нет мусора.

Взятие тампонов для отбора мазка (смыв/соскоб биопленки):

2. Отбирают пробу биопленки тампоном с влажных стенок у линии раздела воды.

3. Помещают каждый тампон в стерильную пластиковую пробирку (один тампон на пробирку) и добавляют 3–5 мл воды из резервуара, чтобы во время транспортировки кончик тампона был влажным. Защелкивают деревянный или пластиковый стержень тампона примерно на расстоянии 2,5 см от верха пробирки. При необходимости добавляют каплю 0,1N раствора тиосульфата натрия для нейтрализации остаточных дезинфицирующих средств. Закрывают пробирку, чтобы предотвратить утечку.

4. Маркируют пробирку. Записывают тип и местоположение образца на листе данных для образцов и помещают пробирку в сумку-холодильник.

Взятие пробы воды:

5. Собирают пробу основного объема воды в объеме 1 дм³. При отборе из точки, соединенной с линией возврата в резервуар, дают воде стечь в течение достаточного времени, чтобы удалить всю застойную воду до заполнения контейнера для пробы. Проба не должна браться в непосредственной близости от подпиточной воды (впуск) или вблизи применения какой-либо системы очистки воды. Поворачивают контейнер для образцов, пока горловина не будет слегка направлена вверх. Создают искусственный ток, толкая контейнер горизонтально вперед и от руки. Следует избегать сбора осадка и слизи. Необходимо оставить немного пространства сверху в контейнере.

6. При необходимости добавляют 0,5 мл 0,1N раствора тиосульфата натрия к пробе воды, чтобы нейтрализовать остаточные дезинфицирующие средства. Закрывают крышку бутылки, чтобы предотвратить утечку.

7. Собирают 100–300 мл воды из резервуара в отдельный контейнер. Измеряют температуру, записывают данные. Дезинфицируют термометр салфеткой, содержащей спиртовой антисептик

8. Маркируют контейнер. Записывают тип и местоположение образца на листе данных для образцов и помещают в сумку-холодильник.

5. Выбор мест отбора, транспортировка, хранение и подготовка проб

Выбор мест отбора, транспортировку, хранение и подготовку проб осуществляют на основании этапов алгоритма (приложение).

Особенности выполнения исследования:

- целенаправленное исследование объекта с целью выявления контаминации воды легионеллами, позволяющее обнаружить источник возможного легионеллезного заражения;

- при исследовании необходимо оценивать воду в точках использования, т. е. из выпускного отверстия (головка душа, кран), с учетом возможного образования биопленок в инженерно-технических сооружениях, связанных с циркуляцией воды;

- для определения точек, подлежащих исследованию, и их количества, необходима предварительная оценка объекта с установлением критических участков;

- факторами риска при определении данных участков являются: температура горячей воды менее 55 °С, измеренная через 1 мин после включения крана; температура холодной воды более 20 °С, измеренная через 2 мин после включения крана; обнаружение застоя воды; обнаружение загрязнений (биопленок) на поверхности санитарно-технического оборудования;
- до исследования не допускается дезинфекция выпускного отверстия (в т. ч. фламбированием);
- нельзя производить механическую очистку выпускных отверстий и предварительный слив воды;
- пробы необходимо исследовать как можно быстрее. Наилучшие результаты могут быть получены при незамедлительном начале исследования в течение 4 ч от момента отбора;
- при исследовании проб позднее 4-х ч от момента отбора транспортировка и хранение должны обеспечивать температурный режим от 6 до 20 °С. При соблюдении указанной температуры транспортировки и хранения срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 48 ч. Длительное хранение проб в холодильнике при температуре ниже 6 °С приводит к ложноотрицательным результатам в связи с возможным переходом легионелл в некультивируемое состояние.

6. Выполнение исследований

Выявление и идентификация бактерий рода *Legionella* выполняется в соответствии с инструкцией по применению № 011-1115 «Лабораторная диагностика легионеллеза. Методы обнаружения легионелл в объектах водной среды», утвержденной от 23.12.2015 заместителем министра здравоохранения — главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь и иными актами законодательства Республики Беларусь.

7. Оценка результатов

Результаты оцениваются по каждому мазку (смыву/соскобу биопленки) и пробы основного объема воды отдельно.

Оценка соответствия результатов осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническими нормативами.

Алгоритм отбора, транспортировки, хранения и подготовки проб для исследований по обнаружению *legionella spp.* из инженерно-технических сооружений, связанных с циркуляцией воды

Этапы	Характеристика этапа
<p>Осмотр объекта и составление плана исследований</p>	<p>Объекты внешней среды, рекомендуемые для мониторингования на наличие легионелл:</p> <ul style="list-style-type: none"> – образцы воды и смывов из систем горячего и холодного водоснабжения в бассейнах, аквапарках, джакузи общественного пользования, SPA-салонах, организациях, оказывающих банные услуги, гостиницах; – образцы воды и смывов из систем горячего и холодного водоснабжения в отделениях реанимации и интенсивной терапии больничных организациях здравоохранения; – образцы воды и смывов из водонагревателей в бассейнах, аквапарках, джакузи общественного пользования, SPA-салонах, организациях, оказывающих банные услуги, гостиницах, больничных организациях здравоохранения; – образцы воды и смывов из плавательных бассейнов и вихревых ванн (джакузи, гидромассажной ванны) в бассейнах, аквапарках, джакузи общественного пользования, SPA-салонах, организациях, оказывающих банные услуги, гостиницах, больничных организациях здравоохранения; – образцы воды и смывов из градирен и испарительных конденсаторов.
<p>Установление и выбор критических участков и точек на объекте</p>	<p>Проводится в соответствии с этапами:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Выявить участки риска систем горячего и холодного водоснабжения, в которых необходимо осуществлять отбор проб воды и смывов для исследований. 2. Выявить точки риска, в которых существует: <ul style="list-style-type: none"> – риск застоя воды; – риск образования биопленок и накопления легионелл. 3. Проверить работоспособность системы горячего и холодного водоснабжения и ее составных частей; провести осмотр доступных частей системы и ее составных частей на предмет повреждений и признаков загрязнения, сколов и коррозии.
<p>Определение общего количества проб, подлежащих исследованию</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Для исследования необходимо включать пробы из мест использования с учетом выявленных участков и точек системы горячего и холодного водоснабжения, имеющих наибольший риск, а именно: <ul style="list-style-type: none"> – концевые (наиболее отдаленные от бойлерной), тупиковые точки;

	<p>– редко используемые участки системы водоснабжения;</p> <p>– участки, в которых длительное время не осуществлялось водопользование (ремонтные работы; построенные, но не введенные в эксплуатацию здания и др.);</p> <p>– пробы с температурой горячей воды менее 55 °С, измеренной через 1 мин после включения крана;</p> <p>– пробы с температурой холодной воды более 20 °С, измеренной через 2 мин после включения крана;</p> <p>– точки с визуально обнаруженными загрязнениями (био пленки) на поверхности санитарно-технического оборудования.</p> <p>2. Если в системе водопровода отсутствуют участки риска, рекомендуется отбирать пробы в ближайшей и наиболее отдаленной от водонагревателя точках системы.</p>
Отбор проб	<p>Осуществляется в соответствии с настоящей инструкцией по применению с учетом следующих требований:</p> <p>1. Отбор проб без дезинфекции выпускных отверстий.</p> <p>2. Механическая очистка выпускных отверстий и предварительный слив воды не производятся, за исключением исследований проб воды для оценки коллекторных резервуаров, резервуаров для хранения холодной и горячей воды.</p> <p>3. Для исследования берут образцы воды объемом 1,0 дм³ и мазок (смыв/соскоб био пленки) с внутренней поверхности водопроводных кранов, сеток душа, внутренней поверхности труб участков системы водоснабжения из каждого места отбора проб (т. е. из каждого душа или крана).</p>
Транспортировка, хранение отобранных образцов для исследований	<p>Транспортировка и хранение проб должны осуществляться при обеспечении температурного режима от 6 до 20 °С в сумках-холодильниках.</p> <p>При соблюдении указанной температуры транспортировки и хранения срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 48 ч</p> <p>Хранение проб в холодильнике при температуре ниже 6 °С не допускается.</p>
Подготовка отобранных образцов для исследований	<p>Подготовку проб к исследованию необходимо проводить только методом мембранной фильтрации, используя прибор для мембранной фильтрации воды.</p>