
ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(EASC)

EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(EASC)



МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ ISO
11731**

(проект, ВУ,
первая редакция)

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Подсчет бактерий *Legionella*

(ISO 11731:2017, IDT)

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4.

2 ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № ____ от ____ _____ 20__ г.)

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ISO 3166) 004—97	Код страны по МК (ISO 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 11731:2017 «Качество воды. Подсчет бактерий *Legionella*» («Water quality — Enumeration of *Legionella*», IDT)

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 4 «Микробиологические методы» технического комитета по стандартизации ISO/TC 147 «Качество воды» Международной организации по стандартизации (ISO).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Госстандарте Республики Беларусь.

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Все торговые марки, приведенные в настоящем документе, являются информацией, указанной для удобства пользователей, и это не означает, что ISO рекомендует именно эти марки.

Разъяснение значений принятых в ISO специфических терминов и выражений, относящихся к оценке соответствия, а также информация о соблюдении ISO принципов Всемирной торговой

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств

организации (ВТО) в отношении технических барьеров в торговле (ТБТ) находятся по следующему адресу URL: www.iso.org/iso/foreword.html.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных (государственных) органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

Содержание

Введение	
1 Область применения	
2 Нормативные ссылки	
3 Термины и определения	
4 Сущность метода	
4.1 Общие требования	
4.2 Исследование	
4.3 Подтверждение	
5 Оборудование и стеклянная посуда	
6 Питательные среды и реактивы	
7 Подготовка пробы для испытания	
8 Методика проведения испытания	
8.1 Пробы	
8.2 Концентрирование проб воды	
8.2.1 Общие требования	
8.2.2 Мембранная фильтрация и прямое размещение мембранного фильтра на питательных средах	
8.2.3 Мембранная фильтрация с последующей процедурой промывки	
8.3 Предварительная обработка пробы	
8.3.1 Термическая обработка	
8.3.2 Обработка раствором кислоты	
8.4 Питательные среды	
8.4.1 Общие требования	
8.4.2 Пробы с высокой концентрацией видов <i>Legionella</i> и низкой концентрацией нецелевых микроорганизмов	
8.4.3 Пробы с низкой концентрацией видов <i>Legionella</i> и низкой концентрацией нецелевых микроорганизмов	
8.4.4 Пробы с высокой концентрацией нецелевых микроорганизмов	
8.4.5 Пробы с чрезвычайно высокой концентрацией нецелевых микроорганизмов	
8.4.6 Инкубация	
8.4.7 Проверка чашек	
8.5 Подтверждение презумптивных колоний <i>Legionella</i> на питательных средах: агар BCYE и агар BCYE-cys	
9 Представление результатов	
10 Протокол испытания	
11 Контроль качества проведенного испытания	
11.1 Общие требования	
11.2 Контроль эффективности питательных сред для <i>Legionella</i>	
11.3 Приготовление рабочей культуры и испытательной суспензии для контроля эффективности	
Приложение А (справочное) Виды бактерий <i>Legionella</i>	
Приложение В (справочное) Питательные среды	
Приложение С (справочное) Разбавители	
Приложение D (справочное) Раствор кислоты	
Приложение E (справочное) Сбор микроорганизмов с мембранных фильтров	
Приложение F (справочное) Требования к проведению центрифугирования	
Приложение G (справочное) Метод непрямого иммунофлюоресценции для идентификации видов <i>Legionella</i>	
Приложение H (справочное) Данные эффективности	
Приложение I (справочное) Предварительная обработка сред, связанных с водой	
Приложение J (справочное) Матрица принятия решений	
Приложение ДА. (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам	
Библиография	

Введение

После первой признанной вспышки легионеллеза или болезни легионеров в 1976 году, выделенная бактерия получила название *Legionella pneumophila*. Легионеллы широко встречаются в естественных и искусственных водных средах, почвах, компостах и могут вызывать легионеллез. Легионеллы могут расти внутриклеточно в простейших, таких как *Acanthamoeba castellanii*, виды *Hartmannella* или виды *Naegleria*. Были описаны, как минимум, 61 различных вид легионелл. В 26 из этих видов были отмечены некоторые штаммы, заражающие людей. *Legionella pneumophila* можно подразделить на не менее 15 различных серогрупп, девять других видов также могут быть подразделены, как минимум, на две отдельные серогруппы. Мониторинг легионелл имеет важное значение для здравоохранения, в части определения источников окружающей среды, которые могут представлять риск легионеллеза, такие как башенные испарительные градирни, системы распределения горячей и холодной воды в зданиях и связанное с ними оборудование, такое как спа бассейны, стоматологические установки, установки для кондиционирования воздуха и т.д. Мониторинг также важен для валидации средств управления и непрерывной проверки эффективности средств управления.

КАЧЕСТВО ВОДЫ
Подсчет бактерий *Legionella*

Water quality
Enumeration of *Legionella*

Дата введения — _____

Предостережение. Применение настоящего стандарта возможно после ознакомления с требованиями установившейся лабораторной практики. Настоящий стандарт не преследует цели рассмотреть все вопросы безопасности, связанные с его применением. Ответственность за соблюдение техники безопасности, охраны труда и установление необходимых ограничений при применении настоящего стандарта несет его пользователь.

Внимание. Необходимо, чтобы испытания в соответствии с настоящим стандартом проводились квалифицированным персоналом.

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы выделения бактерий *Legionella* и оценки их количества в пробах воды.

Методы применимы ко всем видам воды, включая питьевую, промышленную, сточные и природные воды. Методы могут быть использованы для сред, связанных с водой, например, биопленки, отложения и т.д.

Не все виды *Legionella* являются культивируемыми, поэтому методами, описанными в настоящем стандарте, выделяются не все виды *Legionella*.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ISO 3696, Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

ISO 7704, Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses (Качество воды. Оценка мембранных фильтров, используемых для микробиологических анализов)

ISO 8199, Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture (Качество воды. Общее руководство по подсчету микроорганизмов, выращенных методом посева на питательной среде)

ISO 11133, Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media (Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред)

ISO 19458, Water quality — Sampling for microbiological analysis (Качество воды. Отбор проб для микробиологического анализа)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

Международная организация по стандартизации (ISO) и международная электротехническая комиссия (IEC) ведут терминологические базы данных для использования в области стандартизации, доступ к которым можно получить по следующим адресам:

—электропедия IEC: <http://www.electropedia.org/>;

— платформа для онлайн-просмотра ISO: <http://www.iso.org/obp>.

3.1 легионеллы (*Legionella*): Под микроорганизмов, обычно способных к росту на забуференном угольно-дрожжевом агаре (BCYE), содержащем соли L-цистеина и железа (III)

П р и м е ч а н и е — Более подробное описание видов *Legionella* см. в приложении А.

4 Сущность метода

4.1 Общие требования

Для подсчета *Legionella* пробу воды в зависимости от ее происхождения/характеристик концентрируют посредством мембранной фильтрации, разводят или непосредственно высевают на чашке. Необходимый предел обнаружения может зависеть от требований законодательства и причин, по которым был осуществлен отбор проб или было проведено исследование. Образцы, в которых предполагается большое количество *Legionella*, например, отобранные во время вспышки легионеллеза, могут быть исследованы после проведения концентрирования пробы воды или без. Чтобы уменьшить рост концентрации нецелевых микроорганизмов, которые могут мешать выделению целевых *Legionella*, порции пробы воды подвергаются термической обработке и обработке раствором кислоты по отдельности или в комбинации.

Разведение пробы воды необходимо проводить, когда предполагается высокая концентрация *Legionella* и/или нецелевых микроорганизмов. Перед посевом на селективную среду одну порцию разведенной пробы подвергают обработке теплом, а вторую – раствором кислоты или, в случае чрезвычайно загрязненных проб, комбинацией данных обработок.

Обработанные и/или необработанные порции пробы переносят на чашки с выбранной питательной средой, которая является селективной для *Legionella*, и инкубируют.

Примечание – Механическая обработка пробы может улучшить выделение *Legionella*.

4.2 Исследование

После инкубации колонии с характерными морфологическими признаками, сформировавшимися на селективной питательной среде, считаются презумптивными *Legionella*.

4.3 Подтверждение

Презумптивные колонии подтверждаются как *Legionella* с помощью пересева, демонстрирующего их потребность в L-цистеине и железе (III) для роста.

Примечание – Если требуется идентификация видов и серотипов, необходимы дополнительные испытания (см. приложение G). Данные испытания не являются частью стандартизированных методов, описанных в настоящем стандарте.

5 Оборудование и стеклянная посуда

Используют стандартное лабораторное оборудование, в том числе перечисленное ниже.

5.1 Стерильные чашки Петри.

5.2 Инкубатор, обеспечивающий поддержание температуры (36 ± 2) °С.

5.3 Ультрафиолетовая лампа, с длиной волны излучения (360 ± 20) нм.

5.4 Мембранное фильтровальное оборудование, пригодное для фильтрации объемов воды от 10 до 1000 мл.

5.5 Мембранный фильтр

5.5.1 Мембранный фильтр для концентрирования и элюирования, поликарбонатные или полиэфирсульфоновые мембранные фильтры диаметром 47 – 142 мм с номинальным размером пор 0,2 мкм, см. ссылку [6]. Данные мембранные фильтры используются для концентрирования с последующей процедурой промывки.

5.5.2 Мембранный фильтр для прямого посева на питательные среды, мембранные фильтры из нитрата целлюлозы или смешанных эфиров целлюлозы диаметром 47 – 50 мм с номинальным размером пор 0,2 мкм или 0,45 мкм. Данные мембранные фильтры используются для прямого посева на питательные среды после фильтрации. Перед использованием фильтры должны быть оценены в соответствии с ISO 7704.

Примечание – Черные мембранные фильтры лучше контрастируют с белыми колониями *Legionella*, чем мембранные фильтры светлого цвета.

5.6 рН-метр с точностью ± 0,1 при температуре 20 °С – 25 °С.

5.7 Вихревой смеситель.

5.8 Ультразвуковая водяная баня, обеспечивающая уровень воды в водяной бане выше уровня разбавителя, покрывающего мембранный фильтр.

5.9 Водяная баня, поддерживающая температуру (50 ± 1) °С.

5.10 Стеклянная посуда, стерилизованная в соответствии с ISO 8199.

5.11 Препаровальная лупа, стереоскопическая, с увеличением не менее 4× и с подходящей наклонной подсветкой.

Примечание – Также можно использовать увеличительное стекло (увеличение не менее 4×).

5.12 Дезинфицированные пинцеты для обращения с мембранными фильтрами.

Примечание – Чтобы не повредить мембрану во время работы обычно используют пинцеты с круглыми концами.

5.13 Стерильный контейнер с винтовой крышкой, со стерильными стеклянными шариками или без них. Чтобы обеспечить максимальное удаление *Legionella* с мембранного фильтра, в стерильный контейнер можно добавить стерильные стеклянные шарики (диаметр 2–3 мм). В стерильный контейнер помещают достаточное количество стеклянных шариков, чтобы они покрыли дно контейнера.

6 Питательные среды и реактивы

При приготовлении питательных сред и реактивов используют реактивы аналитической степени чистоты, если не указано иное (см. примечание). Готовят питательные среды и реактивы в соответствии с инструкциями, приведенными в приложениях В, С и D. Готовят питательные среды, используя дистиллированную или деминерализованную воду, которая не содержит веществ, которые могут повлиять на рост микроорганизмов в условиях испытаний. Вода должна соответствовать требованиям к воде третьей степени чистоты, установленным в ISO 3696.

Альтернативно используют питательные среды и реактивы, имеющиеся в продаже, которые готовят и используют в соответствии с инструкциями изготовителя.

Примечание – Могут использоваться реактивы другой степени чистоты, при условии, что при проведении испытаний они демонстрируют такую же эффективность.

6.1 Питательные среды

См. приложение В.

6.1.1 Забуференный угольно-дрожжевой агар (BCYE)

См. В.1.

6.1.2. Забуференный угольно-дрожжевой агар без L-цистеина (BCYE-cys)

См. В.2.

Примечание – Вместо агара BCYE-cys можно использовать кровяной агар (см. В.6), питательный агар (см. В.7) или триптон-соевый агар (см. В.8).

6.1.3 Забуференный угольно-дрожжевой агар с селективными добавками (BCYE + AB)

См. В.3.

6.1.4 Глицин-ванкомицин-полимиксин В-циклогексимидный агар (GVPC)

См. В.4.

6.1.5 Модифицированный агар Вадовски-Йее (MWY)

См. В.5.

6.2 Разбавители.

См. приложение С.

6.2.1 Солевой раствор Пейджа

См. С.1.

6.2.2 Разбавленный раствор Рингера

См. С.2.

6.3 Раствор кислоты

См. приложение D.

7 Подготовка пробы для испытания

Отбор проб, транспортирование и хранение проб осуществляют в соответствии с ISO 19458. Необходимо следить за тем, чтобы пробы не подвергались воздействию неблагоприятных температурных условий (например, замерзанию или перегреву).

Примечание – Полезно использовать отдельные контейнеры.

8 Методика проведения испытания

8.1 Пробы

Решение, касающееся выбора метода исследования, лаборатория должна принимать, учитывая различные виды воды и сред, связанных с водой, откуда отобрана проба. Чтобы определить, какой из методов следует использовать, в приложении J представлена матрица принятия решений, описаны требования и представлены дополнительные варианты.

Для того чтобы обеспечить выявление *Legionella* в пробах воды, в большинстве случаев потребуется концентрирование посредством мембранной фильтрации (см. 8.2.2 или 8.2.3). В тех случаях, когда ожидается, что концентрация *Legionella* будет больше 10^4 колониеобразующих единиц на литр (КОЕ/л), можно осуществить прямой посев неконцентрированной пробы. Сильно загрязненные пробы подвергают разведению (см. приложение С для выбора подходящих разбавителей) и используют прямой посев до и после предварительной обработки (см. 8.3). Регистрируют объемы исследованных проб, в том числе разведенных, предварительно обработанных.

При отсутствии предположения о возможном количестве *Legionella* в какой либо определенной пробе, как правило, применяют методы концентрирования, выполняя процедуры, описанные в 8.2.2 или 8.2.3.

8.2 Концентрирование проб воды

8.2.1 Общие требования

Общие требования к проведению мембранной фильтрации установлены в ISO 8199. Фильтрация может быть проведена посредством вакуумной фильтрации или фильтрации под давлением.

Скорость потока должна быть отрегулирована таким образом, чтобы она не превышала максимально установленную изготовителем фильтра с учетом его размера или типа.

Примечание – Процедура для сред, связанных с водой (смывы, отложения и т.д.), описана в приложении I.

8.2.2 Мембранная фильтрация и прямое размещение мембранного фильтра на питательных средах

Пробу воды (без обработки, после обработки кислотой и, при необходимости, после термической обработки) фильтруют через мембранный фильтр из нитрата целлюлозы или смешанных эфиров целлюлозы (5.5.2). Обработку кислотой также можно проводить непосредственно на мембранном фильтре в воронке (см. 8.3.2). Объем отфильтрованной пробы зависит от содержания твердых частиц в воде или необходимого предела обнаружения. Значение объема отфильтрованной пробы должно быть записано. Осторожно снимают мембранный фильтр с подставки с помощью дезинфицированного пинцета (5.12) и помещают его (лицевой стороной вверх) непосредственно в питательную среду, обеспечивая, отсутствие под ним воздушных пузырей.

Примечание – Если концентрирование при фильтрации невозможно (например, из-за большого количества осадка), концентрирование пробы может быть выполнено посредством центрифугирования (См. приложение F).

8.2.3 Мембранная фильтрация с последующей процедурой промывки

Пробу воды фильтруют через поликарбонатный или полиэфирсульфоновый мембранный фильтр (5.5.1). Объем отфильтрованной пробы зависит от содержания твердых частиц в воде или необходимого предела обнаружения. Значение объема отфильтрованной пробы должно быть записано. Снимают мембранный фильтр с подставки с помощью дезинфицированного пинцета (5.12). Работают аккуратно, чтобы избежать потери образовавшегося осадка. Помещают мембранный фильтр (лицевой стороной вниз) в стерильный контейнер с винтовой крышкой со стеклянными шариками или без них (5.13). Чтобы смыть микроорганизмы с мембранного фильтра, добавляют от 5 до 10 мл стерильного разбавителя (см. приложение С) или пробы и энергично встряхивают, используя вихревой смеситель (5.7) в течение не менее 2 мин. В качестве альтернативы помещают

контейнер (5.13) в ультразвуковую водяную баню (5.8) на интервал времени, который был установлен при определении оптимального интервала времени для максимального выделения. Необходимо убедиться, что уровень разбавителя, покрывающего мембрану, ниже уровня воды в ультразвуковой водяной бане.

Полученный концентрат представляет собой подготовленную пробу. Записывают объем концентрата. Чтобы облегчить процесс смыва микроорганизмов с мембранных фильтров можно их разрезать на куски, используя стерильные ножницы.

Разделяют концентрат на три порции. Одну порцию используют необработанной, другую подвергают термической обработке (см. 8.3.1), а третью обрабатывают раствором кислоты (см. 8.3.2).

Примечание 1 – В качестве альтернативы смыва микроорганизмов с мембранного фильтра используют способ сбора микроорганизмов соскабливанием или протираанием (см. приложение Е).

Примечание 2 – Если концентрирование посредством фильтрации невозможно (например, из-за большого количества осадка), концентрирование пробы может быть выполнено посредством центрифугирования (См. приложение F).

Примечание 3 – Дополнительную мембранную фильтрацию можно проводить непосредственно перед обработкой кислотой на мембранном фильтре в воронке.

8.3 Предварительная обработка пробы

8.3.1 Термическая обработка

Стерильный контейнер вместе с пробой (концентрированной или неконцентрированной) помещают на водяную баню (5.9) при температуре $(50 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на (30 ± 2) мин. Для сокращения времени достижения необходимой температуры следует использовать небольшие объемы (≤ 5 мл). Если вместе обрабатываются много проб или большие объемы проб, или используются толстостенные контейнеры, контролируют температуру в отдельном контейнере, аналогичном используемому с пробами. Отсчет времени начинается, когда достигается необходимая температура. Большие объемы проб или толстостенные контейнеры после удаления из водяной бани следует охлаждать, чтобы избежать перегрева.

8.3.2 Обработка раствором кислоты

Разбавляют один объем пробы (концентрированной или неконцентрированной) в девяти объемах раствора кислоты (см. приложение D), хорошо перемешивают и оставляют его на $(5,0 \pm 0,5)$ мин. Если проба, обработанная раствором кислоты, используется для расчета конечной концентрации видов *Legionella* в пробе, то разведение должно быть учтено. Чтобы уменьшить предел обнаружения, можно посеять объемы, превышающие 0,1 мл.

Обработку кислотой также можно проводить непосредственно на мембранном фильтре в воронке. Переносят около 30 мл раствора кислоты (см. приложение D) на мембранный фильтр. Оставляют его на $(5 \pm 0,5)$ мин и удаляют раствор кислоты фильтрованием. Промывают мембранный фильтр, используя не менее 20 мл разбавителя (см. приложение C). Важно, чтобы разбавитель не касался поверхности воронки, которая не контактировала с раствором кислоты.

8.4 Питательные среды

8.4.1 Общие требования

Выбор метода, используемого для подсчета видов *Legionella*, зависит от происхождения/характеристик пробы и причины отбора проб или исследования. Предположение о возможной концентрации нецелевых микроорганизмов должно основываться на опыте или происхождении образца. Кроме того, необходимо учитывать необходимый нижний предел обнаружения. Матрица принятия решений для выбора соответствующего метода подробно описана в приложении J.

В зависимости от необходимого предела обнаружения можно использовать более одной чашки с различными питательными средами, как указано ниже.

8.4.2 Пробы с высокой концентрацией видов *Legionella* и низкой концентрацией нецелевых микроорганизмов

Если ожидается, что количество *Legionella* превысит 10^4 КОЕ/л, то пробу высевают напрямую. Инокулируют и распределяют от 0,1 до 0,5 мл пробы на одной чашке с агаром BCYE (см. В.1) и одной чашке с агаром BCYE + AB (см. В.3). Записывают значение инокулированного объема.

8.4.3 Пробы с низкой концентрацией видов *Legionella* и низкой концентрацией нецелевых микроорганизмов

8.4.3.1 Прямое размещение мембранного фильтра на питательной среде после мембранной фильтрации

Пробу фильтруют (см. 8.2.2) и помещают необработанный мембранный фильтр непосредственно на одну чашку с агаром BCYE (см. В.1). Мембранные фильтры, обработанные раствором кислоты в соответствии с 8.3.2, помещают на одну или несколько чашек с селективным или высокоселективным агаром BCYE + AB (см. В.3), или агаром GVPC (см. В.4), или агаром MWY (см. В.5).

8.4.3.2 Посев после мембранной фильтрации с последующей процедурой промывки

После мембранной фильтрации с последующей процедурой промывки (см. 8.2.3) инокулируют и распределяют от 0,1 до 0,5 мл каждой порции концентрированной пробы (необработанной, термически обработанной и обработанной кислотой) на одной чашке с агаром BCYE (см. В.1) и на одной или нескольких чашках с селективным или высокоселективным агаром BCYE + AB (см. В.3) или агаром GVPC (см. В.4), или агаром MWY (см. В.5). Записывают значение инокулированного объема.

8.4.4 Пробы с высокой концентрацией нецелевых микроорганизмов

Пробы с высокой концентрацией нецелевых микроорганизмов, не подвергавшиеся концентрированию (прямой посев), подвергавшиеся концентрированию (см. 8.2) или разведенные (1:10) разделяют на три порции. Используют одну порцию необработанной, вторую термически обрабатывают (см. 8.3.1), а третью обрабатывают раствором кислоты (см. 8.3.2). Инокулируют и распределяют от 0,1 до 0,5 мл каждой порции на чашке с агаром GVPC (см. В.4) или с агаром MWY (см. В.5). Записывают значение инокулированного объема.

8.4.5 Пробы с чрезвычайно высокой концентрацией нецелевых микроорганизмов

Выполняют посев проб с чрезвычайно высокой концентрацией нецелевых микроорганизмов, не концентрированных и разведенных (1:10 и 1:100), после предварительной термической обработкой (см. 8.3.1) с последующей обработкой раствором кислоты (см. 8.3.2). Важно до обработки раствором кислоты охладить до комнатной температуры пробу, подвергшуюся термической обработке. Разведения готовят непосредственно после обработки раствором кислоты в стерильном разбавителе (см. приложение С).

Хорошо перемешивают, встряхивая, используя вихревой смеситель (5.7) или ультразвуковую водяную баню (5.8). При необходимости, для облегчения дезагрегации материала, к пробе добавляют слой (достаточный для покрытия дна контейнера) стерильных стеклянных шариков. Инокулируют и распределяют от 0,1 до 0,5 мл пробы на чашке с агаром GVPC (см. В.4) или с агаром MWY (см. В.5). Записывают значение инокулированного объема.

8.4.6 Инкубация

Оставляют инокулированные чашки до тех пор, пока инокулированный объем не абсорбируется. Затем переворачивают чашки и инкубируют при температуре $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 7 – 10 сут. Чтобы предотвратить высыхание чашек создают влажную атмосферу, например, путем помещения их в закрытый контейнер.

Примечание – Данные валидации с использованием проб, в которые искусственно введены штаммы *Legionella*, не показали разницы в подсчетах при инкубации в течение 7 сут и 10 сут. Однако не искусственно созданные образцы, содержащие штаммы *Legionella*, для роста могут потребовать полного инкубационного периода в течение 10 сут.

8.4.7 Проверка чашек

Чашки первый раз осматривают на 2, 3, 4 или 5 сут, а затем окончательный осмотр осуществляют в конце периода инкубации. При проверке нужно идентифицировать пробы, где произошел чрезмерно быстрый рост. Окончательный количественный результат может быть получен только в конце периода инкубации. Для диапазона количественного определения см. таблицу Н.1. Поскольку *Legionella* растут медленно, и они могут быть замаскированы ростом других микроорганизмов, рекомендуется также использовать препаровальную лупу с подходящей наклонной подсветкой (5.11). Записывают количество каждого типа презумптивной колонии *Legionella*.

В случае исследований при вспышке рекомендуется, чтобы для проб, в которых предположительно концентрация нецелевых микроорганизмов высока, чашки были проверены на 2-е сут, чтобы определить, необходимы ли разведения. При этом необходимо помнить о возможных изменениях в пробах, которые хранят, с целью их возможного разведения, в течение двух дополнительных дней.

Колонии *Legionella* в основном бело-серые, но могут также быть других цветов. Они гладкие с ровным краем и обладают характерным внешним видом. Под ультрафиолетовой лампой (5.3) колонии нескольких видов (*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. gratiana*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii* и *L. tucsonensis*) флуоресцируют блестящим белым свечением, *L. erythra* и *L. rubrilucens* выглядят красными. Колонии *L. pneumophila* выглядят тускло зелеными, часто с оттенком желтого цвета. Цвет флуоресценции может помочь дифференцировать колонии в пробах, содержащих разные виды *Legionella*. Чтобы избежать уничтожения или повреждения клеток *Legionella* без возможности их восстановления, чашки не должны подвергаться воздействию ультрафиолетового света дольше, чем это необходимо. Следует отметить, что новые виды *Legionella* могут обладать характеристиками, отличными от описанных выше.

8.5 Подтверждение презумптивных колоний *Legionella* на питательных средах: агар BCYE и агар BCYE-cys

Пересевают культуру с чашки(ек), показывающей(их) наивысший процент презумптивных колоний *Legionella* (см. 8.4.7) на объем воды. При наличии только одного типа колонии, выбирают три презумптивные колонии. Если на чашке растет больше различных морфологических типов презумптивных колоний *Legionella*, тогда выбирают не менее одной колонии каждого типа. Пересевают культуру на чашку с агаром BCYE (см. В.1) и чашку с агаром BCYE-cys (см. В.2 или альтернативные среды, как описано в примечании к 6.1.2). Следует следить за тем, чтобы не перенести какие-либо питательные среды вместе с колонией. Сначала инокулируют чашку с агаром BCYE-cys, а затем чашку с агаром BCYE. Инкубируют при температуре $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 2 – 5 сут. Рассматривают как *Legionella* только те колонии, которые растут на чашке с агаром BCYE (см. В.1), но не растут на чашке с агаром BCYE-cys (см. В.2). Записывают результаты для каждой чашки. Если исходные субкультуры не подтверждаются в качестве *Legionella*, тогда анализируют дальше субкультуры презумптивных колоний *Legionella* на других чашках (с другой питательной средой или обработкой проб).

L. oakridgensis и *L. spiritensis* требуют L-цистеина и железа (III) для первичного выделения, но после этого могут слабо расти без добавления L-цистеина. Соответственно, необходимо тщательно провести сравнение различий в росте между питательными средами с добавками и без добавок.

Примечание – Для подтверждения выделения видов *Legionella* могут быть использованы альтернативные методики, при условии, что проверяется пригодность альтернативной методики.

Для особых ситуаций, например при исследовании вспышек, если присутствует только одна морфология или две презумптивные колонии для каждого типа морфологии должно быть подтверждено не менее пяти презумптивных колоний. Если должна быть выполнена идентификация колоний *Legionella* (см. приложение G) и включена в протокол испытания, то все типичные морфологии, присутствующие на любой из чашек, должны быть подтверждены и идентификационные данные приведены в протоколе.

9 Представление результатов

Чтобы оценить количество колониеобразующих единиц *Legionella* в исходной пробе воды, выбирают чашку или набор чашек (с той же питательной средой), показывающих максимальное количество подтвержденных колоний на объем воды. Учитывают разведение. Не усредняют подсчеты, касающиеся разных методов, обработок или питательных сред, поскольку они не являются параллельными анализами.

Вычисляют количество колониеобразующих единиц *Legionella* в исходной пробе (см. примеры, показанные ниже) на литр в соответствии с ISO 8199 следующим образом.

- Прямой посев:
$$C_s = \frac{a}{V_{\text{tot}}} \times V_s$$

- Мембранный фильтр на чашке:
$$C_s = \frac{a}{V_{\text{tot}}} \times V_s$$

- Фильтрация с последующей процедурой промывки (непрямая фильтрация):
$$C_s = \frac{a \times V_c}{V \times V_{\text{tot}}} \times V_s$$

ГОСТ ISO 11731

(проект, ВУ, первая редакция)

- Посев после разведения:
$$C_s = \frac{a \times V_s}{V_{dil}} \times D_f$$

где C_s — количество *Legionella*, КОЕ/л;

A — количество рассчитанных подтвержденных колоний *Legionella*

$a = \frac{\text{подтвержденная положительная доля}}{\text{полностью подтвержденная доля}} \times \text{общее количество}$

V_c — объем (концентрированной) пробы, мл;

V — объем пробы, инокулированный на чашку или набор чашек (с той же питательной средой), мл;

V_{tot} — общий объем анализируемой пробы, мл;

V_s — референтный объем, выбранный для выражения концентрации микроорганизмов в пробе (обычно 1000 мл);

V_{dil} — объем разведенной пробы, инокулированный на чашку или набор чашек (с той же питательной средой), мл;

D_f — коэффициент разведения

Цель настоящего стандарта состоит в том, чтобы обнаружить количество подтвержденных *Legionella* в пробе. Составляют отчет о подтвержденном количестве колониеобразующих единиц *Legionella* в соответствии с ISO 8199. В случае их отсутствия, отмечают в отчете «не обнаружено» в исследованном объеме, и указывают предел обнаружения, рассчитанный в соответствии с используемой процедурой (см. таблицу J.1).

10 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать:

а) сведения о применяемом методе испытания (совместно с приложением J) со ссылкой на настоящий стандарт;

Пр и м е р — Информация с учетом приложения J может быть представлена следующим образом: (матрица А, процедуры 8, 9, 10, питательная среда А и питательная среда С – GVPC).

б) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы, например, место отбора пробы с уникальным идентификатором, так что при необходимости повторная выборка может быть взята из точных местоположения и точки пробы (например, адрес и почтовый индекс, номер этажа и комнаты, точное местонахождение стока (умывальник в комнате)), метод отбора проб, характер пробы, вид водопроводной системы или установки, температура пробы, концентрация, используемого биоцида;

в) дату и время отбора пробы, дату получения пробы, начало и конец исследования, любые особенности, наблюдаемые во время транспортирования, хранения и ходе анализа, которые могли повлиять на результат (например, твердые частицы в пробе);

г) сведения о максимальном объеме пробы, использованном для испытания;

д) результаты, выраженные в соответствии с разделом 9.

11 Контроль качества проведенного испытания

11.1 Общие требования

Лаборатория должна иметь четкую систему контроля качества, гарантирующую использование подходящего оборудования, реактивов и методов проведения испытаний. Применение положительного контроля, отрицательного контроля и холостых проб является частью испытания.

11.2 Контроль эффективности питательных сред для *Legionella*

Для определения производительности, селективности и специфичности питательных сред см. ISO 11133. Эффективность различных питательных сред для *Legionella* должна быть проверена в соответствии с методами и критериями, описанными в ISO 11133. Приготовление рабочих культур и испытательных суспензий описано в 11.3. Для чашек агар ВСУЕ (см. В.1) можно проверить только производительность. Для чашек с агаром ВСУЕ-cys (см. В.2 или альтернативных сред, как описано в

примечании к 6.1.2) можно проверить только его неспособность поддерживать рост одного из штаммов *L. Pneumophila*, указанных в таблице 1.

11.3 Приготовление рабочей культуры и испытательной суспензии для контроля эффективности

Рабочие культуры должны быть приготовлены из эталонной исходной или исходной культуры штамма *Legionella*. Восстанавливают и выделяют, как рекомендовано, и пересевают на одну или несколько чашек с агаром BCYE (см. В.1) для чистоты. После инкубации из полученного роста, видимого невооруженным глазом, готовят суспензию в стерильном глицериновом бульоне (см. G.2.4). Распределяют объемами по 1 мл для хранения при температуре (минус 20 ± 5) °С.

В качестве альтернативы используют солевой раствор Пейджа (см. С.1) или дистиллированную воду для хранения при температуре (минус 70 ± 10) °С или другие соответствующие питательные среды, используемые для замораживания и хранения при температуре (минус 20 ± 5) °С или (минус 70 ± 10) °С. Осаждают одну суспензию каждого изолята на питательную среду для *Legionella* для последующей идентификации и регистрации видов *Legionella*. Для использования рабочая культура одного (или более) изолятов должна оттаять при комнатной температуре. Тщательно встряхивают, выжидают 5 – 10 мин, чтобы взвешенные частички осели. Для достижения в указанном объеме испытательной суспензии требуемого количества микроорганизмов ее, при необходимости, разбавляют в соответствии с ISO 11133.

Т а б л и ц а 1 - Контрольные штаммы и критерии эффективности

Питательная среда	Функция	Инкубация	Контрольные штаммы	Номера WDCM ^a	Контрольные среды	Метод контроля	Критерии	Типичные реакции
агар BCYE-cys, питательный агар, кровяной агар, триптон-соевый агар	Подтверждение	2 – 5 сут/ (36 ± 2) °С	<i>Legionella pneumophila</i>	00107 ^b 00180	Агар BCYE	Качественный	Нет роста	
Агар GVPC, агар BCYE+AB, Агар MWY	Производительность	2 – 5 сут/ (36 ± 2) °С	<i>Legionella pneumophila</i>	00107 ^b 00180	Агар BCYE	Количественный	PR ≥ 0,5	Вело-серофиолетовые колонии с целым краем и имеющие характерный внешний вид
		5 – 10 сут/ (36 ± 2) °С	<i>Legionella anisa</i>	00106				
	Селективность	3 сут/ (36 ± 2) °С	<i>Enterococcus Faecalis</i> ^c	00009 или 00087	–	Качественный	Полное ингибирование	–
			<i>Escherichia coli</i>	00012 или 00013	–	Качественный	Полное или частичное ингибирование (от 0 до 1) ^d	–

ГОСТ ISO 11731

(проект, ВУ, первая редакция)

Окончание таблицы 1

Питательная среда	Функция	Инкубация	Контрольные штаммы	Номера WDCM ^a	Контрольные среды	Метод контроля	Критерии	Типичные реакции
Агар ВСУЕ	Производительность	2 – 5 сут/ (36 ± 2) °С	<i>Legionella pneumophila</i>	00107 ^b	Партия среды агара ВСУЕ уже проверена	Качественный	PR ≥ 0,7	Бело-серо-фиолетовые колонии с целым краем и имеющие характерный внешний вид

^a Содержится ссылка на каталог эталонных исходных штаммов, доступный по адресу <http://www.wfcc.info>, для получения информации о номерах штаммов коллекции культур и контактных данных.

^b Как минимум должны использоваться штаммы.

^c Необходимо использовать не менее одного штамма *Enterococcus faecalis* (WDCM 00009 или WDCM 00087) и не менее одного штамма *Escherichia coli* (WDCM 00012 или WDCM 00013).

^d «0» означает «нет роста», а «1» означает «слабый рост».

Приложение А
(справочное)

Виды бактерий *Legionella*

Род *Legionella* принадлежит к таксономической последовательности *Legionellales*, в которую входят семейства *Coxiellaceae* и *Legionellaceae*. Для *Legionellaceae* были предложены три разных рода: *Legionella*, *Fluoribacter* и *Tatlockia*. Однако последние два родовых названия никогда широко не использовались и не принимались, и единственный род *Legionella* почти повсеместно используется для описания всех видов.

Legionellae - это маленькие граммотрицательные бациллы с высокой потребностью в питательных веществах для роста. В качестве источника энергии используются белки, а не углеводы. *Legionellae* являются облигатными аэробами и растут при температуре от 20 °С до 42 °С.

Для (начального) роста видов *Legionella* из окружающей среды и клинических источников необходим аминокислотный L-цистеин. Кроме того, *L. oakridgensis* и *L. spiritensis* требуют L-цистеина и железа (III) для первичного выделения, но после этого могут слабо развиваться в отсутствие добавленного L-цистеина. Растворимое железо (III) требуется для оптимального роста и для начального выделения бактерии, как из клинических источников, так и из источников окружающей среды. Железо (III), L-цистеин, α-кетоглутарат и забуференный угольно-дрожжевой агар (агар BCYE), является предпочтительной питательной средой роста при выделении из клинических источников. Клинически важно, что виды *Legionella* лучше всего растут при температуре 35 °С в увлажненном воздухе на чашках агара BCYE, обычно в течение 2 – 5 сут после инокуляции чашек. Из вида *Legionella L. lytica* не может расти на агаре BCYE, но ее можно культивировать, используя совместное культивирование с амёбой.

Описаны не менее 61 вид различных *Legionella*. Сообщается о том, что в 26 из этих видов есть штаммы, заражающие людей. *L. pneumophila* содержит не менее 15 различных серогрупп, девять других видов содержат две разные серогруппы, а остальные виды содержат только одну серогруппу. Серогруппа 1 *L. pneumophila* вызвала вспышку в Филадельфии в 1976 году и является причиной 70% – 90% всех случаев болезни легионеров, для которой и было произведено бактериальное выделение. Как и *L. pneumophila*, другие виды *Legionella* широко распространены в водных объектах и почве. Выделение этих видов обычно менее частое и технически более сложное, чем выделение *L. pneumophila*. На основе выделения из клинического материала были задокументированы 25 видов *Legionella*, кроме *L. pneumophila*, которые вызывают инфицирование человека (см. таблицу А.1). Выделение других видов ограничивается водой и почвой, хотя некоторые из них были отмечены при инфицировании людей на основе сероконверсии при отсутствии выделения.

При выращивании на агаре с древесно-дрожжевым экстрактом виды *Legionella* продуцируют водорастворимое внеклеточное соединение, которое флуоресцирует желто-зеленым свечением при воздействии длинноволнового ультрафиолетового света (360 ± 20) нм. Несколько видов обнаруживают сине-белую или красную аутофлуоресценцию под длинноволновым ультрафиолетовым светом. Дифференциацию общих видов наиболее удобно проводить в лаборатории путем окрашивания изолятов прямыми флуоресцентными антителами. Идентификация серогрупп *L. pneumophila* и других видов *Legionella* часто намного сложнее и лучше всего проводится специализированными референтными лабораториями. Определение с использованием молекулярных методов является наиболее точным способом исследования, особенно для менее распространенных штаммов.

Т а б л и ц а А . 1 – Виды *Legionella*, связанные с болезнью

<i>L. anisa</i>	<i>L. erythra</i>	<i>L. longbeachae</i>	<i>L. pneumophila</i>
<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. feeleij</i>	<i>L. lytica</i>	<i>L. sainthelensi</i>
<i>L. bozemanii</i>	<i>L. gormanii</i>	<i>L. maceachernii</i>	<i>L. steelei</i>
<i>L. cardiaca</i>	<i>L. hackeliae</i>	<i>L. micdadei</i>	<i>L. tusconensis</i>
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. jordanis</i>	<i>L. nagasakiensis</i>	<i>L. wadsworthii</i>
<i>L. clemensonensis</i>	<i>L. lansingensis</i>	<i>L. oakridgensis</i>	
<i>L. dumoffii</i>	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. parisiensis</i>	
Пр и м е ч а н и е – Кроме того, <i>L. waltersii</i> был выявлен методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в клинической пробе.			

Приложение В (справочное)

Питательные среды

В.1 Забуференный угольно-дрожжевой агар (BCYE)

В.1.1 Состав

Дрожжевой экстракт (бактериологический класс), г		10,0
Агар, г		12,0
Активированный уголь, г		2,0
α -кетоглутарат, монокалиевая соль, г	(CAS No. 58485–42–0)	1,0
Буфер ACES (N-2-ацетиамидо-2-аминоэтансульфоновая кислота), г	(CAS No. 7365–82–4)	10,0
Калия гидроксид (KOH) (гранулы), г	(CAS No. 1310–58–3)	2,8
L-цистеин гидрохлорид моногидрат, г	(CAS No. 7048–04–6)	0,4
Пирофосфат железа (III) ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$), г	(CAS No. 10058–44–3)	0,25
Вода (см. раздел 6), мл		до 1 000

Необходимо учесть рекомендации изготовителя относительно концентрации агара, добавляемого для обеспечения достаточной прочности геля. Вода, используемая для приготовления питательной среды и добавок, должна соответствовать требованиям к воде третьей степени чистоты, установленным в ISO 3696, (см. раздел 6).

В.1.2 Приготовление

а) Растворы цистеина и железа (III)

Готовят свежие растворы L-цистеин гидрохлорида и пирофосфата железа (III) путем добавления 0,4 г и 0,25 г, соответственно, к 10 мл воды. Стерилизуют каждый раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Хранят в течение 3 мес в чистых стерильных контейнерах при температуре (минус 20 ± 3) °С.

б) Буфер ACES

В 500 мл воды добавляют гранулы ACES и растворяют, выдерживая на водяной бане при температуре 45 °С – 50 °С. Отдельно в 480 мл воды добавляют все гранулы гидроксида калия и растворяют, осторожно встряхивая. Для приготовления буфера ACES, смешивают два раствора.

в) Конечная питательная среда

К 980 мл буфера ACES последовательно добавляют уголь, дрожжевой экстракт и α -кетоглутарат.

Примечание – Буфер ACES может вызвать денатурацию дрожжевого экстракта, если описанная последовательность не соблюдается.

Готовят раствор гидроксида калия (KOH) концентрации 0,1 моль/л путем, растворения 5,6 г в 1 л воды. Готовят раствор серной кислоты (H_2SO_4) 0,1 моль/л, осторожно добавляя 5,5 мл H_2SO_4 (95 % – 98 %) в 1 л воды. Растворы гидроксида калия концентрации 0,1 моль/л или серной кислоты концентрации 0,1 моль/л используют при необходимости доведения pH до $6,8 \pm 0,2$. Добавляют агар, смешивают и автоклавируют при температуре (121 ± 3) °С в течение (15 ± 1) мин. После автоклавирования охлаждают на водяной бане до (48 ± 3) °С °С.

В асептических условиях добавляют растворы L-цистеина и пирофосфата железа (III), хорошо перемешивая между добавлениями.

Распределяют по 20 мл в чашки Петри диаметром 90 – 100 мм. pH конечной питательной среды составляет $6,8 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Оставляют чашки до испарения избыточной влаги, а затем хранят при температуре (5 ± 3) °С в герметичных контейнерах в темном месте в течение 3 мес.

В.2 Забуференный угольно-дрожжевой агар без L-цистеина (BCYE-cys)

Готовят питательную среду по аналогии с агаром BCYE (см. В.1), но не вносят L-цистеин.

Оставляют чашки до испарения избыточной влаги, а затем хранят при температуре (5 ± 3) °С в герметичных контейнерах в темном месте в течение 3 мес.

В.3 Селективная питательная среда: забуференный угольно-дрожжевой агар с селективными добавками (BCYE + AB)

В.3.1 Селективные добавки

Конечные концентрации селективных добавок в агаре BCYE + AB должны быть следующими:

Полимиксин В сульфат, МЕ/л	(CAS № 1405-20-5)	80 000
Цефазолин натрия, г/л	(CAS № 27164-46-1)	0,009
Пимарицин (син. натамицин), г/л	(CAS № 7681-93-8)	0,07

Примечание – Питательная среда идентична агару BCYE (см. В.1), за исключением того, что к агару BCYE добавляют три добавки антибиотика.

В.3.2 Приготовление добавок антибиотика

Добавляют соответствующее количество полимиксина В сульфата в 100 мл воды для достижения концентрации 14 545 МЕ/мл. Стерилизуют раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Распределяют по 5,5 мл в стерильные контейнеры и хранят при температуре (минус 20 ± 3) °С в течение 3 мес. Перед использованием оттаивают при комнатной температуре.

Добавляют 180 мг цефазолина натрия в 20 мл воды и стерилизуют раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Распределяют по 1 мл в стерильные контейнеры и хранят при температуре (минус 20 ± 3) °С в течение 3 мес. Перед использованием оттаивают при комнатной температуре.

Добавляют 1,75 г пимарицина в 100 мл воды и стерилизуют раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Распределяют по 4 мл в стерильные контейнеры и хранят при температуре (минус 20 ± 3) °С в течение 3 мес. Перед использованием оттаивают при комнатной температуре.

В.3.3 Приготовление агара BCYE + AB

После добавления растворов L-цистеина и пирофосфата железа (III) к конечной питательной среде добавляют по одному объему каждого из вышеуказанных трех добавок антибиотика (см. В.3.2). Хорошо перемешивают.

Распределяют по 20 мл в чашки Петри диаметром 90 – 100 мм. РН конечной питательной среды должен составлять 6,8 ± 0,2 при температуре 25 °С. Оставляют чашки до испарения избыточной влаги, а затем хранят при температуре (5 ± 3) °С в герметичных контейнерах в темном месте в течение 3 мес.

В.4 Высокоселективная питательная среда: глицин-ванкомицин-полимиксин В- циклогексимидный агар (GVPC)

В.4.1 Селективные добавки

Конечная концентрация селективных добавок в агаре GVPC должна быть следующей:

Глицин, не содержащий аммиака, г/л	(CAS № 56-40-6)	3
Полимиксин В сульфат, МЕ/л	(CAS № 1405-20-5)	80 000
Ванкомицина гидрохлорид, г/л	(CAS № 1404-93-9)	0,001
Циклогексимид, г/л	(CAS № 66-81-9)	0,08

Примечание – Питательная среда идентична агару BCYE (см. В.1), за исключением того, что к агару BCYE добавляются три добавки антибиотика и глицин.

В.4.2 Приготовление добавок антибиотика

Добавляют соответствующее количество полимиксина В сульфата в 100 мл воды для достижения концентрации 14 545 МЕ/мл. Стерилизуют раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Распределяют по 5,5 мл в стерильные контейнеры и хранят при температуре (минус 20 ± 3) °С в течение 3 мес. Перед использованием оттаивают при комнатной температуре.

Добавляют 20 мг гидрохлорида ванкомицина в 20 мл воды и стерилизуют раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Распределяют по 1 мл в стерильные контейнеры и хранят при температуре (минус 20 ± 3) °С в течение 3 мес. Перед использованием оттаивают при комнатной температуре.

ГОСТ ISO 11731

(проект, ВУ, первая редакция)

Добавляют 2 г циклогексимида в 100 мл воды и стерилизуют раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Распределяют по 4 мл в стерильные контейнеры и хранят при температуре (минус 20 ± 3) °С в течение 3 мес. Перед использованием оттаивают при комнатной температуре.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Циклогексимид является гепатотоксичным. При работе с этим химическим веществом в порошкообразной форме следует пользоваться перчатками и пылезащитной маской.

В.4.3 Приготовление агара GVPC

Следуют инструкции по приготовлению агара BCYE, приведенной в В.1, но после добавления α -кетоглутарата добавляют 3 г глицина, не содержащего аммиака, а затем регулируют рН до $6,8 \pm 0,2$.

После добавления растворов L-цистеина и пирофосфата железа (III), к конечной питательной среде добавляют по одному объему каждого из вышеуказанных трех добавок антибиотика (см. В.4.2). Хорошо перемешивают.

Распределяют по 20 мл в чашки Петри диаметром 90 – 100 мм. РН конечной питательной среды составляет $6,8 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Оставляют чашки до испарения избыточной влаги, а затем хранят при температуре (5 ± 3) °С в герметичных контейнерах в темном месте в течение 4 недель.

В.5 Высокоселективная питательная среда: модифицированный агар Вадовски Йее (MWY)

В.5.1 Селективные добавки

Конечная концентрация селективных добавок в агаре MWY должна быть следующей:

Глицин, не содержащий аммиака, г/л	(CAS № 56-40-6)	3
Полимиксин В сульфат, МЕ/л	(CAS № 1405-20-5)	50 000
Ванкомицина гидрохлорид, г/л	(CAS № 1404-93-9)	0,001
Анизомицин, г/л	(CAS № 22862-76-6)	0,08
Бромотимоловый синий, г/л	(CAS № 76-59-5)	0,01
Бромкрезол фиолетовый, г/л	(CAS № 115-40-2)	0,01

Примечание – Питательная среда идентична агару BCYE (см. В.1), за исключением того, что к агару BCYE добавляются три добавки антибиотика, два индикатора и глицин

В.5.2 Приготовление добавок антибиотика

Добавляют соответствующее количество полимиксина В сульфата в 100 мл воды для достижения концентрации 10 000 МЕ/мл. Стерилизуют раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Распределяют по 5 мл в стерильные контейнеры и хранят при температуре (минус 20 ± 3) °С в течение 3 мес. Перед использованием оттаивают при комнатной температуре.

Добавляют 20 мг ванкомицина гидрохлорида в 20 мл воды и стерилизуют раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Распределяют по 1 мл в стерильные контейнеры и хранят при температуре (минус 20 ± 3) °С в течение 3 мес. Перед использованием оттаивают при комнатной температуре.

Добавляют 0,1 г анизомицина в 10 мл этанола (см. раздел 6) и стерилизуют раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Распределяют по 0,8 мл в стерильные контейнеры. Используют свежий раствор анизомицина.

Добавляют 100 мг бромотимолового синего в 100 мл воды и стерилизуют раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Распределяют по 10 мл в стерильные контейнеры и хранят при температуре (5 ± 3) °С в течение 1 года.

Добавляют 100 мг бромкрезола фиолетового в 100 мл воды и стерилизуют раствор фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньшим. Распределяют по 10 мл в стерильные контейнеры и хранят при температуре (5 ± 3) °С в течение 1 года.

В.5.3 Приготовление агара MWY

Следуют инструкции по приготовлению агара BCYE, приведенной в В.1, но после добавления α -кетоглутарата добавляют 3 г глицина без аммиака, а затем регулируют рН до $6,8 \pm 0,2$.

После добавления растворов L-цистеина и пирофосфата железа (III) в конечную питательную среду добавляют 5 мл полимиксина В сульфата, 1 мл ванкомицина гидрохлорида, 0,8 мл раствора анизомидина и 10 мл обоих индикаторов (см. В.5.2). Хорошо перемешивают.

Распределяют по 20 мл в чашки Петри диаметром 90 – 100 мм. pH конечной питательной среды должно составлять $6,8 \pm 0,2$ при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Оставляют чашки до испарения избыточной влаги, а затем хранят при температуре $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ в герметичных контейнерах в темном месте в течение 4 недель.

В.6 Кровяной агар

В.6.1 Состав

Агар, г		15,0
Питательный субстрат (экстракт сердца и пептоны), г		20,0
Натрия хлорид, г	(CAS No. 7647-14-5)	5,0
Кровь (например, лошадиная или овечья), мл		50
Вода, мл		до 1 000

Необходимо учесть рекомендации изготовителя относительно концентрации агара, добавляемого для обеспечения достаточной прочности геля. Вода, используемая для приготовления питательной среды и добавок, должна соответствовать требованиям к воде третьей степени чистоты, установленным в ISO 3696 (см. раздел 6).

В.6.2 Приготовление

Суспендируют ингредиенты, за исключением крови, в воде и хорошо перемешивают. При необходимости, после автоклавирования, доводят значение pH до $6,8 \pm 0,2$ при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Автоклавируют при температуре $(121 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение (15 ± 1) мин. После автоклавирования охлаждают на водяной бане до температуры $(48 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$. Добавляют 50 мл крови, хорошо перемешивают и разливают в чашки Петри высотой не менее 4 мм. Если агар готовят не для непосредственного использования, то чашки можно хранить при температуре $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ в темном месте, защищая от испарения, в течение 4 недель.

В.7 Питательный агар

В.7.1 Состав

Агар, г		15,0
Экстракт мяса, г		1,0
Ферментативный продукт переваривания пептона, г		5,0
Натрия хлорид, г	(CAS No. 7647-14-5)	5,0
Вода, мл		до 1 000

Необходимо учесть рекомендации изготовителя относительно концентрации агара, добавляемого для обеспечения достаточной прочности геля. Вода, используемая для приготовления питательной среды и добавок, должна соответствовать требованиям к воде третьей степени чистоты, установленным в ISO 3696 (см. раздел 6).

В.7.2 Приготовление

Суспендируют ингредиенты в воде и хорошо перемешивают. При необходимости, после автоклавирования, доводят значение pH до $6,8 \pm 0,2$ при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Автоклавируют при температуре $(121 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение (15 ± 1) мин. После автоклавирования охлаждают до температуры $(48 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ и разливают в чашки Петри высотой не менее 4 мм. Если агар готовят не для непосредственного использования, то чашки можно хранить при температуре $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ в темном месте, защищая от испарения, в течение 8 недель.

ГОСТ ISO 11731

(проект, ВУ, первая редакция)

В.8 Триптон-соевый агар (TSA)

В.8.1 Состав

Ферментативный продукт переваривания казеина, г		15,0
Ферментативный продукт переваривания сои или соевой муки, г		5,0
Натрия хлорид, г	CAS No. 7647-14-5)	5,0
Агар, г		15,0
Вода, мл		до 1 000

Необходимо учесть рекомендации изготовителя относительно концентрации агара, добавляемого для обеспечения достаточной прочности геля. Вода, используемая для приготовления питательной среды и добавок, должна соответствовать требованиям к воде третьей степени чистоты, установленным в ISO 3696 (см. раздел 6).

В.8.2 Приготовление

Суспендируют ингредиенты в воде и хорошо перемешивают. При необходимости, после автоклавирования, доводят значение pH до $6,8 \pm 0,2$ при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Автоклавируют при температуре $(121 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение (15 ± 1) мин. После автоклавирования охлаждают до температуры $(48 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ и разливают в чашки Петри высотой не менее 4 мм. Если агар готовят не для непосредственного использования, то чашки можно хранить при температуре $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ в темном месте, защищая от испарения, в течение 8 недель.

Приложение С (справочное)

Разбавители

С.1. Солевой раствор Пейджа

С.1.1 Состав

Натрия хлорид (NaCl), г	(CAS № 7647-14-5)	0,120
Магния сульфат гептагидрат (MgSO ₄ · 7H ₂ O), г	(CAS No. 10034-99-8)	0,004
Кальция хлорид дигидрат (CaCl ₂ · 2H ₂ O), г	(CAS № 233-140-8)	0,004
Натрия гидрофосфат [(Na ₂ HPO ₄), г	(CAS No. 7558-79-4)	0,142
Калия дигидрофосфат (KH ₂ PO ₄), г	(CAS № 7778-77-0)	0,136
Вода (см. раздел 6), мл		1 000

Добавляют химические вещества в воду. Растворяют, хорошо перемешивают и автоклавируют при температуре (121 ± 3) °С в течение (15 ± 1) мин.

Примечание – Для обеспечения точности приготовления можно приготовить 10 л солевого раствора Пейджа и распределить в те объемы, которые требуется для автоклавирования при температуре (121 ± 3) °С в течение (20 ± 1) мин.

С.2 Разбавленный раствор Рингера

Используют разведение 1:10 раствора Рингера концентрацией 1/4, как описано в ISO 8199.

С.3 Фосфатно-солевой раствор (PBS) (рН 7,5)

Используют продукт, имеющийся в продаже, и восстанавливают его в соответствии с инструкциями изготовителя.

С.4 Стерильная водопроводная вода

Используют стерильную водопроводную воду, если доказано, что она не влияет на выделение *Legionella*.

**Приложение D
(справочное)**

Раствор кислоты

Готовят раствор соляной кислоты (HCl) концентрации 0,2 моль/л, добавив 17,4 мл концентрированной HCl ($\rho = 1,184$, минимальное содержание основного вещества 37 %) или 20 мл концентрированной HCl ($\rho = 1,16$, минимальное содержание основного вещества 31,5 %) к 1 л воды (раствор А).

Готовят раствор хлорида калия (KCl) концентрации 0,2 моль/л путем растворения 14,9 г KCl в 1 л воды (раствор В).

Для приготовления раствора кислоты смешивают 3,9 мл раствора А и 25 мл раствора В. Регулируют рН до $2,2 \pm 0,2$ добавлением раствора гидроксида калия (KOH) концентрации 1 моль/л. Хранят в подходящей стеклянной бутылке в темном месте при комнатной температуре в течение 1 мес.

Приложение Е
(справочное)

Сбор микроорганизмов с мембранных фильтров

Для сбора *Legionella* с мембранных фильтров можно использовать метод соскабливания.

Мембранный фильтр снимают с подставки, используя дезинфицированный пинцет, и помещают в стерильную чашку Петри подходящего размера (обычно чашку Петри диаметром 60 мм для мембранного фильтра диаметром 47 мм), содержащую от 5 до 10 мл стерильного разбавителя или фильтрата пробы. Записывают значение используемого объема. Затем мембранный фильтр несколько раз соскабливают стерильным клеточным скребком, имеющимся в продаже.

**Приложение F
(справочное)**

Требования к проведению центрифугирования

Если количество осадка в пробе осложняет процесс концентрирования посредством фильтрации, тогда возможно использовать метод центрифугирования. Скорости выделения для этого метода обычно намного ниже, чем в других методах, описанных в настоящем стандарте. Наилучшие скорости выделения отмечаются при использовании центрифуг с качающимися роторами, поскольку осадок ограничивается нижней частью пробирки, что облегчает удаление надосадочной жидкости без нарушения осадка. Выделение с помощью центрифуг с роторами с фиксированным углом нестабильное и ниже, чем в других методах, представленных в настоящем стандарте.

После встряхивания для повторного суспендирования осадка, который возможно образовался, выливают (200 ± 5) мл каждой пробы в стерильные бутылки для центрифугирования с винтовыми крышками вместимостью от 300 до 500 мл. Центрифугируют бутылки при 6000 g в течение 10 мин или 3 000 g в течение 30 мин, поддерживая температуру от 15 °C до 25 °C. Перед тем как открыть ротор, снимают герметичную головку центрифуги с бутылками, содержащимися внутри, в защитный шкаф, что позволяет избежать воздействия аэрозолей, если бутылка разбилась во время центрифугирования. Асептически удаляют надосадочную жидкость и отбрасывают. Повторно суспендируют осадок в 2 – 10 мл разбавителя (см. приложение С). Записывают значение объема добавленного разбавителя. Полученный концентрат представляет собой подготовленную пробу. Рекомендуется удалять надосадочную жидкость вакуумом, а не декантированием, чтобы избежать нарушения и последующей потери осадка. При необходимости можно использовать меньший объем пробы, регулируя необходимый объем разбавителя для повторного суспендирования.

Приложение G (справочное)

Метод непрямой иммунофлуоресценции для идентификации видов *Legionella*

G.1 Общие положения

Виды *Legionella* могут быть идентифицированы различными способами. К ним относятся газожидкостная хроматография жирных кислот клеточных стенок и изопреноидных хинонов, непрямой анализ иммунофлуоресцентных антител, прямой анализ флуоресцентных антител, реакция агглютинации на предметном стекле, реакция латексной агглютинации, блот-анализ колонии на основе специфического для рода моноклонального антитела, методики твердофазного иммуноферментного анализа с подходящими диагностическими реактивами, время-пролетная ионизация лазерной десорбцией с использованием матрицы (MALDI-TOF), полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование ДНК. В этом приложении метод иммунофлуоресценции описан как пример серологического метода, который может быть использован для идентификации видов *Legionella*.

G.2 (Серологические) реактивы

Используют диагностические серологические реактивы известной специфичности из известного источника. Не используют реактив, для которого эта информация недоступна.

Примечание – Иногда могут возникать серологические перекрестные реакции с другими микроорганизмами в пробах окружающей среды.

G.2.1 Антисыворотка к *L.pneumophila* и другим видам *Legionella*

Для идентификации *L. pneumophila* используют поликлональные или моноклональные антитела, способные реагировать со всеми известными серогруппами *L. pneumophila*. Используют специальные антисыворотки, если это необходимо, для идентификации видов, отличных от *L. pneumophila* или серогрупп *L. pneumophila*.

G.2.2 Антитела кроличьи, меченные флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC)

Используют антитела кроличьи, меченные FITC, которые имеются в продаже. Различные вещества для мечения необходимы для использования с антисывороткой, полученной от других животных.

G.2.3 Глицериновая среда

Используют глицериновую среду, имеющуюся в продаже или приготовленную путем добавления 1 мл фосфатно-солевого буфера (pH 8,5) к 9 мл глицерина (нейтрального).

G.2.4 Глицериновый бульон

Растворяют 5 г обезвоженного питательного бульона, имеющегося в продаже, в 170 мл воды (см. раздел 6) и добавляют 30 мл глицерина. Хорошо перемешивают и распределяют в чистые сухие бутылки из кварцевого стекла объемом 2 мл. Стерилизуют путем автоклавирования при температуре $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ в течение (20 ± 1) мин. Хранят при комнатной температуре до тех пор, пока не потребуются.

G.2.5 Раствор формалина

Готовят путем добавления 20 мл 37 % водного раствора формальдегида к 980 мл фосфатно-солевого раствора (см. С.3).

G.3 Подготовка антигенов

Используя чистый рост изолята *Legionella* на чашках агара BCYE (см. 8.5), готовят тест-антиген (проба), эмульгируя несколько колоний в растворе формалина (см. G.2.5).

Для некоторых реактивов использование раствора формалина может оказаться неприемлемым, и в этом случае колонии можно эмульгировать в воде (см. раздел 6) и суспензию инактивировать при температуре 60°C в течение (60 ± 5) мин. Важно проверить, какой способ приготовления применим.

ГОСТ ISO 11731

(проект, ВУ, первая редакция)

Разбавляют тест-антиген в фосфатно-солевом растворе (PBS) (см. С.3), чтобы получить суспензию, слегка мутную, при рассмотрении ее невооруженным глазом.

Это соответствует приблизительно от 1×10^5 до 1×10^6 клеток/мл и оптической плотности 0,1, при использовании спектрофотометра с длиной волны 395 нм с кюветой длиной оптического пути 10 мм или стандарт мутности МакФарланда 0,5, разведенному 1:100.

Готовят контрольный антиген *Legionella* таким же образом, как и эталонный штамм, полученный из признанной коллекции культур (например, Национальной коллекции типовых культур), культивированный на агаре BCYE. Хранят эталонные штаммы замороженными, как описано в ISO 11133.

G.4 Подготовка предметных стекол

Используют предметные стекла с политетрафторэтиленовым покрытием с несколькими лунками диаметром 3 мм. Добавляют 5 мкл каждого антигена (см. G.3), чтобы отделить лунки и дают высохнуть. Закрепляют либо путем плавного нагрева с помощью горелки Бунзена, либо путем погружения в ацетон на 10 мин.

G.5 Подготовка антисыворотки (антитела)

Разбавляют антисыворотку к *Legionella* (см. G.2.1) до рекомендуемого рабочего титра в соответствии с инструкциями поставщика. Добавляют в достаточном количестве разведенную антисыворотку для покрытия каждой лунки, содержащей антиген. Помещают предметные стекла в пластиковую или стеклянную коробочку, содержащую влажную ткань или промокательную бумагу, чтобы предотвратить высыхание.

Накрывают коробку крышкой и инкубируют при температуре (36 ± 2) °С в течение (30 ± 1) мин.

Примечание – Параллельные анализы одного и того же тест-антигена (пробы) можно проводить на одном предметном стекле, но чтобы избежать риска перекрестного загрязнения реактивами или пробами, рекомендуется использовать отдельные предметные стекла для различных тест-антигенов (проб).

G.6 Промывка предметных стекол

Предметные стекла в фосфатно-солевом растворе (см. С.3), погружают в ротационный смеситель и осторожно промывают (5 ± 1) мин. Заменяют фосфатно-солевой раствор свежим и снова промывают (5 ± 1) мин. Повторяют промывание еще раз в течение (5 ± 1) мин.

G.7 Применение веществ для мечения

Антитела кроличьи, меченные флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) (см. G.2.2) разбавляют до рабочего титра, следуя инструкциям поставщика. Добавляют 5 мкл разведенного FITC в каждую лунку и инкубируют во коробочке, содержащей влажную ткань или промокательную бумагу, при температуре (36 ± 2) °С в течение (30 ± 1) мин. Промывают предметные стекла, как описано в G.6.

G.8 Монтирование предметных стекол

Добавляют на каждое предметное стекло достаточное количество (обычно от двух до трех капель) глицериновой среды (см. G.2.3) для распространения под чистым покровным стеклом, достаточно большим, чтобы покрывались все лунки. Следует убедиться в отсутствии воздушных пузырьков между предметным стеклом и покровным стеклом.

G.9 Осмотр предметных стекол

Осматривают предметные стекла с помощью эпифлуоресцентного микроскопа. Принимают во внимание клетки, которые флуоресцируют ярко-зеленым свечением с видовой специфической антисывороткой, как подтвержденные виды *Legionella*. Повторяют испытания со свежими реактивами, если флуоресценция не происходит с контрольным антигеном.

Если контрольные антигены не флуоресцируют, проверяют рабочую концентрацию антисыворотки, подготовив двукратные серийные разведения и титруя их в сопоставлении с контрольным(и) антигеном(ами).

Если получают перекрестные реакции или неубедительные результаты, изоляты могут быть отправлены в референтную лабораторию для дальнейшего изучения. Упаковывание для транспортирования осуществляют с соблюдением соответствующих правил безопасности.

Приложение Н (справочное)

Данные эффективности

Было проведено несколько испытаний для определения характеристик эффективности процедуры, установленной в настоящем стандарте (см. раздел 8). Результаты внутрилабораторного исследования и трех межлабораторных исследований обобщены в таблице Н.1 и таблице Н.2. Во внутрилабораторном исследовании, которое проходило в лаборатории Vitens в Леувардене (Нидерланды), были определены параметры эффективности, такие как диапазон количественного определения, надежность времени инкубации, неопределенность подсчета, прецизионность, идентификация (категориальные характеристики эффективности) и выделение. Данные приведены в таблице Н.1.

Пробы, использованные для определения характеристик эффективности, в основном представляют собой питьевую воду и воду, полученную из башенных испарительных градирен. Данные для определения характеристик эффективности были собраны в соответствии с ISO 13843 [1]. Процедуры идентификации демонстрируют высокую чувствительность, специфичность, избирательность и эффективность, с низкими ложноположительными и ложноотрицательными показателями. Данные характеристики эффективности были получены в лаборатории, которая имеет высокий уровень опыта в определении видов *Legionella* в образцах воды. Может потребоваться, чтобы лаборатории выполнили свою собственную повторную валидацию, чтобы определить свои собственные характеристики эффективности.

Надежность времени инкубации оценивали с использованием 147 подсчетов, полученных после 7 сут и 10 сут инкубации, из трех разных лабораторий. Поскольку определение надежности основано на данных межлабораторного исследования, они могут не быть репрезентативными для не искусственно созданных образцов, в которые не добавлены штаммы *Legionella*.

Для расчета выделения использовались три разных вида *Legionella* (*L. anisa*, *L. gormanii* и *L. pneumophila*) и четыре разные питательные среды. Агар BCYE использовали в качестве неселективной питательной среды, а в качестве селективных питательных сред использовали агар BCYE + AB, агар GVPC и агар MWY. Наименьшее среднее выделение было выявлено у *L. gormanii* на агаре GVPC (64 %).

В марте 2015 г. было проведено межлабораторное исследование с 27 лабораториями из 10 стран (Австрия, Кипр, Финляндия, Германия, Италия, Нидерланды, Испания, Швейцария, Соединенное Королевство, США) для изучения прецизионности метода. В пробы, использованные в межлабораторных исследованиях, были введены разные виды *Legionella* и различные концентрации нецелевых микроорганизмов. Пробы были проанализированы с использованием прямого посева, мембранной фильтрации с прямым размещением мембранного фильтра на питательных средах, мембранной фильтрации с последующей процедурой промывки и посева после разведения пробы. Кроме того, при необходимости, проводились различные предварительные обработки пробы. Питательные среды были предоставлены всем участникам, и в связи с этим использовались одни и те же партии питательных сред.

В связи с изменениями в обработке раствором кислоты, используемой в качестве этапа предварительной обработки при анализе *Legionella*, второе межлабораторное исследование было проведено в июне 2015 г. В этом межлабораторном исследовании участвовали 8 лабораторий из 3 стран (Австрия, Германия, Нидерланды). В пробы, использованные в межлабораторном исследовании, были введены разные виды *Legionella* и различные концентрации нецелевых микроорганизмов. Пробы были проанализированы с использованием мембранной фильтрации с прямым размещением мембранного фильтра на питательных средах, мембранной фильтрации с последующей процедурой промывки и посева после разведения пробы. Кроме того, при необходимости, проводились различные предварительные обработки пробы.

Повторяемость второго межлабораторного исследования варьировалась в диапазоне от 18,0 % до 29,5 % по сравнению с диапазоном от 30,1 % до 35,3 %, полученным в первом исследовании. Эффективность воспроизводимости была лучше во втором межлабораторном исследовании. Воспроизводимость во втором исследовании варьировалась от 46,0 % до 54,0 % по сравнению с 56,4 % до 78,5 % в первом межлабораторном исследовании, что может быть связано с меньшим количеством участников и более короткими расстояниями транспортирования проб во втором исследовании.

Третье межлабораторное исследование было необходимо для расчета характеристик эффективности метода с использованием мембранной фильтрации с прямым размещением мембранного фильтра на питательных средах. В этом межлабораторном исследовании, которое было проведено в июне 2016 г., участвовали 10 лабораторий из 4 стран (Австрия, Германия, Нидерланды, Соединенное Королевство). В две пробы, использованные в этом межлабораторном исследовании, были введены различные виды *Legionella*. Пробы были проанализированы с использованием мембранной фильтрации с непосредственным размещением мембранного фильтра на питательных средах. При необходимости проводили предварительную обработку пробы раствором кислоты.

В третьем межлабораторном исследовании для пробы с введенной *L. pneumophila* повторяемость составила 51,1 %, а воспроизводимость составила 65,9 %. Другая проба, содержащая *L. anisa*, не показала роста на мембранном фильтре в 7 лабораториях. Наблюдался рост в 3 лабораториях с максимальной концентрацией 900 КОЕ/л. Одна из лабораторий также провела метод прямого посева для этой пробы. Концентрация, найденная методом прямого посева, составляла 36 000 КОЕ/л, что свидетельствует о том, что в этом случае мембранный фильтр сильно повлиял на рост *L. anisa* на мембранном фильтре.

Данные представлены в таблице Н.1 и таблице Н.2.

ГОСТ ISO 11731

(проект, ВУ, первая редакция)

Таблица Н.1 – Параметры характеристик эффективности внутрилабораторного исследования

Внутрилабораторное исследование		
Диапазон количественного определения	<ul style="list-style-type: none"> - Одноштаммовый без нецелевых микроорганизмов между 10 КОЕ/чашка и 300 КОЕ/чашка. - Подсчеты, включая нецелевые микроорганизмы от 10 КОЕ/чашка до 150 КОЕ/чашка. - Для способа мембранной фильтрации с непосредственным размещением мембранного фильтра на чашке от 10 КОЕ/чашка до 80 КОЕ/чашка. - Всегда следует учитывать, что рост других микроорганизмов на питательных средах для <i>Legionella</i> может сильно влиять на рост <i>Legionella</i> и что диапазон количественного определения должен быть адаптирован к конкретной ситуации. 	
Надежность времени инкубации ^a	Никакой существенной разницы в подсчетах между 7 и 10 сут инкубации (n = 147).	
Надежность метода с использованием способа прямой мембранной фильтрации	Мембранные фильтры, используемые для метода размещения мембранного фильтра непосредственно на питательной среде, оказывают значительное влияние на выделение <i>Legionella</i> .	
Неопределенность подсчета (относительное стандартное отклонение (RSD))		
Повторяемость (в лаборатории)	4,10 %	
Воспроизводимость (в лаборатории)	5,40 %	
Прецизионность (RSD) — прямой посев		
Повторяемость (в лаборатории)	4,15 %	
Воспроизводимость (в лаборатории)	8,23 %	
Прецизионность (RSD) — мембранный фильтр на чашке		
Повторяемость (в лаборатории)	5,09 %	
Воспроизводимость (в лаборатории)	11,86 %	
Прецизионность (RSD) — мембранная фильтрация с процедурой промывки		
Повторяемость (в лаборатории)	6,04 % ^b	
Воспроизводимость (в лаборатории)		
Идентификация (категориальные характеристики эффективности) (n = 1 067) ^c	Подтверждение путем пересева на агаре BCYE и агаре BCYE-cys	Подтверждение с помощью ПЦР
Чувствительность	99,0 %	98,6 %
Специфичность	95,3 %	97,5 %
Ложноположительная норма	3,3 %	1,8 %
Ложноотрицательная норма	1,4 %	2,1 %
Избирательность	57,2 %	58,1 %
Эффективности	97,5 %	98,1 %
Выделение	> 64 %	
^a Из межлабораторного исследования.		
^b Среднее относительное рабочее стандартное отклонение в условиях внутрилабораторной воспроизводимости, наблюдаемое в процессе определения характеристик, существенно не отличалось от нуля (идеальный случай).		
^c Характеристики эффективности идентификации также были рассчитаны на основе подтверждения ПЦР. Помимо подтверждения подозрительных колоний путем пересева на агаре BCYE и агаре BCYE-cys, данные колонии также были подтверждены аттестованным методом ПЦР по ISO / IEC 17025 [2]. Небольшие различия в идентификации были вызваны целевыми и нецелевыми колониями, которые перерастали друг друга.		

Т а б л и ц а Н . 2 - Параметры характеристик эффективности межлабораторного исследования

Межлабораторное исследование	
Прецизионность (RSD) — прямой посев, низкая концентрация нецелевых микроорганизмов (см. 8.4.2) (n = 24)	
<i>Повторяемость</i>	35,3 %
<i>Воспроизводимость</i>	56,4 %
Прецизионность (RSD) — мембранный фильтр на чашке, низкая концентрация нецелевых микроорганизмов (см. 8.4.3.1) (n = 10)	
<i>Повторяемость</i>	51,1 %
<i>Воспроизводимость</i>	65,9 %
Прецизионность (RSD) — мембранная фильтрация с процедурой промывки, низкая концентрация нецелевых микроорганизмов (см. 8.4.3.2) (n = 14)	
<i>Повторяемость</i>	22,5 %
<i>Воспроизводимость</i>	49,5 %
Прецизионность (RSD) — прямой посев и посев после разведения, высокая концентрация нецелевых микроорганизмов (см. 8.4.4) (n = 16)	
<i>Повторяемость</i>	29,5 %
<i>Воспроизводимость</i>	54,0 %
Прецизионность (RSD) — мембранная фильтрация с процедурой промывки, высокая концентрация нецелевых микроорганизмов (см. 8.4.4) (n = 74)	
<i>Повторяемость</i>	30,1 %
<i>Воспроизводимость</i>	78,5 %
Прецизионность (RSD) — прямой посев и посев после разведения, чрезвычайно высокая концентрация нецелевых микроорганизмов (см. 8.4.5) (n = 8)	
<i>Повторяемость</i>	18,0 %
<i>Воспроизводимость</i>	46,0 %

**Приложение I
(справочное)**

Предварительная обработка сред, связанных с водой

Среды, связанные с водой, включают, например, смывы, отложения, биопленки, фильтрующий материал из фильтров для очистки воды (песок, гранулированный активированный уголь и т.д.).

Предварительная обработка пробы сред, связанных с водой, зависит от типа пробы. В настоящем приложении приводятся примеры широко используемых связанных с водой сред.

Пример 1 – Смывы: Для полуколичественного анализа ватным тампоном берут смыв с определенной зоны (например, приблизительно $10 \text{ см} \times 10 \text{ см} = 100 \text{ см}^2$). Ватный тампон переносят в пробирку с соответствующим разбавителем. Следует убедиться, что ватный тампон полностью погружен в разбавитель. Тщательно перемешивают с помощью вихревого смесителя или с помощью ультразвуковой водяной бани в течение 2 мин. Затем суспензию далее используют в процедуре для сред, связанных с водой. Результаты могут быть выражены как число на 100 см^2 . Если площадь, с которой взят смыв, не известна, например, в случае неправильной поверхности, то записывают число на тампон.

Пример 2 – Отложения или другой твердый материал: Асептически переносят от 0,1 до 10,0 г материала в пробирку с объемом соответствующего разбавителя в миллилитрах, в девять раз большим значения массы в граммах (например, от 0,9 до 90,0 мл). Тщательно перемешивают с помощью вихревого смесителя или с помощью ультразвуковой водяной бани в течение 2 мин. Затем суспензию далее используют в процедуре для сред, связанных с водой.

Приложение J (справочное)

Матрица принятия решений

Выбор метода, используемого для перечисления видов *Legionella*, зависит от происхождения/характеристик пробы и причины отбора проб или исследования. Важную роль в выборе наиболее подходящего метода играет необходимый нижний предел обнаружения для пробы.

В матрице принятия решений (см. рисунок J.1) кратко представлены все возможные типы воды (пробы), методы, обработки и питательные среды. В разделе 8 и тексте настоящего приложения содержится дополнительная справочная информация. Должны быть выполнены следующие шаги (в таблице J.3 приведены примеры).

Первый шаг – определить происхождение и характеристики пробы. В большинстве случаев эта информация может быть получена от клиента. Выбирают хотя бы одну из следующих возможностей:

- вода с ожидаемой низкой концентрацией нецелевых микроорганизмов, например, питьевая вода:

- и ожидаемой высокой концентрацией видов *Legionella* → проба анализируется по процедуре, описанной в 8.4.2;

- и ожидаемой низкой концентрацией видов *Legionella* → проба анализируется по одной из процедур, описанных в 8.4.3.

- вода с ожидаемой высокой концентрацией нецелевых микроорганизмов, например, вода из башенной испарительной градирни, технологическая вода, вода из камер с аппаратами для очистки воздуха, вода из стоматологических установок → проба анализируется по процедуре, описанной в 8.4.4.

- вода с ожидаемой чрезвычайно высокой концентрацией нецелевых микроорганизмов или микроорганизмов, которые будут удалены из проб только комбинированной обработкой теплом/раствором кислоты, например, сточные воды, поверхностные воды → проба анализируется по процедуре, описанной в 8.4.5.

Второй шаг – определить необходимый нижний предел обнаружения и выбрать один или несколько методов. Примеры нижнего предела обнаружения для каждого метода приведены в таблице J.1. Следует иметь в виду, что разные методы имеют преимущества и недостатки (см. таблицу J.2).

Третий шаг – выбор необходимой обработки. Помимо необходимой обработки, может быть проведена дополнительная обработка.

Четвертый шаг – выбор требуемой питательной среды. Помимо необходимой питательной среды могут использоваться дополнительные питательные среды.

ГОСТ ISO 11731

(проект, ВУ, первая редакция)

Таблица J.1 – Нижний предел обнаружения для метода

Прямой посев (см. 8.4.2)	Мембранный фильтр на чашке (см. 8.4.3.1)
$C_s = \frac{a}{V_{tot}} \times V_s$ <p>где C_s – количество <i>Legionella</i>, КОЕ/л; a – количество рассчитанных подтвержденных колоний <i>Legionella</i> $a = \frac{\text{подтвержденная положительная доля}}{\text{общая подтверждена доля}} \times \text{общее количество};$ V_{tot} – общий объем анализируемой пробы, мл; V_s – референтный объем, выбранный для выражения концентрации микроорганизмов в пробе (обычно 1000 мл). Пример предела обнаружения: в случае 0,1 мл пробы, предел обнаружения составляет 10 000 КОЕ/л</p>	$C_s = \frac{a}{V_{tot}} \times V_s$ <p>где C_s – количество <i>Legionella</i>, КОЕ/л; a – количество рассчитанных подтвержденных колоний <i>Legionella</i> $a = \frac{\text{подтвержденная положительная доля}}{\text{общая подтверждена доля}} \times \text{общее количество};$ V_{tot} – общий объем анализируемой пробы, мл; V_s – референтный объем, выбранный для выражения концентрации микроорганизмов в пробе (обычно 1000 мл). Пример предела обнаружения: в случае 10 мл отфильтрованной пробы, предел обнаружения составляет 100 КОЕ/л</p>
Мембранная фильтрация с процедурой промывки (см. 8.4.3.2)	Посев после разведения (см. 8.4.4 и 8.4.5)
$C_s = \frac{a \times V_c}{V \times V_{tot}} \times V_s$ <p>где C_s – количество <i>Legionella</i>, КОЕ/л; a – количество рассчитанных подтвержденных колоний <i>Legionella</i> $a = \frac{\text{подтвержденная положительная доля}}{\text{общая подтверждена доля}} \times \text{общее количество};$ V_c – объем пробы (концентрированной), мл; V – объем пробы, инокулированный на чашку или набор чашек (с той же питательной средой), мл; V_{tot} – общий объем анализируемой пробы, мл; V_s – референтный объем, выбранный для выражения концентрации микроорганизмов в пробе (обычно 1000 мл). Пример предела обнаружения: в случае 500 мл отфильтрованной пробы, промытой в 5 мл воды и инокулирования 0,1 мл, предел обнаружения составляет 100 КОЕ/л.</p> <p>Если наблюдается чрезмерно быстрый рост на «термически обработанных» и «необработанных» чашках, а на чашке «обработанной раствором кислоты» нет ни какого обнаружения <i>Legionella</i>, то примерный предел обнаружения увеличивается в 10 раз.</p>	$C_s = \frac{a \times V_s}{V_{dil}} \times Df$ <p>где C_s – количество <i>Legionella</i>, в КОЕ/л; a – количество рассчитанных подтвержденных колоний <i>Legionella</i> $a = \frac{\text{подтвержденная положительная доля}}{\text{общая подтверждена доля}} \times \text{общее количество};$ V_s – референтный объем, выбранный для выражения концентрации микроорганизмов в пробе (обычно 1000 мл). V_{dil} – объем разведенной пробы, инокулированный на чашку или набор чашек (с той же питательной средой), мл; Df – коэффициент разведения. Пример предела обнаружения: 1 мл нагретой пробы, обработанной 9 мл раствором кислоты. В случае 10-кратного разведения и инокулирования 0,1 мл обработанной пробы, предел обнаружения составляет 1 000 000 КОЕ/л.</p> <p>Если наблюдается чрезмерно быстрый рост на «термически обработанных» и «необработанных» чашках, а на чашке «обработанной раствором кислоты», нет ни какого обнаружения <i>Legionella</i>, то примерный предел обнаружения увеличивается в 10 раз.</p>

Т а б л и ц а J . 2 – Преимущества и недостатки различных методов

Метод	Преимущества	Недостатки
Прямой посев	Легко подсчитывать Хорошее выделение	Высокий предел обнаружения
Мембранный фильтр на чашке	Легкий метод Низкий предел обнаружения	Трудно подсчитать (из-за чрезмерного роста микроорганизмов). Влияние мембранного фильтра
Мембранная фильтрация с процедурой промывки	Легко подсчитывать Низкий предел обнаружения	Более низкое выделение (по сравнению с методом прямого посева и методом мембранного фильтра на чашке). Кропотливый
Посев после разведения	Легко подсчитывать Хорошее выделение	Высокий предел обнаружения. Кропотливый

ГОСТ ISO 11731

(проект, ВУ, первая редакция)

			Этап 1								
			Вода или вода, полученная из сред, связанных с водой, например смывы, взятые ватным тампоном, биопленки, отложения								
			Матрица А			Матрица В			Матрица С		
			Вода с низкой концентрацией (см. 8.4.2 и 8.4.3) Например, питьевая вода			Вода с высокой концентрацией (см. 8.4.4) Например, вода из башенной испарительной градирни, технологическая вода, вода из камер воздухоочистителя, вода из стоматологических установок			Вода с чрезвычайно высокой концентрацией ^а (см. 8.4.5) Например, сточная вода, поверхностная вода		
			Этап 4								
			Питательные среды								
Этап 2	Этап 3	Процедура	А	В	С	А	В	С	А	В	С
Прямой посев	Без обработки	1	R	R	O		O	R			
	Термическая обработка	2	O	O	O		O	R			
	Обработка раствором кислоты	3	O	O	O		O	R			
	Комбинированная обработка теплом и раствором кислоты	4					O	O		O	R
Мембранный фильтр на чашке	Без обработки	5	R	O	O						
	Термическая обработка	6	O	O	O		O	O			
	Обработка раствором кислоты	7	O	R ^b			O	O			
Мембранная фильтрация с процедурой промывки	Без обработки	8	R	R ^b			O	R			
	Термическая обработка	9	R	R ^b			O	R			
	Обработка раствором кислоты	10	R	R ^b			O	R			
Посев после разведения	Без обработки	11	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c			
	Термическая обработка	12	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c			
	Обработка раствором кислоты	13	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c			
	Комбинированная обработка теплом и раствором кислоты	14					O ^c	O ^c		O ^d	R ^d
Питательные среды А: агар BCYE (см.В.1) В: Селективная питательная среда (агар BCYE + AB) (см.В.3) С: Высокоселективные питательные среды (агар GVPC или агар MWY) (см. В.4 или В.5).											
Обозначение R: требуется O: необязательно											
^а Для данного типа воды требуются оба метода (прямого посева и посева после разведения) ^б Выбор питательной среды В или С ^с с разведением 1:10 ^д с разведением 1:10 и 1:100 Примечание 1 – Для разных матриц, приведенных выше, описаны несколько примеров (например, для питьевой воды). Возможно, основываясь на опыте лаборатории, примеры могут быть приведены для другой матрицы с использованием одного или нескольких методов предварительной обработки. Примечание 2 – Для разных матриц, приведенных выше, используется более короткое выражение: «вода с низкой концентрацией» (= ожидаемая низкая концентрация нецелевых микроорганизмов), «вода с высокой концентрацией» (= ожидаемая высокая концентрация нецелевых микроорганизмов) и «вода с чрезвычайно высокой концентрацией» (= ожидаемая чрезвычайно высокая концентрация нецелевых микроорганизмов). Примечание 3 – Ячейки, выделенные «серым цветом», могут использоваться для более подробного отчета, в следующем виде: ссылка на настоящий стандарт (матрица А, процедура 1, питательные среды А и В).											

Рисунок J.1 – Матрица принятия решений

Т а б л и ц а J . 3 – Четыре примера для иллюстрации матрицы принятия решений

Пример 1	
Этап 1: Определяют происхождение и ожидаемые характеристики пробы и выбирают один из типов воды из двух верхних рядов в матрице принятия решений.	Образец 1: Вода с низкой концентрацией нецелевых микроорганизмов и высокой концентрацией видов <i>Legionella</i>
Этап 2: Выбирают один из методов из первого столбца, исходя из необходимого нижнего предела обнаружения и с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Метод: Прямой посев
Этап 3: Выбирают обработку с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Обработка: Без обработки Дополнительная обработка (дополнительно, при желании): Термическая обработка и/или обработка раствором кислоты
Этап 4: Выбирают питательные среды с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Необходимые питательные среды: Агар BCYE и агар BCYE + AB. Дополнительная среда (дополнительно, при желании): Агар GVPC или агар MWY
Представление подробного отчета в случае примера 1	Ссылка на настоящий стандарт (матрица А, процедура 1, питательные среды А и В)
Пример 2	
Этап 1: Определяют происхождение и ожидаемые характеристики пробы и выбирают один из типов воды из двух верхних рядов в матрице принятия решений.	Образец 1: Вода с низкой концентрацией нецелевых микроорганизмов и высокой концентрацией видов <i>Legionella</i>
Этап 2: Выбирают один из методов из первого столбца, исходя из необходимого нижнего предела обнаружения и с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Метод: Мембранный фильтр на чашке
Этап 3: Выбирают обработку с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Обработка: Без обработки и обработка раствором кислоты
Этап 4: Выбирают питательные среды с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Необходимые питательные среды: Агар BCYE для пробы без обработки и выбор между агаром BCYE + AB или агаром GVPC или агаром MWY для обработанного раствором кислоты отфильтрованного образца
Представление подробного отчета в случае примера 2	Ссылка на настоящий стандарт (матрица А, процедура 5 (среда А) и процедура 7 (среда С – MWY))
Пример 3	
Этап 1: Определяют происхождение и ожидаемые характеристики пробы и выбирают один из типов воды из двух верхних рядов в матрице принятия решений.	Образец 1: Вода с высокой концентрацией нецелевых микроорганизмов
Этап 2: Выбирают один из методов из первого столбца, исходя из необходимого нижнего предела обнаружения и с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Метод: Мембранная фильтрация с процедурой промывки
Этап 3: Выбирают обработку с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Обработка: Без обработки, термическая обработка и обработка раствором кислоты
Этап 4: Выбирают питательные среды с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Необходимые среды: Агар GVPC или агар MWY Дополнительная среда (дополнительно, при желании): Агар BCYE + AB.
Представление подробного отчета в случае примера 3	Ссылка на настоящий стандарт [Матрица В: Процедура 8, 9 и 10 (среда С – GVPC)]

ГОСТ ISO 11731

(проект, ВУ, первая редакция)

Окончание таблицы J.3

Пример 4	
Этап 1: Определяют происхождение и ожидаемые характеристики пробы и выбирают один из типов воды из двух верхних рядов в матрице принятия решений.	Образец 1: Вода с чрезвычайно высокой концентрацией нецелевых микроорганизмов
Этап 2: Выбирают один из методов из первого столбца, исходя из необходимого нижнего предела обнаружения и с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Метод: Прямой посев и посев после разведения
Этап 3: Выбирают обработку с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Обработка: Комбинированная обработка теплом и раствором кислоты
Этап 4: Выбирают питательные среды с учетом сведений, указанных в матрице принятия решений.	Требуемая среда: Агар GVPC или агар MWY Дополнительная среда (дополнительно, при желании): Агар BCYE + AB.
Представление подробного отчета в случае примера 4	Ссылка на настоящий стандарт (матрица С, процедуры 4 и 14 (среда С – MWY))

Приложение ДА
(справочное)

**Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов
межгосударственным стандартам**

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 3696	IDT	ГОСТ ISO 3696—2013 «Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля»
ISO 7704	—	*
ISO 8199	—	*
ISO 11133	IDT	ГОСТ ISO 11133—2016 «Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред»
ISO 19458	MOD	ГОСТ 31942—2012 (ISO 19458:2006) «Вода. Отбор проб для микробиологического анализа»
<p>*Соответствующие межгосударственные стандарты отсутствуют. До их принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык международных стандартов. Официальные переводы данных международных стандартов находятся в Национальном Фонде технических нормативных правовых актов Республики Беларусь.</p> <p>Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов:</p> <ul style="list-style-type: none"> - IDT — идентичные стандарты; - MOD — модифицированные стандарты. 		

Библиография

- [1] ISO 13843 Water quality — Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods (Качество воды. Требования к установлению характеристик выполнения количественных микробиологических методов)
- [2] ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)
- [3] Bopp C.A. et al. Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. J. Clin. Microbiol. April 1981, 13 (4), pp. 714–719 (Выделение *Legionella* spp. от образцов окружающей среды путем обработки раствором с низким рН и использования селективной среды)
- [4] Dennis P.J. et al. Comparison of isolation methods for *Legionella* spp. Legionella, Proceedings of the 2nd International Symposium. American Society for Microbiology, 1984. pp. 294–296 (Сравнение методов выделения для *Legionella* spp.)
- [5] Ditommaso S . Recovery of *Legionella* species from water samples using an internal method based on ISO 11731: suggestions for revision and implementation. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2011, 70 pp. 200–206 (Выделение видов *Legionella* из образцов воды с использованием внутреннего метода на основе ISO 11731: предложения по пересмотру и реализации)
- [6] Smith L. Comparison of membrane filters for recovery of legionellae from water samples. Appl. Environ. Microbiol. January 1993, 59 (1), pp. 344–346 (Сравнение мембранных фильтров для выделения *Legionella* из образцов воды)
- [7] Wadowsky R.M., & Yee R.B. Glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. Appl. Environ. Microbiol. November 1981, 42 (5), pp. 768–772 (Глицинсодержащая селективная среда для выделения *Legionellaceae* из образцов окружающей среды)

УДК

МКС 07.100.20

IDT

Ключевые слова: качество воды, подсчет бактерий *Legionella*

Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

Директор


И.И.Осмола

Заместитель директора
по техническому нормированию,
стандартизации и информатизации


А.Г.Скуратов

Начальник отдела
технического нормирования
и стандартизации пищевой
и сельскохозяйственной продукции


Л.М.Скорина

Начальник сектора
отдела технического нормирования
и стандартизации пищевой
и сельскохозяйственной продукции


К.А.Родригес

Ведущий инженер
отдела технического нормирования
и стандартизации пищевой
и сельскохозяйственной продукции


Н.Ю.Кищук