

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
МИНИСТЕРСТВО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА СССР**
Государственный ордена "Знак Почета" научно-
исследовательский и проектно-конструкторский
институт по развитию и эксплуатации флота
(ГИПРОРЫБФЛОТ)

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО КОНТРОЛЮ
В РЫБНЫХ ПРОДУКТАХ
ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ -
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПИЩЕВЫХ
ТОКСИКОИНФЕКЦИИ**

Ленинград
1991

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
МИНИСТЕРСТВО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА СССР
Государственный ордена "Знак Почета" научно-исследовательский
и проектно-конструкторский институт по развитию и эксплуатации
флота
(ГИПРОРЫБОЛОТ)

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель главного
Государственного санитарного
врача СССР А.М.Скляров
03.04.1991 г.
№ 5780-91

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
рыбного хозяйства СССР
Е.Д.Ширяев
17.11.1990 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО КОНТРОЛЮ
В РЫБНЫХ ПРОДУКТАХ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ
ВИБРИОНОВ - ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПИЩЕВЫХ
ТОКСИКОИНФЕКЦИЙ

Дата введения 01.11.91 г.

Ленинград
1991

Методические указания разработаны
институтом "Гипрорыбфлот":
А.С.Сазонова, И.И.Призренова, канд.биол.наук Р.М.Курдина,
Н.А.Щедрина

Институтом питания АМН СССР:
д-р биол.наук, зав. лабораторией санитарно-пищевой микро-
биологии и микрoэкологии, профессор И.Б.Куваева, ведущий
научный сотрудник, канд. мед. наук С.А.Шевелева

В В Е Д Е Н И Е

Галофильные параземолитические вибрионы широко распространены в морских бассейнах многих стран мира. Они обнаруживаются в морской воде, рыбе, беспозвоночных и планктоне. Встречаемость указанных микроорганизмов в гидробионтах зависит от сезона года, районов лова, загрязненности, температуры, солености воды и других факторов. Эпидемиологическая обстановка по параземолитическим вибрионам в районах лова ухудшается чаще в теплый период года.

Галофильные вибрионы активно размножаются при концентрации хлорида натрия в среде от 3 до 8%. Количество их в воде, морепродуктах может колебаться от единиц до сотен тысяч клеток в 1 г и более.

Галофильные параземолитические вибрионы относятся к группе потенциально патогенных микроорганизмов.

При попадании в организм человека с продуктами моря, особенно не подвергнутыми термической обработке, параземолитические вибрионы способны вызывать пищевые токсикоинфекции, протекающие по типу острых гастроинтеритов, в отдельных случаях носящих холероподобный характер. Доза инфекта — 10^6 и более жизнеспособных клеток в 1 г продукта вызывает заболевание.

При наличии эпидемиологической ситуации насущные указания предусматривают выявление параземолитических вибрионов в сырье: свежем, охлажденном, мороженом; в готовой продукции из рыбы и морских беспозвоночных: кулинарной, холодного и горячего копчения, соленой, пресервов, маринованной, вяленой, сушеной, белковых продуктах, икре, пресервах. Периодически сырье необходимо контролировать при экологическом неблагополучии водного бассейна региона лова.

Анализы по выявлению в рыбопродукции параземолитических вибрионов осуществляют учреждения государственного санитарного надзора, лаборатории научно-производственных рыбопромышленных объединений, лаборатории научно-исследовательских институтов рыбной промышленности на договорных началах.

В Методических указаниях представлены показатели допустимой обсемененности сырья и готовой продукции из рыбы и морских беспозвоночных, методы отбора проб, методики выявления и подсчета паразитических вибрионов, рецептура питательных сред, гигиеническая оценка пищевых рыбных продуктов, рекомендации, литература.

С изданием настоящих Методических указаний утрачивают силу Временные методические рекомендации по контролю за содержанием *V. parahaemolyticus* в рыбе и рыбопродуктах. Методы исследования и нормативы, № 3933-85, утв. Минздравом СССР 20.09.85.

I. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ НОРМАТИВЫ ДЛЯ ПАРАТЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ

Допустимое количество паратемолитических вибрионов в сырье (свежем, охлажденном, мороженом) не должно превышать 10 КОЕ/г.

Допускается присутствие вибрионов до 500 КОЕ/г при следующих направлениях сбыта на пищевые и промышленные предприятия: рыболовство, рыбные консервы, рыбная мука, рыбные продукты.

Паразитические вибрионы должны отсутствовать в сырье (рыба, икра, устрицы и др.), употребляемом в пищу в сыром виде в течение 2-х недель.

В сырье не допускается присутствие следующих микроорганизмов: туберкулезная палочка, дизентерийная, протейная, сибирская, менингококковая, чумная, брюшная, сальмонеллы, стафилококки, стрептококки, пневмококки, энтерококки, клостридии, бактерии группы кишечной палочки, дрожжи, плесневые грибки, грибы, паразитические простейшие, вирусы, микоплазмы, актиномицеты.

2. ОТБОР ПРОБ СЫРЬЯ И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ, ПЕЛЛЕТОВКА К АНАЛИЗУ

Отбор проб и pelletовку и анализ проводят в соответствии с ГОСТ 26666-85 и ГОСТ 26662-83, Пищевые и вкусовые продукты и Инструкции на санитарно-микробиологическому контролю производства продукции из рыбы и морепродуктов, ТРСТ.

Отбор проб для микробиологических исследований производится с соблюдением правил асептики стерильным ножом, скальпелем или пинцетом в стерильные банки или бумагу общей массой рыбы или продукцией около 200 г (крыш - 25 г).

Пробы от крупной рыбы: сельдь, хляквандной, мороженая, соленая, припой, маринаданной, сушеной, вяленой, копченой и крупных экзemplяров морских беспозвоночных отбирают не более 3-х штук. От каждого экзemplяра на нескольких мест вырезают кусочки с кожей и мышцами, у непотрошенных экзemplяров - дополнительно часть жабер и кишечника. Мелкую рыбу (3 - 10 шт.) из равных мест исследуемой партии берут целиком.

Пробу измельчают, берут навеску массой 25 г, гомогенизируют в размельчителе тканей или стерильной ступне с 2-3 г стерильного кварцевого песка.

При количественном определении паратемолитических вибрионов подготовленную навеску массой 25 г переносят в стерильную колбу, добавляют 225 см³ 0,1%-ного раствора пептонной воды с 3% хлорида

натрия. Полученное разведение тщательно взбалтывают, не допуская намокания пробки, и готовят последующие десятикратные разведения (1:100 и 1:1000), определенные объемы которых засевают на плотную среду.

Для выявления отсутствия-присутствия параземолитических вибрионов отбирают подготовленную навеску массой 25 г и переносят в 100 см³ жидкой среды обогащения (п.5.3).

3. МЕТОДЫ АНАЛИЗОВ

Методы основаны на выявлении типичных колонии, вырастающих на дифференциально-диагностическом агаре при посеве разведений продукта и установлении принадлежности бактерий к параземолитическим вибрионам по морфологическим и биохимическим свойствам.

При количественном учете параземолитических вибрионов из первого разведения производят посев по 0,2 см³ на 5 чашек с плотной дифференциально-диагностической средой - ДДА (п.5.4), т.е. высевают 0,1 г продукта; из разведения 1:100 высевают по 0,1 см³ на две параллельные чашки (0,001 г продукта на 1 чашку). Аналогично производят посев из разведения 1:1000 (0,0001 г продукта на 1 чашку). Посевной материал втирают досуха. Чашки инкубируют при температуре 37°C в течение 24 ч.

Для выявления отсутствия-присутствия параземолитических вибрионов пробу массой 25 г в 100 см³ среды обогащения термостатируют при температуре 37°C 18-24 ч. Затем производят пересев на ДДА таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний. Чашки инкубируют при температуре 37°C в течение 24 ч.

Учитывают рост типичных колоний: плосковыпуклые полупрозрачные колонии правильной округлой формы с ровными краями, влажной блестящей поверхностью, голубовато-зеленоватого цвета на аналогичном фоне среды.

Для подтверждения принадлежности выделенных на дифференциально-диагностических средах микроорганизмов к параземолитическим вибрионам проводят изучение их морфологических свойств, биохимическое тестирование при использовании специальных питательных сред или систем индикаторных бумажных (СИБ) для идентификации вибрионов.

С этой целью из изолированных колоний, характерных или подозрительных на параземолитические вибрионы, делают препараты, окрашивая по Граму, и микроскопируют.

Параземолитические вибрионы - грамтрицательные палочки, пря-

мые или слегка изогнутые (0,8-5,0 мк), не образующие спор, активно подвижные содержат цитохромоксидазу, не расщепляют лактозу и сахарозу, хорошо растут на питательных средах с содержанием хлорида натрия от 3 до 8%, декарбоксилируют лизин, образуют индол, ферментируют (без газообразования) арабинозу, глюкозу, мальтозу. При контроле сырья и рыбных продуктов достаточным будет перечень вышеуказанных специфических тестов для идентификации вибрионов.

В целях клинической диагностики или эпидемиологического расследования перечень тестов для идентификации выделенных параземолитических вибрионов будет намного расширен. В этих случаях исследования проводятся в соответствии с действующей Инструкцией о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях, № ИГЗ-73, Минздрав СССР.

Для идентификации выбранных бактерий делают пересев с ДДА на 1%-ную пептонную воду с 3% хлорида натрия (п.5.2). На пептонной воде параземолитические вибрионы дают помутнение с образованием нежной голубой пленки.

Тест подвижности

Подвижность определяют при микроскопировании с помощью фазово-контрастного микроскопа в раздавленной капле или при посеве уколом односуточной бульонной культуры в полужидкий агар (0,25% агара), содержащий 3% хлорида натрия. Посевы инкубируют при температуре 37⁰С в течение 24 ч. Подвижные формы образуют диффузное помутнение, слабоподвижные вырастают по ходу укола.

Тест на оксидазную активность

Для определения наличия цитохромоксидазы исследуемую односуточную культуру засевают на поверхность щелочного агара (РН 8,0), содержащего 3% хлорида натрия (п.5.5), термостатируют при температуре 37⁰С в течение 18 ч. Затем на выросшую в чашке культуру наносят 1 каплю реактива для определения цитохромоксидазы или делают штрих из колонии на фильтровальной бумаге, смоченной реактивом (п.5.13). Если оксидазный тест положительный, через 1-3 мин наблюдается окрашивание в ярко-синий цвет.

Наличие цитохромоксидазы является отличительным признаком от семейства кишечных палочек *Enterobacteriaceae*, которые не обладают оксидазной активностью.

Рост на лактозо-сахарозной среде

Отношение к лактозе и сахарозе определяют путем засева куль-

туры штрихом по скошенной поверхности и уколом в столбик среды, содержащей 3% хлорида натрия, лактозу, сахарозу и индикатор (п.5.7). Инкубируют при температуре 37°C в течение 18 ч. Парагемолитические вибрионы цвет среды не изменяют, газа не образуют.

Можно использовать среды Расселя, Клитгера. Парагемолитические вибрионы ферментируют глюкозу, не ферментируют лактозу, не образуют сероводород (наклонная поверхность столбика красная, столбик - желтый, газ и сероводород отсутствуют).

Галофильные свойства

Для определения галофильных свойств культуру засевают в 5 см³ 1%-ной пептонной воды (РН 7,8) без содержания и с содержанием 3, 8 и 10% хлорида натрия (п. 5.2). Посевы термостатируют при температуре 37°C в течение 24 ч. Парагемолитические вибрионы хорошо развиваются в средах, содержащих от 3 до 8% хлорида натрия, и не дают роста в средах, не содержащих хлорида натрия или содержащих 10% хлорида натрия.

Тест декарбоксилазной активности

Декарбоксилазную активность микроорганизмов определяют на среде ДАГВ с добавлением аминокислоты лизина (п.5.6). Для этого в две пробирки с этой средой засевают по 0,1-0,2 см³ односуточной бульонной культуры или по 2 петли агаровой культуры (одна пробирка с аминокислотой - лизином и вторая - контрольная).

После посева в каждую пробирку добавляют 0,5 см³ стерильного вазелинового масла и термостатируют 24 ч при температуре 37°C.

Если микроорганизмы вырабатывают декарбоксилазу к аминокислоте, то после окисления глюкозы происходит подщелачивание среды, и она приобретает фиолетовый оттенок. Если реакция отрицательная, среда становится желтой.

Для вибрионов характерно декарбоксилирование лизина.

Образование декарбоксилазы к лизину является отличительным признаком от образующих газ представителей рода *Aeromonas*, среди которых есть галофильные микроорганизмы.

Тест на образование индола

Для определения способности микроорганизмов образовывать индол в 5 см³ питательной среды (п.5.2) засевают 1 петлю односуточной бульонной культуры. Под пробку вставляют специально приготовленные бумажки на индол (п.5.14). Термостатируют 24 ч при 37°C. При росте парагемолитических вибрионов образуется индол, при этом

бумажка меняет цвет. При отрицательной реакции цвет бумажек на индол не изменяется.

Способность образования - ацетилметилкарбинола
(реакция Фогес - Проскауэра)

Способность образования ацетилметилкарбинола определяют путем посева односуточной культуры в бульон Кларка с 3% хлорида натрия (п.5.9). Посев инкубируют 24 ч при температуре 37°C. Затем к 1 см³ культуры добавляют 0,6 см³ α-нафтола (6%-ный раствор в абсолютном спирте) и 0,2 мл 40%-ного раствора едкого калия (КОН). Пробирку встряхивают и снова помещают в термостат на 1 ч при температуре 37°C. Так как парагемолитическо вибрионы не образуют ацетилметилкарбинола, цвет среды не изменяется.

Определение интенсивности кислотообразования
(реакция с метиловым красным индикатором)

Для определения интенсивности кислотообразования односуточную культуру засевают в среду Кларка с 3% хлорида натрия (п.5.9). Посев инкубируют при температуре 37°C в течение 24-48 ч. При наличии роста прибавляют 3-5 капель 0,02%-ного раствора индикатора метилового красного (п.5.12). Пробирку встряхивают и снова помещают в термостат на 1 ч при температуре 37°C. При сильном кислотообразовании получается красное окрашивание среды, при слабом - желтое.

Ферментация углеводов

Для определения ферментативной активности односуточную культуру засевают на среды Гисса с 3% хлорида натрия и с поплавками (п.5.10). Посевы инкубируют 18-24 ч при температуре 37°C.

При росте, сопровождающемся расщеплением углеводов с образованием кислых продуктов, цвет среды изменяется. С индикатором бромтимолблеу она приобретает желтый цвет, с индикатором Андрее - ярко-розовый. Если брожение сопровождается газообразованием, газ собирается в поплавках. Парагемолитические вибрионы ферментируют без образования газа арабинозу, мальтозу, глюкозу.

Для вибрионов характерно расщепление глюкозы с образованием кислоты без газа на среде Хью-Лейфсона как в аэробных, так и в анаэробных условиях (п.5.11). Определение типа расщепления глюкозы позволяет отличать вибрионы от сходных с ними по морфологии представителей рода *Pseudomonas* и *Comamonas*.

Для идентификации вибрионов можно использовать СИБ - системы индикаторные бумажные (п.5.15).

Ниже приведена схема бактериологического исследования на галофильные парагемолитические вибрионы. Характеристика свойств галофильных парагемолитических вибрионов и сходных с ними микроорганизмов приведена в таблице.

Схема бактериологического исследования на галофильные парагемолитические вибрионы

- | | |
|----------|---|
| 1-й день | I. Посев на ДДА из разведений или накопительной культуры. |
| 2-й день | I. Изучение роста на ДДА, подсчет и отсев подозрительных колоний на 1%-ную пептонную воду с 3% хлорида натрия. |
| 3-й день | I. Пересев с 1%-ной пептонной воды с 3% хлорида натрия на ДДА. |
| 4-й день | I. Изучение морфологии чистых культур с окраской по Граму
2. Определение подвижности.
3. Посев на желочной агар для определения оксидазной активности.
4. Посев на среду лактозо-сахарозную.
5. Посев на 1%-ную пептонную воду с различными концентрациями хлорида натрия (тест на галофильность).
6. Посев на среду ДАГВ для определения декарбоксилазной активности.
7. Посев на среды Гисса для определения ферментативной активности.
8. Посев на 1%-ную пептонную воду с 3% хлорида натрия для определения способности образования индола.
9. Посев на среду Кларка для определения способности образования ацетилметилкарбинола.
10. Посев на среду Кларка для определения интенсивности кислотообразования.
11. Посев на среду Хью-Лейфсона для определения типа расщепления глюкозы.
12. Постановка теста на оксидазу. |
| 5-й день | I. Оценка биохимической активности.
2. Окончательный ответ (при выделении со среды обогащения - на день позднее). |

Таблица

Сравнительная характеристика свойств галофильных парагемолитических вибрионов и сходных с ними микроорганизмов

Основные признаки	Микроорганизмы							
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Proteus</i>
Окраска по Граму	-	-	-	-	-	-	-	-
Подвижность	++	++	+++	+	+	+	+	++
Оксидаза	+	+	+	+	-	+	-	-
Рост при температуре 43°C	+	+	-	-	-	-	-	-
Рост в пептонной воде, содержащей								
0%	-	-	+	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	++	++	+	++
8%	+	+	-	-	-	-	-	-
10%	-	+	-	-	-	-	-	-
Индол	+	+	+	+(86%)	-	++	-	++
Сероводород	-	-	-	-	-	+	+	++
Разжижение желатина	+	+	+	+	-	++	-	++
Р-ция Фогес-Проскауэра	-	+	+	+(72%)	-	-	-	-
Р-ция с метил. красным индикатором	+	-	+	+(75%)	+	-	+	-
Декарбоксилазная активность								
аргинин	-	-	-	+	+	+	+	-
лизин	+	+	+	++	+	-	++	-
орнитин	+	+	+	-	+	-	+	++
Газ на среде с глюкозой	-	-	-	±	-	-	+	±
Расщепление углеводов и спиртов								
арабиноза	+(64%)	-	-	-(+)	-	-	++	-
глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+
инозит	-	-	-	-	+	-	++	-
ксилоза	-	-	-	-	-	++	++	++
лактоза	-	-	-	-	+	-	-	-
мальтоза	+	+	+	+	++	-	+	++
маннит	+	+	+	+	-	+	++	++
манноза	+	+	+	±	-	-	++	-
сахароза	-	+	+	+	-	+	++	++
сорбит	-	-	-	-	-	-	+	-
Гемолиз	-(+)	-	±	+				

4. РЕКОМЕНДАЦИИ

Гигиеническая оценка рыбных продуктов и мероприятия, снижающие риск для населения при употреблении продуктов, инфицированных галофильными парагемолитическими вибрионами, приводятся на основе их количественного содержания.

отсутствие роста вибрионов на всех пяти чашках посева из разведения 1:10 свидетельствует о том, что в 1 г продукта эти вибрионы отсутствуют или содержатся в количестве менее 10 жизнеспособных клеток. Продукт по этому показателю – высокого качества, реализуется без ограничений,

отсутствие роста типичных колоний на обеих чашках с посевом из разведения 1:100, но обнаружение на пяти чашках с посевом из разведения 1:10 10–50 колоний указывает, что в 1 г продукта содержится от 100 до 500 жизнеспособных клеток парагемолитических вибрионов. Такой продукт может быть рекомендован для использования на пищевые цели только с рядом ограничений (хранение при температуре минус 18–20°C в течение 1–3 мес, реализация этой продукции с расфасовкой и т.п.);

обнаружение значительного роста (50 КОЕ и более) при посеве из разведения 1:100 и наличие роста свыше 5–10 колоний на чашках с посевами из разведения 1:1000 свидетельствуют о массивном заражении продукта парагемолитическими вибрионами (свыше 5×10^4 КОЕ), что может представлять опасность для здоровья потребителя.

При таком уровне контаминации продукта парагемолитическими вибрионами (10^4 и выше на 1 г продукта) использование рыбной продукции непосредственно на пищевые цели не может быть рекомендовано.

В целях профилактики пищевых отравлений гигиенические мероприятия должны быть направлены:

на снижение и подавление размножения вибрионов в сырье и готовой продукции;

на удаление их из продуктов,

на предупреждение вторичного обсеменения.

Гидробиионты и продукты из них благодаря особенностям строения и состава мышечной ткани являются весьма благоприятной средой для развития микроорганизмов и нестойки в хранении. Особенно это касается свежей, охлажденной рыбы и нерыбных объектов морского промысла,

икры, кулинарных изделий, продуктов горячего копчения, которые являются особо скоропортящимися.

Необходимо учитывать, что паразитологические вибрионы устойчивы к низким температурам, хорошо сохраняются и быстро размножаются при повышении температуры. Изменения, происходящие в ткани рыбы при размораживании, благоприятствуют быстрому размножению микроорганизмов, поэтому важно мороженое сырье дефростировать без задержек.

Охлаждение, замораживание способствуют уменьшению активности тканевых ферментов рыбы и задержке развития микроорганизмов. При замораживании количество вымороженной воды увеличивается, тем самым уменьшение свободной воды тормозит развитие и даже губит бактериальные клетки. При замораживании рыбы увеличивается стойкость рыбы в хранении.

Для подавления роста и снижения уровня обсемененности паразитологическими вибрионами рыбного сырья, особенно морского промысла, следует его охладить (до 0°C), заморозить и хранить при температуре не выше минус 18°C. Замораживание останавливает размножение микроорганизмов, ведет к их отмиранию (в течение 3-х месяцев).

Губительно действуют на вибрионы крепкий посол (более 10% поваренной соли), маринование, термообработка, в т.ч. сушка. Галлофильные вибрионы выдерживают кипячение в течение 1 мин, при 80°C погибают по истечении 5 мин.

Можно сочетать тепловую обработку с добавлением консервантов, например, уксусной кислоты (0,3-0,6%), сорбиновой кислоты (0,2%).

Для предупреждения вторичного обсеменения готового продукта нельзя допускать контакта его с сырой рыбой в ходе технологического процесса производства, при транспортировке, хранении.

При неблагоприятной эпидемиологической обстановке оборудование необходимо подвергать тщательной санитарной обработке с обязательным использованием дезинфицирующих средств, таких как хлорамин (1,0-1,2%), моносодовая соль дихлоризоциануровой кислоты (0,1%), дихлордиметилгидантоин (0,1-0,2%). Время воздействия дезинфицирующих средств должно быть не менее 15 мин. Такие средства, как горчица, кальцинированная сода, "Прогресс" не эффективны для дезинфекции.

Санитарную обработку производят в соответствии с действующей Инструкцией по санитарной обработке технологического оборудования на рыбообрабатывающих предприятиях и судах.

5. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАЛОФИЛЬНЫХ ВИБРИОНОВ

5.1. Щелочная 0,1%-ная пептонная вода с 3% хлорида натрия (для определения присутствия или отсутствия вибрионов).

Пептон - 1,0 г

Натрия хлорид - 30,0 г

Вода дистиллированная - 1 дм³.

Все компоненты кипятят до полного их растворения, охлаждают до комнатной температуры и устанавливают pH 7,8-8,2. Среду разливают по 225 см³ во флаконы и по 10 см³ в пробирки, затем стерилизуют при температуре 121°C в течение 20 мин.

5.2. Щелочная 1%-ная пептонная вода, содержащая 0, 3, 8 и 10% хлорида натрия.

В 1%-ную пептонную воду добавляют требуемое количество хлорида натрия, устанавливают pH 8,0 (10%-ным раствором NaOH), фильтруют, разливают в пробирки по 5 см³, стерилизуют при температуре 121°C в течение 30 мин.

Срок хранения в холодильнике - 2 мес.

Щелочная пептонная вода с триптофаном.

Для определения индола к 1%-ной пептонной воде с 3% хлорида натрия добавляют 0,03% триптофана.

5.3. Щелочная пептонная вода с 3% хлорида натрия, жидкостью "Прогресс" и теллуридом калия (жидкая среда обогащения) для накопления галофильных вибрионов.

К 100 см³ стерильной 1%-ной пептонной воды, содержащей 3% хлорида натрия (pH 8,0), добавляют 0,2% жидкости "Прогресс" и 0,75 см³ рабочего разведения (1:1000) теллурида калия.

Срок хранения - 7-10 сут.

Рабочее разведение теллурида калия готовят следующим образом: 1 г сухого теллурида калия растворяют в 1 см³ стерильной дистиллированной воды. 0,1 см³ полученного раствора помещают в пробирку с 9,9 см³ стерильного физиологического раствора, перемешивают, получают разведение 1:100. К 0,1 см³ раствора (разведение 1:100) добавляют 0,9 см³ стерильного физиологического раствора. Получают рабочее разведение (1:1000) или к 5 см³ 2%-ного раствора теллурида калия добавляют до 100 см³ дистиллированной воды.

Срок хранения не более 48 ч.

Непосредственно перед употреблением или не ранее, чем за 48 ч к 100 см³ стерильной пептонной воды добавляют 0,75 см³ рабочего раз-

ведения (I:I000) теллурита калия до конечной концентрации I:I50000. Серии теллурита калия должны быть предварительно проверены и оттитрованы на культуре *V. parahaemolyticus* на отсутствие ингибиторного действия по отношению к вибриону.

Примечание. Можно использовать среду обогащения без добавления теллурита калия, бромтимолового синего индикатора, жидкости "Прогресс", пенициллина.

5.4. Среда ДДА (дифференциально-диагностический агар) для выделения галофильных вибрионов.

Рыбо- или мясопептонный агар	1 дм ³
2%-ный щелочной	
Натрия хлорид	70 г
Сахарова	15 г
Пенициллин	5000 ед.
Жидкость "Прогресс"	2 см ³
Бромтимоловый синий 1,6%-ный спиртовой раствор	10 см ³
Калия теллурит (I:I000) ($K_2TeO_3 \cdot H_2O$)	7,5 см ³

В расплавленном стерильном рыбо- или мясопептонном агаре (РН 8,0), охлажденном до 50°C, растворяют все необходимые ингредиенты. Не стерилизуя, разливают в чашки Петри. Среда имеет темный сине-зеленый цвет. Срок хранения в холодильнике - 7-10 сут.

5.5. Щелочной агар с 3% хлорида натрия (ЩРПА).

К 1 дм³ рыбо- или мясопептонного агара добавляют 30 г хлорида натрия и 30 см³ 10%-ного раствора карбоната натрия, кипятят 45 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют при температуре 121°C в течение 20 мин. Среда должна иметь РН 7,8-8,0. Срок хранения - 3 мес в холодильнике.

Щелочной агар из сухого препарата. Способ приготовления дается на этикетке.

5.6. Среда ДЛГВ

Лептон	5,0 г
Натрия хлорид	30,0 г
Глюкоза	0,5 г
или 40%-ный раствор	1 см ³
Витамин В ₆ , 5%-ный раствор	0,1 см ³
Бромкрезолпурпур 1,6%-ный спиртовой раствор	1 см ³
дистиллированная вода	1 дм ³

Готовят среду, устанавливают pH 7,8 и разливают во флаконы. В один добавляют 1% L-лизина. Среда - без аминокислот служит контролем. Готовую среду разливают в пробирки по 2 см³ и стерилизуют при температуре 121°C в течение 15 мин.

5.7. Лактово-сахарозная среда.

Пептон	5,0 г
Агар-агар	10,0 г
Цитрат железа	5,0 г
Лактоза	10,0 г
Сахароза	1,0 г
Индикатор Андрее	40 мг
Вода дистиллированная	1 дм ³

Готовят среду, устанавливают pH 7,2-7,4 и разливают по 5-7 мл в стерильные пробирки и стерилизуют при температуре 121°C в течение 15 мин. Перед посевом ферментации добавляют 0,5 мл 1% раствора индикатора Андрее. Среда сырая; при микротождествовании = красная;

0,8. Среды Клиффа, Ревелла (из ФУДРК препарата);

0,9. Среда Кларка

Пептон	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
Калий дифторфосфат дву- ваможенный (K ₂ HPO ₄)	5,0 г
Вода дистиллированная	1 дм ³
Натрий хлорид	30,0 г
pH 7,5-7,8	

Растворяют все ингредиенты в 900 см³ дистиллированной воды, доводят объем до 1 дм³, фильтруют. Устанавливают pH и разливают по 5 см³ в пробирки. Стерилизуют при температуре 121°C в течение 15 мин.

5.10. Среды Гисса (для определения ферментативной активности).

В 100 см³ 1%-ной пептонной воды растворяют 3 г хлорида натрия и 1 г испытуемого углерода. Устанавливают pH 7,4-7,6, добавляют 1 см³ индикатора Андрее. Среда разливают по 5 см³ в пробирки с поплавками. Стерилизуют при температуре 121°C в течение 20 мин.

Индикатор Андрее

В 100 см³ дистиллированной воды растворяют 0,5 г кислого фуксина, прибавляют 16,4 см³ 1 N раствора гидроксида натрия. Купля-

тят при температуре 100°C в течение 5 мин. Хранят во флаконах из темного стекла с притертой пробкой. Индикатор должен иметь соломенно-желтый цвет.

Среды Гисса (из сухих препаратов с индикатором ВР)

Способ приготовления дается на этикетке.

В приготовленную среду добавляют необходимое количество хлорида натрия.

5.11. Среда Хью-Лейфсона.

Пептон	2,0 г
Натрия хлорид	30,0 г
Калий фосфорнокислый двузамещенный (K_2HPO_4)	0,3 г
Глюкоза	10,0 г
Вода дистиллированная	1 дм ³
Бромтимоловый синий 1%-ный водный раствор	3,0 см ³

Готовят среду, устанавливая pH 8,0, разливают в пробирки по 3 и 10 см³, стерилизуют при температуре 112,5°C в течение 20 мин.

5.12. Раствор индикатора метилового красного.

0,04 г метилового красного индикатора растворяют в 40 см³ 96%-ного этилового спирта, добавляют 60 см³ дистиллированной воды.

5.13. Реактив для определения цитохромоксидазы.

Реактив готовят согласно ГОСТ 18963-73. Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа.

5.14. Приготовление индикаторных бумажек на индол.

Парадиметиламинобензальдегид	3-5 г
Этиловый спирт 96%-ный	50 см ³
Фосфорная кислота (H_3PO_4), очищенная концентрированная	10 см ³

Все ингредиенты смешивают и растворяют в фарфоровой ступке. Полученной тепловатой жидкостью смачивают полоски фильтровальной бумаги, высушивают и нарезают узкими полосками. Бумажки имеют желтый цвет. При наличии индола цвет бумажки меняется от сиренево-розового до интенсивного малинового.

По Морелю.

Полоски фильтровальной бумаги пропитывают в насыщенном водном

растворе щавелевой кислоты и высушивают в термостате.

Бумажки, имеют белый цвет. При наличии индола бумажки приобретают сиреневый или малиновый цвет. Хранят до 1 года в склянке с притертой крышкой.

5.15. Системы индикаторные бумажные (СИБ) для идентификации вибрионов

Способ приготовления указан в прилагаемом наставлении.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Временные методические рекомендации по контролю за содержанием *V. parahaemolyticus* в рыбе и рыбопродуктах. Методы исследования и нормативы. М., 1985.

2. Григорьев Ю.И. Распространение *V. parahaemolyticus* - возбудителя пищевых токсикоинфекций в морской воде и морепродуктах. М., 1975, канд. дисс.

3. Григорьев К.И., Пивоваров Ю.И. Распространение галофильных вибрионов в морской воде и характеристика их свойств. - В сб.: "Гигиенические аспекты охраны окружающей среды". Вып.2. М., 1974, с.153-156.

4. ГОСТ 26668-85. Пищевые и вкусовые продукты. Методы отбора проб для микробиологических анализов.

5. ГОСТ 26669-85. Пищевые и вкусовые продукты. Подготовка проб для микробиологических анализов.

6. Инструкция о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях, Минздрав СССР, № 1135-73. М., 1975.

7. Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции и рыбы и морских беспозвоночных, Минздрав СССР, № 5319. Л., 1991.

8. Инструкция по санитарной обработке технологического оборудования на рыбообрабатывающих предприятиях и судах. Л., Транспорт, 1986.

9. Карцев В.В., Смирнова С.П., Лавровская Т.Г. и др. Частота обнаружения галофильных вибрионов в рыбе и рыбных продуктах на рыбообрабатывающих предприятиях Ленинграда и из магазинов фирмы "Океан". - В сб. научных трудов "Методы индикации биоценоза потенциально-патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды", М., 1985.

10. Либинзон А.Е., Павлова И.В., Нагорная А.З. и др. Галофильные вибрионы - возбудители острых кишечных инфекций, встречающихся на побережье Черного, Азовского морей. - В кн. "Тетисы областной

научно-практической конференции по проблеме "холера". Ростов-на-Дону, 1984, с.107.

11. Либиназон А.Е. Перспективы медико-географического картографирования ареалов параземолитических вибрионя. - В кн.: "Проблемы медико-географических исследований". М., 1984, с 121.

12. Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов, Минздрав СССР, № 5061-89. М., 1990.

13. Методические рекомендации: " Пищевые токсикоинфекции, вызываемые *V.parahaemolyticus* и их диагностика", М., 1975.

14. Методические рекомендации по лабораторной диагностике, эпидемиологии, лечению и профилактике заболеваний, вызываемых параземолитическими и другими условно-патогенными морскими вибрионами, Ростов-на-Дону, 1985.

15. Пивоваров В.П., Григорьев Д.И., Зиневич Л.С. Обнаружение *V.parahaemolyticus* в гидробийонтах прибрежных заливов Японского моря. - В сб.: "Гигиенические аспекты охраны окружающей среды". Вып.3. М., 1976, с.111.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Введение	3
1. Микробиологические нормативы для паразитических вибрионов.	5
2. Отбор проб сырья и готовой продукции, подготовка к анализу	5
3. Методы анализов	6
4. Рекомендации.	12
5. Питательные среды для определения галофильных вибрионов	14
Рекомендуемая литература	18

Подписано к печати 23.08.91г. Изд.№ 67. Формат 60X84/16.
Объем 0,8 уч.-изд.л. Тираж 620 экз. Заказ 78/74

Отпечатано на роталпринте Гипрорыбфлота
190000, г.Ленинград, ул.Гоголя, 18-20