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 ТОКСИКОИНФЕКЦИЙ

Ленинград
1991

gost.e-ecolog.ru

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

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 микробиологии и микроэкологии, профессор И.Б.Куваева, ведущий научный сотрудник, канд. мед. наук С.А.Шевелева

# В В Е Д Е Н И Е

Галофильные парагемолитические 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 парагемолитическим 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 I г и более.

Галофильные парагемолитические вибрионы относятся к группе потенциально патогенных микроорганизмов.

При попадании в организм человека с продуктами моря, особенно не подвергнутыми термической обработке, парагемолитические 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 I г продукта вызывает заболевание.

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

Анализы по выявлению в рыбопродукции парагемолитических 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 парагемолитических 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 ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ

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

Допускается присутствие вибрионов до 500 КОЕ/г при условии направления сырья на технологическую переработку: самоваживание, крепкий посол, термообработку.

Парагемолитические вибрионы должны отсутствовать в 25 г сырья (мидии, устрицы и др.), употребляемого в пищу в сыром виде, а также в 25 г икры.

В случае исследования гобопродукции кулинарной, уплотненного и горячего копчения, просервов, соленой, пряной, маринованной рыбы, вяленой, сушеной продукции, балковых продуктов на присутствие парагемолитических вибрионов, их количество не должно превышать 10 КОЕ/г.

## 2. ОТБОР ПРОБ СЫРЬЯ И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ, ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Отбор проб и подготовку к анализу проводят согласно ГОСТ 26668-85 и ГОСТ 26669-85, Пищевые и вкусовые продукты и Инструкции по санитарно-микробиологическому контролю производства продукции из рыбы и морских беспозвоночных, 1991.

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

Пробы от крупной рыбы: свежей, охлажденной, мороженой, соленой, пряной, маринованной, сушеной, вяленой, копченой и крупных экземпляров морских беспозвоночных отбирают не более 3-х штук. От каждого экземпляра из нескольких мест вырезают кусочки с кожей и мышцами, у непотрошеных экземпляров - дополнительно часть жабер и кишечника. Мелкую рыбу (3 - 10 шт.) из разных мест исследуемой партии берут целиком.

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

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

натрия. Полученное разведение тщательно взбалтывают, не допуская намокания пробки, и готовят последующие десятикратные разведения (I:I00 и I:I000), определенные объемы которых засевают на плотную среду.

Для выявления отсутствия-присутствия парагемолитических вибрионов отбирают подготовленную навеску массой 25 г и переносят в I00 $см^3$ жидкой среды обогащения (п.5.3).

## 3. МЕТОДЫ АНАЛИЗОВ

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

При количественном учете парагемолитических вибрионов из первого разведения производят посев по 0,2 $см^3$ на 5 чашек с плотной дифференциально-диагностической средой - ДДА (п.5.4), т.е. высевают 0,I г продукта; из разведения I:I00 высевают по 0,I $см^3$ на две параллельные чашки (0,00I г продукта на I чашку). Аналогично производят посев из разведения I:I000 (0,000I г продукта на I чашку). Посевной материал втирают досуха. Чашки инкубируют при температуре 37°С в течение 24 ч.

Для выявления отсутствия-присутствия парагемолитических вибрионов пробу массой 25 г в I00 $см^3$ среды обогащения термостатируют при температуре 37°С I8-24 ч. Затем производят пересев на ДДА таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний. Чашки инкубируют при температуре 37°С 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 парагемолитическим 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 парагемолитические вибрионы, делают препараты, окрашивая по Граму, и микроскопируют.

Парагемолитические вибрионы - грамотрицательные 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 специфичных тестов для идентификации вибрионов.

В целях клинической диагностики или эпидемиологического расследования перечень тестов для идентификации выделенных парагемолитических 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, № 1135-73, 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 парагемолитические 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 37°С 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 37°С 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°С в течение 18 ч. Парагемолитические вибрионы цвет среды не изменяют, газа не образуют.

Можно использовать среды Рессселя, Клигера. 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 $см^3$ 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°С 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 ДЛГВ с добавлением аминокислоты лизина (п.5.6). Для этого в две пробирки с этой средой засевают по 0,1-0,2 $см^3$ 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 $см^3$ стерильного вазелинового масла и термостатируют 24 ч при температуре 37°С.

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 $см^3$ 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°С. 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°С. Затем к I $см^3$ культуры добавляют 0,6 $см^3$ $\alpha$-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 I ч при температуре 37°С. Так как парагемолитические 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°С в течение 24-48 ч. При наличии роста прибавляют 3-5 капель 0,02%-ного раствора индикатора метилового красного (п.5.I2). Пробирку встряхивают и снова помещают в термостат на I ч при температуре 37°С. 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.I0). Посевы инкубируют I8-24 ч при температуре 37°С.

При росте, сопровождающемся расщеплением углеводов с образованием кислых продуктов, цвет среды изменяется. С индикатором бромтимолбляу она приобретает желтый цвет, с индикатором Андреде - 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.I1). Определение типа расщепления глюкозы позволяет отличать вибрионы от сходных с ними по морфологии представителеи рода Pseudomonas и Comonomonus.

Для идентификации вибрионов можно использовать СИБ - системы индикаторные бумажные (п.5.I5).

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

I-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 I%-ную пептонную воду с 3% хлорида натрия.

3-й день
I. Пересев с I%-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 щелочной агар для определения оксидазной активности.
4. Посев на среду лактозо-сахарозную.
5. Посев на I%-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 I%-ную пептонную воду с 3% хлорида натрия для определения способности образования индола.
9. Посев на среду Кларка для определения способности образования ацетилметилкарбинола.
I0. Посев на среду Кларка для определения интенсивности кислотообразования.
II. Посев на среду Хью-Лейфсона для определения типа расщепления глюкозы.
I2. 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 | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | V.parahaemolyticus | V.alginolyticus | V.cholerae | Aeromonas | Plesiomonas | Pseudomonas | Salmonella | Proteus |
| Окраска по Граму | | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Подвижность | | ++ | ++ | +++ | + | +° | + | + | ± |
| Оксидаза | | + | + | + | + | + | + | – | – |
| Рост при температуре 43°С | | + | + | – | – | – | – | – | – |
| 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 | + | + | + | + | – | + | ± | ± |
| | маннноза | + | + | + | ± | – | | ± | – |
| | 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 I.I0 свидетельствует о том, что в I 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 I:I00, но обнаружение на пяти чашках с посевом из разведения I:I0 I0-50 колоний указывает, что в I г продукта содержится от I00 до 500 жизнеспособных клеток парагемолитических вибрионов. Такой продукт может быть рекомендован для использования на пищевые цели только с рядом ограничений (хранение при температуре минус I8-20°С в течение I-3 мес, реализация этой продукции с рассредоточением и т.п.);

обнаружение значительного роста (50 КОЕ и более) при посеве из разведения I·I00 и наличие роста свыше 5-I0 колоний на чашках с посевами из разведения I·I000 свидетельствуют о массивном заражении продукта парагемолитическими вибрионами (свыше $5xI0^4$ КОЕ), что может представлять опасность для здоровья потребителя.

При таком уровне контаминации продукта парагемолитическими вибрионами ($I0^4$ и выше на I 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.

Гидробионты 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 парагемолитические 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 парагемолитическими вибрионами рыбного сырья, особенно морского промысла, следует его охладить (до $0^{\circ}C$), заморозить и хранить при температуре не выше минус $18^{\circ}C$. 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. Галофильные вибрионы выдерживают кипячение в течение 1 мин, при $80^{\circ}C$ 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%), мононатриевая 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.I. Щелочная 0,I%-ная пептонная вода с 3% хлорида натрия (для определения присутствия или отсутствия вибрионов).

Пептон - I,0 г

Натрия хлорид - 30,0 г

Вода дистиллированная - I $дм^3$.

Все компоненты кипятят до полного их растворения, охлаждают до комнатной температуры и устанавливают РН 7,8-8,2. Среду разливают по 225 $см^3$ во флаконы и по I0 $см^3$ в пробирки, затем стерилизуют при температуре I2I$^0$С в течение 20 мин.

5.2. Щелочная I%-ная пептонная вода, содержащая 0, 3, 8 и I0% хлорида натрия.

В I%-ную пептонную воду добавляют требуемое количество хлорида натрия, устанавливают РН 8,0 (I0%-ным раствором *NaOH*), фильтруют, разливают в пробирки по 5 $см^3$, стерилизуют при температуре I2I$^0$С в течение 30 мин.

Срок хранения в холодильнике - 2 мес.

Щелочная пептонная вода с триптофаном.

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

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

К I00 $см^3$ стерильной I%-ной пептонной воды, содержащей 3% хлорида натрия (РН 8,0), добавляют 0,2% жидкости "Прогресс" и 0,75 $см^3$ рабочего разведения (I:I000) теллурита калия.

Срок хранения - 7-I0 сут.

Рабочее разведение теллурита калия готовят следующим образом: I г сухого теллурита калия растворяют в I $см^3$ стерильной дистиллированной воды. 0,I $см^3$ полученного раствора помещают в пробирку с 9,9 $см^3$ стерильного физиологического раствора, перемешивают, получают разведение I:I00. К 0,I $см^3$ раствора (разведение I:I00) добавляют 0,9 $см^3$ стерильного физиологического раствора. Получают рабочее разведение (I:I000) или к 5 $см^3$ 2%-ного раствора теллурита калия добавляют до I00 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения не более 48 ч.

Непосредственно перед употреблением или не ранее, чем за 48 ч к I00 $см^3$ стерильной пептонной воды добавляют 0,75 $см^3$ рабочего раз-

ведения (1:1000) теллурита калия до конечной концентрации 1:150000. 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 2%-ный щелочной | 1 дм$^3$ |
| Натрия хлорид | 20 г |
| Сахарова | 15 г |
| Пенициллин | 5000 ед. |
| Жидкость "Прогресс" | 2 см$^3$ |
| Бромтимоловый синий 1,6%-ный спиртовой раствор | 10 см$^3$ |
| Калия теллурит (1:1000) ($K_2TeO_3 \cdot H_2O$) | 7,5 см$^3$ |

В расплавленном стерильном рыбо- или мясопептонном агаре (РН 8,0), охлажденном до 50°С, 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 дм$^3$ рыбо- или мясопептонного агара добавляют 30 г хлорида натрия и 30 см$^3$ 10%-ного раствора карбоната натрия, кипятят 45 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют при температуре 121°С 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

| | |
|---|---|
| Пептон | 5,0 г |
| Натрия хлорид | 30,0 г |
| Глюкоза | 0,5 г |
| или 40%-ный раствор | 1 см$^3$ |
| Витамин $B_6$, 5%-ный раствор | 0,1 см$^3$ |
| Бромкрезолпурпур 1,6%-ный спиртовой раствор | 1 см$^3$ |
| дистиллированная вода | 1 дм$^3$ |

Готовят среду, устанавливают РН 7,8 и разливают во флаконы. В один добавляют 1% *L*-лизина. Среда - без аминокислот служит контролем. Готовую среду разливают в пробирки по 2 см$^3$ и стерилизуют при температуре 121$^0$С в течение 15 мин.

5.7. *Лактозо-сахарозная среда.*

| | |
|---|---|
| Пептон | 5,0 г |
| Агар-агар | 10,0 г |
| Натрия хлорид | 5,0 г |
| Лактоза | 10,0 г |
| Сахароза | 1,0 г |
| Индикатор Андреде | 40 мл |
| Вода дистиллированная | 1 дм$^3$ |

Готовят среду, устанавливают РН 7,2-7,4 и разливают по 5-7 мл в стерильные пробирки и стерилизуют при температуре 112,5$^0$С - 20 мин. Среду после стерилизации скашивают так, чтобы получить столбик и косяк. Среда светлая, при кислотообразовании - красная.

5.8. Среды Клиглера, Росселя (из сухого препарата). Способ определения дается на этикетке.

5.9. Среда Кларка

| | |
|---|---|
| Пептон | 5,0 г |
| Глюкоза | 5,0 г |
| Калий фосфорнокислый двузамещенный ($K_2HPO_4$) | 5,0 г |
| Вода дистиллированная | 1 дм$^3$ |
| Натрия хлорид | 30,0 г |
| РН 7,5-7,8 | |

Растворяют все ингредиенты в 900 см$^3$ дистиллированной воды, доводят объем до 1 дм$^3$, фильтруют. Устанавливают РН и разливают по 5 см$^3$ в пробирки. Стерилизуют при температуре 112,5$^0$С в течение 15 мин.

5.10. Среды Гисса (для определения ферментативной активности).

В 100 см$^3$ 1%-ной пептонной воды растворяют 3 г хлорида натрия и 1 г испытуемого углевода. Устанавливают РН 7,4-7,6, добавляют 1 см$^3$ индикатора Андреде. Среду разливают по 5 см$^3$ в пробирки с поплавками. Стерилизуют при температуре 112$^0$С в течение 20 мин.

## Индикатор Андреде

В 100 см$^3$ дистиллированной воды растворяют 0,5 г кислого фуксина, прибавляют 16,4 см$^3$ 1 *N* раствора гидроокиси натрия. Кипя-

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

Среды Тисса (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, устанавливают РН 8,0, разливают в пробирки по 3 и 10 $см^3$, стерилизуют при температуре 112,5°С в течение 20 мин.

5.12. Раствор индикатора метилового красного.

0,04 г метилового красного индикатора растворяют в 40 $см^3$ 96%-ного этилового спирта, добавляют 60 $см^3$ 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 I года в склянке с притертой крышкой.

5.I5. Системы индикаторные бумажные (СИБ) для идентификации вибрионов

Способ приготовления указан в прилагаемом наставлении.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

I. Временные методические рекомендации по контролю за содержанием V parahaemolyticus в рыбе и рыбопродуктах. Методы исследования и нормативы. М., I985.

2. Григорьев Ю.И. Распространение V.parahaemolyticus - возбудителя пищевых токсикоинфекций в морской воде и морепродуктах. М., I975, канд. дисс.

3. Григорьев К.И., Пивоваров Ю.П. Распространение галофильных вибрионов в морской воде и характеристика их свойств. - В сб.: "Гигиенические аспекты охраны окружающей среды". Вып.2. М., I974, с.I53-I56.

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, № II35-73. М., I975.

7. Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции и рыбы и морских беспозвоночных, Минздрав СССР, № 5319. Л., I99I.

8. Инструкция по санитарной обработке технологического оборудования на рыбообрабатывающих предприятиях и судах. Л., Транспорт, I986.

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., I985.

I0. Либинзон А.Е., Павлова И.В., Нагорная А.Э. и др. Галофильные вибрионы - возбудители острых кишечных инфекций, встречающихся на побережье Черного, Азовского морей. - В кн. "Тезисы областной

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

II. Либинзон А.Е. Перспективы медико-географического картографирования ареалов парагемолитических вибрионов. - В кн.: "Проблемы медико-географических исследований". М., 1984, с 121.

I2. Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов, Минздрав СССР, № 5061-89. М., 1990.

I3. Методические рекомендации: " Пищевые токсикоинфекции, вызываемые V.parahaemolyticus и их диагностика", М., 1975.

I4. Методические рекомендации по лабораторной диагностике, эпидемиологии, лечению и профилактике заболеваний, вызываемых парагемолитическими и другими условно-патогенными морскими вибрионами, Ростов-на-Дону, 1985.

I5. Пивоварова Ю.П., Григорьев Ю.И., Зиневич Л.С. Обнаружение V.parahaemolyticus в гидробионтах прибрежных заливов Японского моря. - В сб.: "Гигиенические аспекты охраны окружающей среды". Вып.3. М., 1976, с.III.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение . . . . . 3

I. Микробиологические нормативы для парагемолитических вибрионов. . . . . 5

2. Отбор проб сырья и готовой продукции, подготовка к анализу . . . . . 5

3. Методы анализов . . . . . 6

4. Рекомендации. . . . . I2

5. Питательные среды для определения галофильных вибрионов . . . . . I4

Рекомендуемая литература . . . . . I8

Подписано к печати 23.08.9Iг. Изд.№ 67. Формат 60X84/I6.
Объем 0,8 уч.-изд.л. Тираж 620 экз. Заказ 78/71

Отпечатано на ротапринте Гипрорыбфлота
I90000, г.Ленинград, ул.Гоголя, I8-20

gost.e-ecolog.ru