ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54378— 2011

РЫБА, НЕРЫБНЫЕ ОБЪЕКТЫ И ПРОДУКЦИЯ ИЗ НИХ

Методы определения жизнеспособности личинок гельминтов

Codex Stan 244—2004

(NEQ)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0–2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ФГУП «ВНИРО»), Обществом с ограниченной ответственностью «Каспийский научно-исследовательский и аналитический центр рыбной промышленности» (ООО НИиАЦРП «Каспрыбтестцентр»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 300 «Рыбные продукты, пищевые, кормовые, технические и упаковка»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 августа 2011 г. № 225-ст

4 В настоящем стандарте учтены основные нормативные положения международного стандарта Codex stan 244—2004 «Стандарт на сельдь атлантическую соленую и шпрот соленый» (Codex Stan 244—2004 «Standard for salted atlantic herring and salted sprat», NEQ) в части способа определения жизнеспособности личинок нематод, приведенного в подразделе 9.4

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2013

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 2
4 Сущность методов . . . 2
5 Требования к условиям проведения определения жизнеспособности личинок гельминтов . . . 2
6 Требования к средствам измерений, оборудованию, материалам, реактивам . . . 2
7 Порядок подготовки растворов реактивов и их применение . . . 3
7.1 Физиологический раствор . . . 3
7.2 Раствор соляной кислоты концентрацией 0,063 моль/дм^3 . . . 3
7.3 Раствор трипсина . . . 3
7.4 Раствор пепсина . . . 3
8 Порядок подготовки к проведению определений жизнеспособности личинок гельминтов . . . 4
8.1 Отбор проб . . . 4
8.2 Транспортирование проб . . . 4
8.3 Приемка и хранение проб . . . 4
8.4 Подготовка проб . . . 4
9 Методы проведения определения жизнеспособности личинок гельминтов . . . 5
9.1 Метод физического раздражения . . . 5
9.2 Метод электрического стимулирования . . . 5
9.3 Метод химического воздействия . . . 5
9.4 Метод переваривания и физического раздражения . . . 5
10 Обработка результатов . . . 6
Приложение А (рекомендуемое) Форма протокола испытания образцов продукции . . . 7
Библиография . . . 8

Введение

Настоящий стандарт в части определения жизнеспособности личинок нематод гармонизирован с международным стандартом Комиссии «Кодекс Алиментариус» стандарт Кодекса 244—2004 для соленой атлантической сельди и соленых шпрот (приложение 1) в той мере, в которой возможно его эффективное применение на территории Российской Федерации.

Настоящий стандарт устанавливает основные термины и соответствующие им определения, которые необходимы для понимания особенностей объекта стандартизации.

При определении жизнеспособности личинок гельминтов, опасных для здоровья человека, организация (лаборатория) самостоятельно устанавливает такой алгоритм проведения испытаний, который обеспечит получение достоверных данных об исследуемом объекте. С этой целью может быть использовано поэтапное проведение определения жизнеспособности личинок гельминтов несколькими методами, приведенными в настоящем стандарте.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РЫБА, НЕРЫБНЫЕ ОБЪЕКТЫ И ПРОДУКЦИЯ ИЗ НИХ

Методы определения жизнеспособности личинок гельминтов

Fish, non-fish objects and products from them. Methods for evaluation of viability of the helminth larvae

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на рыбу, нерыбные объекты и продукцию из них (далее — продукция) и устанавливает методы определения жизнеспособности личинок гельминтов (далее — методы).

Примечание — Методы могут быть применимы для земноводных, пресмыкающихся и продукции из них.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 50380—2005 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Термины и определения

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 3309—84 Часы настольные и настенные балансовые механические. Общие технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4025—95 Мясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 6672—75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 20469—95 Электромясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 21240—89 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21241—89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 23932—90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26678—85 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

ГОСТ 27752—88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

Издание официальное

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 50380, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **гельминты** (helminths): Паразитические черви.

Примечание — К гельминтам относят гирокотилиды, моногенеи, нематоды, пиявки, скребни, трематоды, турбеллярии и цестоды. К опасным для здоровья человека относят отдельные личинки нематод, скребней, трематод и цестод, установленные в нормативных правовых актах Российской Федерации*.

3.2 **личинка гельминта** (helminths larva): Постэмбриональная стадия индивидуального развития паразита, ведущего самостоятельную жизнь, активно питающегося и развивающегося, претерпевая характерные для этой стадии линьки.

3.3 **жизнеспособность (личинки гельминта)** (viability): Способность личинки гельминта сохранять свою жизнь в меняющихся условиях среды.

4 Сущность методов

Методы определения жизнеспособности основаны на выделении личинок гельминтов и стимулировании их движений физическим раздражением, электрическим или химическим воздействием.

5 Требования к условиям проведения определения жизнеспособности личинок гельминтов

5.1 Лаборатория, в которой проводят определение жизнеспособности личинок гельминтов, должна иметь разрешение на работу с патогенными биологическими агентами IV группы.

5.2 Помещения лаборатории должны удовлетворять требованиям, приведенным в [2], [3].

5.3 Специалисты, проводящие испытания по установлению жизнеспособности личинок гельминтов, должны быть подготовлены и иметь допуск к работе с патогенными биологическими агентами IV группы.

6 Требования к средствам измерений, оборудованию, материалам, реактивам

6.1 Для хранения и подготовки проб, проведения определений используют:

- холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда по ГОСТ 26678;
- приборы холодильные электрические бытовые по ГОСТ 16317;
- микроскоп стереоскопический МБС-9;
- микроскопы биологические Биолам, Бимам;
- термостат, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С;

---

* До введения соответствующих нормативных правовых актов Российской Федерации — в нормативных документах федеральных органов исполнительной власти [1].

- мешалку магнитную с термостатической подогреваемой пластиной;
- мясорубки диаметром отверстий решетки от 3 до 5 мм по ГОСТ 4025, ГОСТ 20469;
- электроплитки бытовые по ГОСТ 14919;
- сито механическое диаметром не менее 140 мм и ячеей 0,5 мм;
- источник постоянного электрического тока с напряжением от 0,5 до 1,5 В;
- стол с прозрачной верхней крышкой из матового (молочного) стекла и электрической подсветкой;
- диск для просвечивания по [4];
- весы класса точности III, Max = 500 г, *e* = 1 г по ГОСТ Р 53228;
- секундомеры механические;
- часы по ГОСТ 3309, ГОСТ 27752;
- термометр жидкостный стеклянный с ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498;
- посуду и оборудование лабораторные стеклянные по ГОСТ 23932;
- стаканы стеклянные В-1-100 ТХС, В-1-250 ТХС по ГОСТ 25336;
- чашки Петри бактериологические по ГОСТ 25336;
- стекло плоское толщиной от 3 до 5 мм размером 6 × 9 или 9 × 12 см;
- стекла предметные по ГОСТ 9284;
- стекла покровные по ГОСТ 6672;
- стекло часовое диаметром от 70 до 80 мм;
- капельницу по ГОСТ 25336;
- пипетки глазные по ГОСТ 25336;
- палочки стеклянные по ГОСТ 25336;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- скальпель медицинский по ГОСТ 21240;
- пинцет медицинский по ГОСТ 21241;
- шпатели лабораторные металлические или пластмассовые;
- иглы препаровальные;
- пепсин по [5];
- трипсин по [6];
- кислоту соляную по ГОСТ 3118;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- воду питьевую по [7].

6.2 Допускается использование вспомогательного оборудования по метрологическим, техническим характеристикам не хуже указанных в настоящем стандарте.

Допускается использование других реактивов, по качеству и чистоте не ниже вышеуказанных.

7 Порядок подготовки растворов реактивов и их применение

7.1 Физиологический раствор

0,85 г хлористого натрия растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды. Допускается использовать предварительно прокипяченную питьевую воду.

Применяют при рассматривании личинок гельминтов и для приготовления раствора трипсина.

7.2 Раствор соляной кислоты концентрацией 0,063 моль/дм^3

5,4 см^3 соляной кислоты плотностью 1,188 г/см^3 осторожно вливают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 с предварительно налитой дистиллированной водой в объеме от 500 до 700 см^3, перемешивают и раствор доводят до метки дистиллированной водой.

Применяют для приготовления раствора пепсина.

7.3 Раствор трипсина

0,5 г трипсина растворяют в 100 см^3 физиологического раствора по 7.1.

Раствор применяют при использовании метода химического воздействия.

7.4 Раствор пепсина

0,5 г пепсина растворяют в 1000 см^3 раствора соляной кислоты концентрацией 0,063 моль/дм^3 по 7.2.

Раствор применяют при использовании метода переваривания и физического раздражения.

8 Порядок подготовки к проведению определений жизнеспособности личинок гельминтов

8.1 Отбор проб

8.1.1 Отбор проб проводят в соответствии с требованиями соответствующих стандартов для рассматриваемых групп продукции.

При отсутствии специализированных стандартов рекомендуется достижение соглашения заинтересованных сторон по отбору проб конкретной продукции.

8.1.2 Пробы, полученные для определения, не должны быть повреждены и/или изменены во время транспортирования и хранения.

8.2 Транспортирование проб

8.2.1 При транспортировании проб должно быть обеспечено их содержание в условиях, предупреждающих влияние на жизнеспособность личинок гельминтов.

Условия транспортирования должны обеспечивать следующие температуры хранения:

- рыбы и нерыбных объектов сырца (свежих) и охлажденных — от 0 °С до 4 °С;
- рыбы и нерыбных объектов мороженых — не выше минус 18 °С;
- иной продукции — в соответствии с требованиями стандартов или технической документации.

8.2.2 Для проб продукции должна быть обеспечена доставка их на испытание наиболее быстрым способом транспортирования.

8.3 Приемка и хранение проб

8.3.1 При поступлении проб на испытание должны быть проверены их состояние, акты отбора и, при необходимости, измерена температура.

8.3.2 Каждая проба должна быть снабжена этикеткой, на которую наносят:

- наименование и местонахождение владельца продукции;
- наименование и местонахождение изготовителя;
- наименование продукции;
- дату, время и место отбора пробы;
- срок и условия хранения пробы до испытания;
- номер пробы;
- номер и дату акта отбора пробы;
- обозначение документа (при наличии), в соответствии с которым изготовлена продукция, или реквизиты договора (контракта).

8.3.3 Пробу принимают на испытание согласно прилагаемому к ней акту отбора проб.

В случае несоответствия пробы акту или неполной информации на этикетке, не позволяющей ее идентифицировать, пробу не принимают на испытание, о чем немедленно уведомляют организацию, направившую пробу.

8.3.4 Принятые по акту пробы документируют таким образом, чтобы была возможность отследить их движение от приема до составления протокола испытаний.

В лабораторном журнале должна быть зафиксирована следующая информация:

- дата отбора и поступления пробы;
- номер пробы;
- наименование предприятия (организации), направившего пробу;
- состояние пробы при получении (наличие этикетки, упаковки и др.);
- наименование продукции, от которой взята проба;
- соответствие параметров пробы данным, приведенным на этикетке;
- цель направления пробы.

8.3.5 Пробы перед определением хранят в условиях, предупреждающих влияние на жизнеспособность личинок гельминтов в соответствии с требованиями стандартов или технических документов.

8.4 Подготовка проб

8.4.1 Пробы свежей (сырца), охлажденной кулинарной продукции, консервов и пресервов анализируют без предварительной подготовки.

8.4.2 Пробы подмороженной и мороженой продукции анализируют после их размораживания до достижения температуры в центре продукта от 0 °С до 5 °С.

8.4.3 Пробы соленой, пряного посола, маринованной, вяленой, сушено-вяленой, сушеной, подкопченной, копченой и икорной продукции анализируют после их отмачивания в питьевой воде не более суток. Воду меняют каждые 4—6 ч.

Время и кратность отмачивания устанавливают в зависимости от вида продукции.

9 Методы проведения определения жизнеспособности личинок гельминтов

9.1 Метод физического раздражения

9.1.1 Метод применим к личинкам нематод, скребней, трематод и цестод.

9.1.2 Отобранных личинок нематод, скребней и цестод помещают в чашку Петри или на часовое стекло на фильтровальную бумагу, смоченную физиологическим раствором в соответствии с 7.1, или в чашку Петри, или на часовое стекло в тонкий слой физиологического раствора без использования фильтровальной бумаги. Личинок рассматривают в бинокуляр при соответствующем увеличении.

При наблюдении за личинками в течение 1—2 мин, если личинки живые, фиксируют их слабую подвижность. Если движение личинок не наблюдается, то их следует стимулировать с помощью укола тонкой препаровальной иглой. Если личинка жизнеспособна, то укол вызывает сокращение тела личинки.

9.1.3 Выделенных метацеркарий трематод в цистах помещают на предметное стекло или плоское стекло в соответствии с 6.1, добавляют несколько капель физиологического раствора или воды, накрывают сверху другим предметным или плоским стеклом и помещают на стол бинокуляра или микроскопа. Раствора или воды должно быть добавлено столько, чтобы покровное стекло не сдавливало цисты метацеркарий.

Просмотр цист позволяет заметить медленные движения внутри них метацеркарий, если они живые. При отсутствии движений следует осторожно надавить на верхнее стекло, чтобы было видно легкое сдавливание оболочек цист. Если личинка жизнеспособна, то придавливание стимулирует ее самостоятельные движения.

9.2 Метод электрического стимулирования

9.2.1 Метод применим только к личинкам нематод, скребней и цестод.

9.2.2 Отобранных личинок нематод, скребней и цестод помещают на мокрую фильтровальную бумагу или на часовое стекло в тонкий слой воды. К личинке нужно прикоснуться одновременно двумя препаровальными иглами, к которым с помощью двух изолированных проводов подведено напряжение от источника постоянного электрического тока в соответствии с 6.1.

Личинок рассматривают в бинокуляр при увеличении от 16$^{\times}$ до 48$^{\times}$ и отмечают наличие или отсутствие у них движений. Если личинка жизнеспособна, то стимулирование ее электрическим током приводит к проявлению сократительных движений.

9.3 Метод химического воздействия

9.3.1 Метод применим к личинкам трематод.

9.3.2 Выделенных личинок (метацеркарий) трематод в цистах помещают на часовое стекло в тонкий слой раствора трипсина по 7.3 с температурой 36 °С — 37 °С.

Просмотр цист в бинокуляр в течение не более 5 мин позволяет заметить стимулированные раствором трипсина движения личинок и выход инцистированных метацеркарий из цист, если они живые.

9.4 Метод переваривания и физического раздражения

9.4.1 Метод применим к личинкам нематод.

9.4.2 Для выделения личинок нематод из мышечной ткани отбирают (200 ± 10) г филе, измельчают вручную или на мясорубке и помещают в емкость (стакан) вместимостью не менее 2000 см^3, содержащую 1000 см^3 раствора пепсина по 7.4. Смесь подогревают и прогревают на магнитной мешалке при температуре от 35 °С до 37 °С в течение 1—2 ч при постоянном медленном помешивании. Если мышечные ткани не растворились, то раствор процеживают через сито по 6.1, промывают водой и оставшиеся нерастворившиеся ткани переносят в стакан. В стакан добавляют 700 см^3 раствора пепсина и смесь вновь подогревают на магнитной мешалке при температуре от 35 °С до 37 °С при постоянном медленном помешивании до исчезновения крупных кусков мышечной ткани. Раствор процеживают через сито, а содержимое сита промывают водой.

9.4.3 Выделенных личинок нематод пинцетом осторожно переносят в чашки Петри с раствором пепсина и ставят на диск просвечивания в соответствии с 6.1. Температура раствора в чашке Петри должна быть от 35 °С до 37 °С.

При уколе препаровальной иглой у жизнеспособной личинки наблюдаются видимые движения или самопроизвольная реакция. Разовое развертывание скрученных личинок не является признаком жизнеспособности. Живая личинка должна проявлять спонтанные движения.

Примечание — При установлении жизнеспособности личинок нематод в соленой или сладко-соленой продукции период реанимации личинок может продолжаться более 2 ч.

10 Обработка результатов

Результаты определения оценивают по каждой пробе отдельно.

Результаты определения жизнеспособности личинок гельминтов в пробе записывают: «Живые личинки нематод, скребней, трематод, цестод обнаружены или не обнаружены в *M* кг продукции» (*M* — масса продукции, в которой определяли жизнеспособность личинок гельминтов) и оформляют протокол испытания в соответствии с приложением А.

Приложение А
(рекомендуемое)

Форма протокола испытания образцов продукции

_____
наименование и реквизиты организации, проводящей испытания

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № _____ _____
порядковый номер дата (число, месяц, год)

Наименование продукции и реквизиты маркировки _____
_____

Страна-изготовитель (поставщик) _____
_____

Предъявитель образцов_____
наименование организации или инициалы, фамилия частного лица, юридический адрес

Форма подачи заявки _____
письмо, телеграмма, факс, e-mail, заявление и др., номер, дата

Акт отбора пробы_____
_____
реквизиты акта отбора

Документ на метод определения _____
_____

Исследованием установлено, что живые личинки нематод (скребней, трематод, цестод)
обнаружены (не обнаружены) в *М* кг _____
ненужное — зачеркнуть наименование исследуемого образца продукции

Результаты исследований подтверждаю:

Руководитель (зам. руководителя) организации _____ _____
личная подпись инициалы, фамилия

М.П.

Исполнители _____ _____
личная подпись инициалы, фамилия

Дата выдачи протокола « _____» _____ 201 _____ г.

Копию протокола считать недействительной

Библиография

[1] СанПиН 2.3.2.1078—01	Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы
[2] СП 1.3.2322—08	Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила
[3] СП 1.3.2518—09	Дополнения и изменения № 1 к СП 1.3.2322—08 Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила
[4] 190—1995	Общий стандарт Кодекса для быстрозамороженного рыбного филе
[5] ФС 42-2985—00	Фармакопейная статья. Пепсин
[6] ФСП 42-0179-5943—04	Фармакопейная статья. Трипсин кристаллический
[7] СанПиН 2.1.4.1074—01	Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы

УДК 664.951.(083.74):006.354 ОКС 67.120.30 Н29 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: рыба, нерыбные объекты, продукция, методы определения, жизнеспособность, личинки гельминтов

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *М.С. Кабашова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 11.12.2012. Подписано в печать 30.01.2013. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,00. Тираж 195 экз. Зак. 94.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru