

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы выявления и определения парагемолитических вибрионов в рыбе, нерыбных объектах промысла, продуктах, вырабатываемых из них, воде поверхностных водоемов и других объектах

Дата введения 2006-04-01

1. РАЗРАБОТАНЫ: Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Ю.М.Федоров); ФГУЗ Ростовский-на-Дону Ордена Трудового Красного Знамени Научно-исследовательский противочумный институт (Ю.М.Ломов, Б.Н.Мишанькин, Л.М.Смоликова, Л.Г.Воронежская, Л.С.Подосинникова, А.Е.Либинзон, Е.М.Санамянц, Е.Н.Голенищева, Н.В.Божко, Н.Г.Пузанова, А.Б.Мазрухо, Д.И.Каминский); ФГУЗ "Федеральный центр гигиены и эпидемиологии" Роспотребнадзора (И.В.Брагина, Э.Ф.Опочинский, Н.С.Кривопалова); ФГУЗ Причерноморская противочумная станция (Г.В.Гальцева); ГУ Научно-исследовательский институт питания РАМН (С.А.Шевелева).

2. РЕКОМЕНДОВАНЫ к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 6 октября 2005 г. (протокол N 3).

3. УТВЕРЖДЕНЫ И ВВЕДЕНЫ В ДЕЙСТВИЕ Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г.Онищенко 30 января 2006 г.

4. ВВЕДЕНЫ ВЗАМЕН "Методических указаний по контролю за содержанием в рыбных продуктах парагемолитических вибрионов - возбудителей пищевых токсикоинфекций" N 5780-91 от 03.04.91.

1. Область применения

1.1. Методические указания устанавливают порядок выявления и определения парагемолитических вибрионов - возбудителей пищевых токсикоинфекций и острых кишечных заболеваний в рыбе, нерыбных объектах промысла, продуктах, вырабатываемых из них, воде поверхностных водоемов и других объектах при осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора (контроля), а также при санитарно-эпидемиологическом расследовании вспышек пищевых отравлений и инфекций с пищевым путем передачи.

1.2. Настоящие методические указания предназначены для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут использоваться другими организациями, аккредитованными в установленном порядке.

2. Парагемолитические вибрионы - возбудители пищевых токсикоинфекций

Парагемолитические вибрионы - условно патогенные галофильные микроорганизмы семейства Vibrionaceae, обитающие в соленых водоемах. Выделяют их из морской воды, рыб, креветок, мидий, устриц, омаров, крабов. Впервые *V. parahaemolyticus* стал известен как причина крупной вспышки токсикоинфекции в Японии в 1950 г., связанной с употреблением в пищу слабосоленой рыбы. Крупные вспышки отмечены в 1984-1986 гг. на побережье Черного и Азовского морей в городах Бердянске, Мариуполе, Николаеве, Керчи. Спорадические заболевания имели место на побережье Балтийского и Японского морей, соленых озер Узбекистана и Туркмении. Во Владивостоке в 1997, 2001 гг. зарегистрированы вспышки острой кишечной инфекции, обусловленные вибрионами этого вида. Фактором передачи инфекции явились варено-мороженые креветки и другие морепродукты. В 2001 г. в Запорожской области Украины отмечены групповые острые кишечные заболевания, связанные с употреблением кильки сухого посола, контаминированной парагемолитическими вибрионами.

Опасность заражения парагемолитическими вибрионами существует везде, где население использует в питании продукты моря. Заболевания возникают, в основном, в теплое время года, зачастую в момент массового отлова рыбы, моллюсков, ракообразных. В местах, удаленных от побережья, отмечены заболевания, связанные с завозом инфицированных продуктов моря. Риск возникновения заболеваний увеличивается с ростом импортируемой продукции из регионов, потенциально опасных по возможности возникновения вспышек пищевых токсикоинфекций, обусловленных парагемолитическими вибрионами. Зарегистрированы случаи выделения парагемолитических вибрионов от больных острыми кишечными инфекциями, из гидробионтов, водоемов и в пресноводном регионе (дельте Волги). Отмечены случаи вторичного инфицирования овощных продуктов при обработке их водой, содержащей парагемолитические вибрионы. Острые кишечные заболевания, вызываемые *V. parahaemolyticus*, относят к пищевым токсикоинфекциям (ПТИ), возникающим при употреблении в пищу продуктов, в которых произошло массовое размножение микроорганизмов-возбудителей и накопление их токсинов. У парагемолитических вибрионов известны термостабильный прямой гемолизин (ТПГ), детерминируемый *tdh*-геном, термолабильный гемолизин и неидентифицированный энтеротоксин. Инфективная доза возбудителя составляет 10^5 - 10^6 вибрионов в 1 грамме продукта. Особую опасность представляют сырые гидробионты, в которых концентрация *V. parahaemolyticus* может достигать 10^9 в грамме, а также продукты, подвергнутые недостаточной кулинарной обработке. Хотя парагемолитические вибрионы чувствительны к высокой температуре, находясь внутри больших кусков рыбы или крупных крабов, они могут выдерживать термическую обработку. Время генерации этого микроорганизма составляет 12 мин при температуре 30-37 °С, поэтому при неправильном хранении вибрионы довольно быстро размножаются с накоплением экзотоксинов в продуктах. Употребление их в пищу приводит к развитию токсикоинфекции. В малосоленой и недоявленной рыбе при определенной температуре вибрионы не только сохраняются, но и размножаются.

Требования к качеству рыбы, нерыбных объектов промысла и продуктов, вырабатываемых из них, определены СанПиН 2.3.2.1078-01 "Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов".

Одним из микробиологических показателей оценки безопасности этих продуктов является *V. parahaemolyticus*. Определение его осуществляется по массе продукта, в которой не допускается присутствие парагемолитических вибрионов, или по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г продукта.

Исследование рыбы и морских беспозвоночных на присутствие парагемолитических вибрионов проводят в порядке текущего надзора (контроля) на этапах производства и реализации, по эпидемическим показаниям, а также в случае возникновения неблагоприятной экологической ситуации в регионе лова рыбы, моллюсков и ракообразных.

При выявлении в прибрежных морских зонах спорадических или групповых случаев заболевания, обусловленных парагемолитическими вибрионами, а также при возникновении неблагоприятной экологической ситуации проводят исследование воды открытых водоемов и обитающих в них гидробионтов, а также свежельовленных гидробионтов в местах их

организованной и неорганизованной реализации.

3. Отбор проб для микробиологического анализа

Микробиологическому анализу подлежат: сырье, используемое для производства различных видов рыбной продукции, употребляемые в пищу в сыром виде продукты моря, различные виды готовой продукции, соленая, вяленая, копченая рыба, консервы, икра и т.д. в соответствии с перечнем групп продуктов в санитарно-эпидемиологических правилах и нормативах СанПиН 2.3.2.1078-01 "Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов", разделе 1.3. Отбор проб и подготовку к исследованию осуществляют согласно ГОСТ 26668-85 "Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов", ГОСТ 26669-85 "Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов", ГОСТ 7631-85 "Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний", а также "Инструкции по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных" N 5319-91 от 22.02.91, утв. МЗ СССР, и справочника "Санитарная микробиология" (1998 г.) Пробы для бактериологического исследования собирают до изъятия образцов для органолептического и химического анализа.

Пробы продуктов отбирают асептическим способом, исключающим микробное загрязнение из окружающей среды, и переносят в стерильную посуду или на стерильную бумагу, фольгу с помощью стерильных инструментов (ножа, пинцета, ложки, пробоотборника). Масса (объем) пробы, устанавливаемая в соответствии с нормативно-техническими документами на конкретный вид продукции, должна быть достаточной для выполнения микробиологического анализа и соответствовать требованиям санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.3.2.1078-01 "Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов", определяющим допустимые концентрации этих микроорганизмов в 1 г исследуемого продукта или отсутствие их в навеске 25 г. Общая масса пробы должна быть около 200 г, а икры - 25 г.

Из каждой партии 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, мелкую рыбу (3-10 штук) берут целиком из разных мест исследуемой партии. Гидробионтов (мелких рыб, мидий, устриц, креветок, крабов) отлавливают и доставляют в лаборатории в ведрах, банках или других сосудах с водой, в которой они находились до отлова. Морскую воду для качественного исследования отбирают в объеме 1,0 л, а для количественного - в объеме 200 мл в стерильную посуду с непромокаемой пробкой. В лабораторию пробы доставляют в печатанном виде с сопроводительными документами. Материал исследуют немедленно после доставки.

Порядок отбора, доставки и исследования материала от больного, проб воды и других объектов описан в методических указаниях МУ 4.2.1097-02 "Лабораторная диагностика холеры" и МУК 4.2.1793-03 "Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых паразитическими и другими патогенными для человека вибрионами".

4. Подготовка проб к исследованию

Из поступивших в лабораторию проб продуктов берут навеску 25 г, измельчают и гомогенизируют в размельчителе тканей (например, блендере, гомогенизаторе типа Stomacher со стерильными пакетами или других с аналогичными характеристиками, разрешенных к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке) или тщательно растирают в стерильной ступке с 2-3 г стерильного кварцевого песка.

При количественном определении парагемолитических вибрионов измельченную навеску переносят в стерильную колбу с 225 мл 0,1%-го раствора пептонной воды с 3% натрия хлорида (п.7.2.1.2), получая исходное разведение 1:10. Взвесь тщательно взбалтывают, не допуская намочения пробки, дают отстояться и из надосадочной жидкости готовят десятикратные разведения (1:100, 1:1000) путем последовательного переноса по 1,0 мл из предыдущего разведения в 9,0 мл разводящей жидкости, каждый раз меняя пипетку для смешивания и переноса взвеси. В качестве разводящей жидкости могут быть использованы 0,1%-й раствор пептона с 3% натрия хлорида или фосфатный буферный раствор (п.7.2.1.1). При контроле на соответствие СанПиН 2.3.2.1078-01 "Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов" готовят десятикратные разведения до 10^{-3} , а при расследовании вспышек пищевых токсикоинфекций (ПТИ) - до разведения 10^{-7} . Во избежание ошибок при количественном определении парагемолитических вибрионов интервал между приготовлением разведений исследуемого продукта и посевом на питательные среды должен быть не более 45 мин.

Для определения присутствия (отсутствия) парагемолитических вибрионов в исследуемой пробе всю гомогенизированную навеску в 25 г переносят в 125 мл жидкой среды обогащения - 1%-й пептонной воды с 3% натрия хлорида и ингибиторами роста сопутствующей микрофлоры или без них. Исследования проводят с соблюдением требований санитарно-эпидемиологических правил СП 1.2.731-99 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами" в лабораториях, имеющих лицензии на работу с микроорганизмами III-IV групп патогенности.

5. Схема бактериологического анализа

Метод основан на выявлении в посевах исследуемого материала на элективных агаровых средах колоний, подозрительных на парагемолитические вибрионы, последующего выделения из них чистой культуры и идентификации ее по набору признаков, определяющих принадлежность к виду *V. parahaemolyticus*.

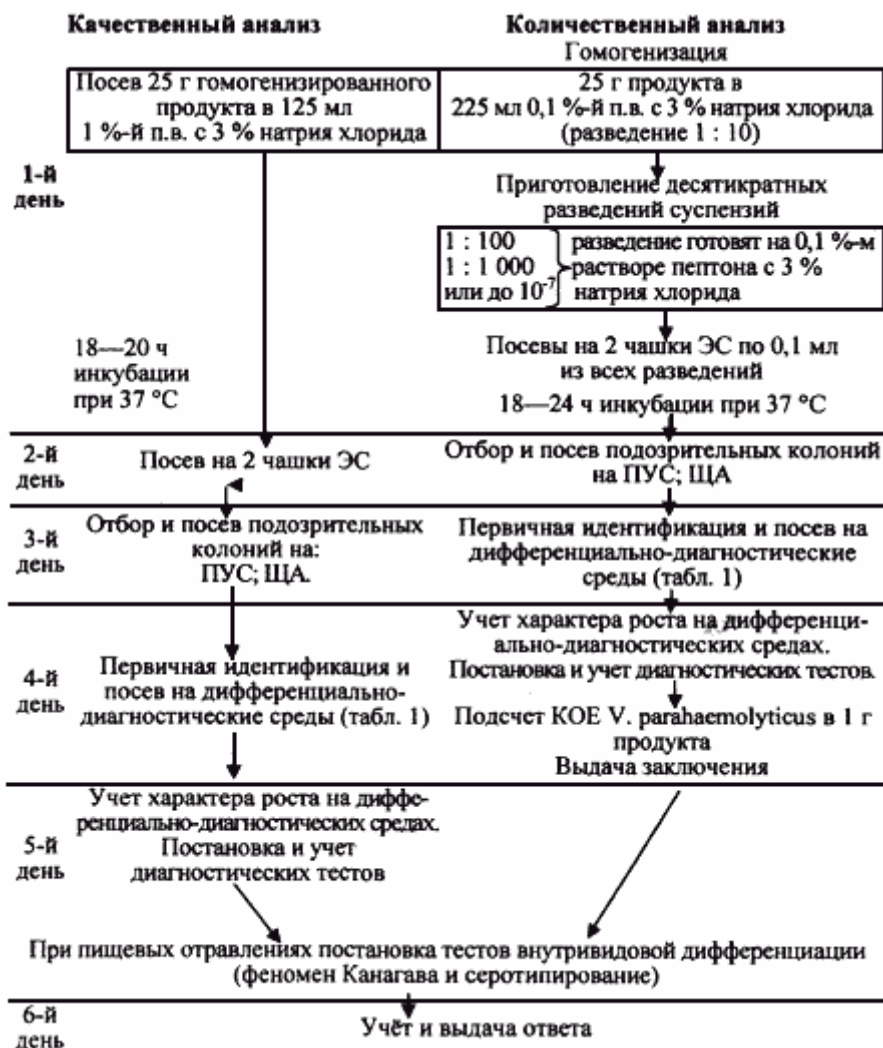
В работе используют готовые питательные среды, разрешенные к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке, и лабораторного изготовления. Обогащительные и элективные среды должны содержать натрия хлорида до 3%, а дифференциально-диагностические - от 1,5 до 3,0%.

5.1. Исследование пищевых продуктов

Порядок исследования и содержание работы по этапам схематически представлены на рис.1.

Рис.1

СХЕМА бактериологического исследования пищевых продуктов на парагемолитические вибрионы



Обозначения: п.в. - пептонная вода; ПУС - полиуглеводная среда; ЩА - щелочной агар; ЭС - элективная среда.

При количественном анализе из разведений пробы 1:10, 1:100 и 1:1000 высевают по 0,1 мл на 2 чашки с элективной агаровой средой, например: питательной средой элективно-дифференциальной для выделения холерного вибриона сухой - СЭДХ - ВФС 42-411 ВС-93, селективной средой для выделения патогенных вибрионов - ТСBS или дифференциально-диагностический агар с пенициллином - ДДА (п.7.2.1.6.) Посевной материал распределяют по поверхности агара и дают подсохнуть. Посевы помещают в термостат при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ на 18-24 ч.

При качественном анализе посевы в накопительные среды инкубируют при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч, после чего делают высев петлей с поверхностного слоя обогатительной среды на 1-2 чашки элективной среды для получения роста в виде изолированных колоний.

5.1.1. Отбор колоний и идентификация выделенных культур

Изучают рост на элективных средах, отбирают подозрительные на параземолитические вибрионы колонии. При количественном анализе для подсчета отбирают чашки с посевом двух последовательных разведений, где выросло не более 300 колоний. Необходимо, чтобы хотя бы в одной чашке содержалось не менее 15 колоний. С каждой из 4-х отобранных для подсчета чашек отсевают по 5 колоний. Параземолитические вибрионы на элективной среде формируют колонии правильной округлой формы, плосковыпуклые, полупрозрачные в проходящем свете с влажной

блестящей поверхностью размером 2-3 мм в диаметре, не отличающиеся по цвету от голубовато-зеленого цвета элективных сред (СЭДХ, ТСBS, ДДА), т.к. вибрионы этого вида не ферментируют сахарозу, входящую в них. Подозрительные колонии отсеивают на щелочной агар - питательную среду для выделения и культивирования холерного вибриона, сухую (ФС 42-213 ВС-88) и на одну из полиуглеводных сред Ресселя (п.7.2.1.7), Клигlera (ФС 42-3387-97) или другие с аналогичными характеристиками, разрешенные к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке.

На полиуглеводных средах отбирают культуры с типичным для параземолитических вибрионов ростом. На среде Ресселя и Клигlera отмечают характерное для кислой реакции изменение цвета столбика при сохранении цвета скошенной части агара.

Культуры, выросшие на щелочном агаре, изучают на наличие цитохромоксидазы. Из оксидазопозитивных готовят мазки по Граму.

Для дальнейшей идентификации отбирают оксидазопозитивные грамотрицательные культуры с характерным ростом на полиуглеводных средах. Отобранные культуры изучают по набору признаков (подвижность, лизиндекарбоксилаза, аргининдигидролаза, индол, рост в средах с различными концентрациями натрия хлорида, ферментация/окисление глюкозы на среде Хью и Лейфсона (п.7.2.1.8), арабинозы, сахарозы, целлобиозы, салицина, реакция Фогес-Проскауэра), методами, описанными в разделе 6 и методических указаниях МУ 4.2.1097-02 "Лабораторная диагностика холеры".

При расследовании случаев заболевания, обусловленных *V. parahemolyticus*, выделенные культуры изучают по расширенному набору признаков, приведенному в табл.1, а также по тестам внутривидовой дифференциации: серотипированию и феномену Канагава.

Таблица 1

Свойства параземолитических вибрионов и сходных с ними микроорганизмов

Основные признаки	Микроорганизмы									
	<i>V. parahemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. anguillarum</i> *	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Proteus</i>	
Окраска по Граму	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Подвижность	+	+	+	+	+	+(-)	+	+	+	+(-)
Оксидаза	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Роение на агаре	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Рост в пептонной воде, содержащей натрия хлорида	0%	-	-	-	+	-(+)	+	+	+	+
	3%	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-
	8%	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	10%	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Индол	+	+	+	+	+	+(-)	-	-	-	+/-

Сероводород	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	
Реакция Фогес-Проскауэра	-	+	-	+(-)	+	+(-)	-	-	-	
Нитратредуктаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
β -галактозидаза	-	-	+/-	+	+	+	+	-	-	
Аргининдигидролаза	-	-	-	-	+(-)	+	+	+	-	
Лизиндекарбоксилаза	+	+	+	+	-	-(+)	+	+/-	-	
Орнитиндекарбоксилаза	+	+		+		-	+	+	+/-	
О/Ф глюкозы в среде Хью-Лейфсона	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	
Газ на среде с глюкозой	-	-	-	-	-	+/-	-	+	+/-	
Ферментация	Арабинозы	+/-	-	-	-	+	-(+)	-	+/-	-
	Глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Лактозы	-	-	+/-	-	-	-	+	-	-
	Маннозы	+	+	-	+	+	+/-	-	+/-	-
	Сахарозы	-	+	-	+	+	+	-	+/-	+/-
	Целлобиозы	-	-	+	-	+				
	Маннита	+	+	+(-)	+	+	+	-	+/-	+/-
	Салицина	-	-	+	-	-	+	-	-	-/+
Гидролиз мочевины	-(+)	-	-	-	-	-	-	-	+	

Условные обозначения:

+ положительный результат в 90%;

- отрицательный результат в 90%;

+/- признак variabelен;

+(-) или -(+) в скобках - редко наблюдаемый результат;

* - *V. anguillarum* реклассифицирован в *Listonella anguillarum* (McC Donell M.T., Colwell R.R., 1985), является возбудителем инфекционного заболевания рыб и других гидробионтов, обитающих в соленых и реже - в пресных водоемах. Роль в патологии человека микроорганизмов этого вида не установлена;

О/Ф тест окисления / ферментации глюкозы в среде Хью-Лейфсона.

5.1.2. Обработка результатов

Количество парагемолитических вибрионов в 1 г продукта (N) в соответствии с ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218-96) "Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований" подсчитывают по формуле:

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1n_2)d},$$

где $\sum a$ - сумма парагемолитических вибрионов, рассчитанная по формуле:

$$a = \frac{b}{A} C,$$

где a - количество вибрионов для каждой чашки;

b - количество колоний, микроорганизмы которых идентифицированы как *V. parahaemolyticus*;

A - количество колоний, отобранных для идентификации;

C - общее число выросших на чашке колоний;

V - объем посевного материала, внесенного в каждую чашку, см³;

n_1 - количество отобранных для подсчета чашек в первом разведении;

n_2 - количество отобранных для подсчета чашек во втором разведении;

d - коэффициент разбавления, соответствующий первому разведению.

Если в каждой из двух чашек, отобранных для подсчета колоний, содержится их менее 15, то приближенное количество микроорганизмов в 1 г продукта (N_E) рассчитывают по формуле:

$$N_E = \frac{\gamma}{d},$$

где γ - среднее арифметическое колоний, подсчитанных в указанных двух чашках;

d - коэффициент разбавления исходной суспензии.

Если две чашки не содержат колоний на уровне исходной суспензии, то результаты выражают следующим образом:

- менее $\frac{1}{d}$ микроорганизмов в 1 г, где d - коэффициент разбавления исходной суспензии.

Доверительный интервал, характеризующий статистическое распределение микроорганизмов в пробе, рассчитывают в соответствии с ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218-96) "Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований".

5.2. Исследование воды поверхностных водоемов и обитающих в ней гидробионтов

Воду и гидробионтов исследуют качественным и количественным методами при проведении санитарно-эпидемиологического расследования.

5.2.1. Качественный анализ воды

Исследование воды отличается от схемы анализа пищевых продуктов, приведенной на рис.1, только на первом этапе. К 1,0 л исследуемой воды добавляют основной 10%-й раствор пептона, приготовленный из пептона основного сухого (ФСП 42-002-621-2801) до 1%-й концентрации. При необходимости ингибиции посторонней микрофлоры используют пептонную воду с теллуридом калия или препаратом "Прогресс", или другие препараты с аналогичными свойствами, разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке (п.7.2.1.4). Посевы инкубируют 18-20 ч при 37 °С. Дальнейшие этапы исследования воды совпадают с этапами исследования пищевых продуктов (рис.1).

5.2.2. Количественное исследование воды

Воду исследуют в объемах 50, 10 и 1 мл в трех параллельных пробах. Объемы воды 10 мл и 1 мл засевают в 50 мл 1%-й пептонной воды с 3% NaCl (п.7.2.1.3), а в пробы объемом 50 мл добавляют 5 мл основного раствора пептона. Дальнейшее исследование всех проб проводят по схеме качественного анализа пищевых продуктов, представленной на рис.1. По окончании идентификации выделенных культур подсчитывают число проб, из которых выделены параземолитические вибрионы (положительный результат). В зависимости от различных комбинаций положительных и отрицательных результатов определяют наиболее вероятное число (НВЧ) параземолитических вибрионов в 100 мл воды по таблицам Swaгоор, опубликованным в методических указаниях МУК 4.2.671-97* "Методы санитарно-микробиологического анализа питьевой воды".

* На территории Российской Федерации действуют МУК 4.2.1018-01. Здесь и далее по тексту. - Примечание изготовителя базы данных.

5.2.3. Исследование гидробионтов

Доставленные в лабораторию гидробионты исследуют по схеме, представленной на рис.1.

5.3. Оценка результатов исследования объектов окружающей среды

При контроле пищевых продуктов на этапах их производства и реализации оценивают соответствие полученных результатов гигиеническим критериям их безопасности, предусмотренным санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами СанПиН 2.3.2.1078-01 "Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов".

В случае санитарно-эпидемиологического расследования вспышек, обусловленных параземолитическими вибрионами, культуры этих микроорганизмов, выделенных из продуктов, морской воды и обитающих в ней гидробионтов изучают по тестам внутривидовой дифференциации. Доказательством роли объектов внешней среды, контаминированных параземолитическими вибрионами, в возникновении заболевания является:

- обнаружение в объектах окружающей среды и от больных людей Канагава-позитивных *V. parahaemolyticus*;
- выделение от больных, из пищевых продуктов, морской воды и обитающих в ней гидробионтов вибрионов идентичных серологических групп.

Индекс парегемолитических вибрионов в воде морских прибрежных зон должен быть не выше 1000 КОЕ в 1 л в местах рекреации и 500 КОЕ в 1 л - в местах водозабора. В сырых гидробионтах с учетом возможного использования их в пищу в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами СанПиН 2.3.2.1078-01 "Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов" допускается присутствие *V. parahaemolyticus* в количестве 100 КОЕ в 1 г. Превышение этих показателей позволяет оценить эпидемическую обстановку в плане возможного распространения инфекции как опасную.

Объем и характер санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий в каждом конкретном случае с учетом полученных результатов определяют эпидемиологи и гигиенисты.

6. Методы изучения свойств парегемолитических вибрионов

6.1. Определение подвижности

Подвижность определяют при микроскопировании раздавленной капли с помощью фазово-контрастного устройства или посевом в 0,3%-й агар, приготовленный из мясо-пептонного агара (МПА) с 3% натрия хлорида (п.7.2.1.5).

6.2. Определение цитохромоксидазы

Для постановки теста используют реактивы: 1%-е водные растворы диметил-пара-фенилендиамина, тетраметил-пара-фенилендиамина (гидрохлорида) и пара-аминодиметиланилина (гидрохлорида или оксалата). Первые два реактива используют самостоятельно, последний в сочетании с 1%-м спиртовым раствором α -нафтола.

Постановка реакции

Первый способ.

Для постановки пробы можно использовать бумажки из наборов систем индикаторных бумажных для идентификации микроорганизмов (набор N 1 для вибрионов; набор N 2 для межродовой дифференциации энтеробактерий) - СИБ (ФС 42-3566-98) или пропитать полоску фильтровальной бумаги 2-3 каплями однокомпонентного 1%-го реактива или смесью 1%-го раствора реактива с α -нафтолом в соотношении 2:3. На обработанную реактивом полоску бумаги наносят платиновой петлей, деревянной или стеклянной палочкой исследуемую культуру. При появлении красного или синего окрашивания через 30-60 с реакцию считают положительной.

Второй способ.

На поверхность колонии 18-24-часовой культуры, выросшей на щелочном агаре, наносят каплю однокомпонентного реактива. Положительная реакция - красная окраска появляется через 20-30 с. При использовании двухкомпонентной реакции (с α -нафтолом) в положительных случаях появляется синее окрашивание культуры. Из граммотрицательных бактерий положительную пробу на цитохромоксидазу дают вибрионы, аэромонады, плезиомонады, а отрицательную - энтеробактерии.

6.3. Определение галофильности и солевой толерантности

Суточную агаровую культуру засевают в 1%-ю пептонную воду с 1% натрия хлорида (п.7.2.1.3).

Через 3-4 ч инкубации при температуре $(37\pm 0,5)$ °С переносят строго по 1 капле выросшей культуры в пептонную воду без соли и с 3, 6, 8 и 10% натрия хлорида. Через 18-20 ч инкубации оценивают рост по помутнению среды.

Пептонную воду готовят из сухих компонентов без натрия хлорида и с внесением в нее необходимой навески соли.

Негалофильные вибрионы растут в отсутствии соли в среде. Галофильные вибрионы не растут в 1%-й пептонной воде без добавления натрия хлорида и устойчивы к различным его концентрациям.

6.4. Выявление способности к роению

На пластинке МПА с 3% натрия хлорида (п.7.2.1.5) алгинолитические вибрионы, в отличие от большинства штаммов парагемолитических, растут в виде сплошного налета, напоминающего рост вульгарного протей. Для выявления феномена роения суточную агаровую культуру наносят в центр подсушенной пластины щелочного агара и сутки инкубируют при $(37\pm 0,5)$ °С. Роящиеся культуры распространяются по поверхности всей среды, а нероящиеся - вырастают только на месте посева.

6.5. Биохимические тесты

Тип расщепления глюкозы, декарбоксилазную активность, ферментацию углеводов и спиртов, гидролиз мочевины, образование индола, сероводорода определяют с использованием общепринятых питательных сред, содержащих 1,5% натрия хлорида.

6.6. Определение β -галактозидазы

Суточную агаровую культуру засевают на скошенную поверхность агара, содержащего 10% лактозы. Посевы инкубируют 1-2 суток при температуре $(37\pm 0,5)$ °С. Петлю культуры суспендируют в 0,25 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида, добавляют 0,25 мл водного раствора ортонитрофенил- β -D-галактопиранозида (ONPG) и помещают в термостат при $(37\pm 0,5)$ °С. Для приготовления раствора ONPG 80 мг вещества растворяют в 15 мл дистиллированной воды при 37 °С. Затем добавляют 5 мл фосфатного буфера и доводят pH до 7,0. Раствор должен быть бесцветным. Хранят его при 4 °С. Перед использованием выдерживают несколько минут при 37 °С до растворения фосфата, который на холоде кристаллизуется. Реакцию учитывают через 20 мин, 1, 3 и 24 ч. В положительном случае взвесь приобретает желтую окраску, отрицательном - остается бесцветной.

6.7. Постановка реакции Фогес-Проскауэра

Культуру засевают в глюкозофосфатный бульон Кларка (ВФС 42-46 ВС-86) и инкубируют при температуре $(37\pm 0,5)$ °С в течение 1-3 суток. Затем к 1 мл культуры добавляют 0,6 мл 6%-го спиртового раствора альфа-нафтола и 0,4 мл 40%-го раствора едкого калия. Пробирки встряхивают и помещают на 1 ч в термостат. При положительной реакции среда окрашивается в розовый или красный цвет.

6.8. Определение нитратредуктазы

а) Суточную агаровую культуру засевают в 1 мл бульона Хоттингера с 0,1% калия азотно-кислого. После 2-х суток инкубации при температуре (37±0,5) °С в посевы добавляют 0,5 мл реактива Грисса. В положительных случаях среда сразу же окрашивается в красный цвет.

б) К 1-2-суточной культуре в бульоне Хоттингера с 0,1% KNO₃ добавляют 3-5 капель реактива, представляющего собой смесь равных объемов 0,1%-го раствора риванола в дистиллированной воде и 12%-го раствора соляной кислоты. В случае положительной реакции бульон окрашивается в красный цвет.

6.9. Серологическое типирование параземолитических вибрионов

В основу серологической классификации параземолитических вибрионов положены различия в строении О- и К-антигенов. Известно 12 типов термостабильного О-антигена и 68 термолабильного К-антигена. Каждый К-антиген сочетается с одним и тем же О-антигеном, образуя ту или иную серогруппу (табл.2).

Таблица 2

Схема серотипирования *V. parahaemolyticus* (Sakazaki R., 1979)

О-группы	К-антиген
O1	1, 25, 26, 32, 38, 41, 56, 58*
O2	3, 28
O3	4*, 5, 6, 7, 29, 30*, 31, 33, 37, 43, 45, 48, 54, 57, 58*, 59
O4	4*, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 34, 42, 49, 53, 55
O5	15, 17, 30*, 47, 60
O6	18, 46
O7	19*
O8	20, 21, 22, 39
O9	23, 44
O10	19*, 24, 52
O11	36, 40, 50, 51
O12	61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71

Условные обозначения:

* - К-антигены, принадлежащие к двум О-серогруппам.

Используют наборы агглютинирующих О- и К-сывороток для серологического типирования на стекле, разрешенные к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке (например, Toshiba Kazaki Co. Ltd и др.). Для определения К-антигена исследуют точную агаровую живую культуру, О-антигена - убитую двухчасовым кипячением.

Групповые заболевания чаще обуславливают парагемолитические вибрионы серогрупп О4:К12, О4:К8, О3:К6, спорадические - О3:К33, О3:К57, О5:К47, О6:К46, О10:К52.

6.10. Определение патогенных свойств парагемолитических вибрионов

О патогенности парагемолитических вибрионов судят по способности вызывать гемолиз на среде Вагатцума (п.7.2.1.10). Этот тест назван феноменом Канагава. По результатам тестирования штаммы делят на Канагава-положительные, образующие зону β -гемолиза и Канагава-отрицательные, не лизирующие эритроциты человека. Гемолиз на среде Вагатцума обусловлен способностью парагемолитических вибрионов продуцировать прямой термостабильный гемолизин, обладающий энтеротоксигенными свойствами.

Постановка теста

Суточную бульонную культуру наносят каплей на пластину свежеприготовленной среды Вагатцума. Посевы инкубируют при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ 24-48 ч. Результат учитывают по величине и полноте зоны гемолиза. Штаммы оценивают как Канагава-позитивные, если зона четкого лизиса достигает 3-х и более миллиметров, считая от края колонии до наружного края зоны. При зоне менее 3 мм результат оценивают как слабо положительный.

7. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, питательные среды и тест-штаммы

7.1. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда

Перечень аппаратуры, оборудования лаборатории и требования к ним представлены в ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218-96) "Продукты пищевые. Общие правила микробиологического исследования".

7.2. Питательные среды и тест-системы для выделения и идентификации парагемолитических вибрионов

7.2.1. Растворы и среды лабораторного изготовления

7.2.1.1. Фосфатный буферный раствор для подготовки проб к исследованию, 01 М, рН 7,4-7,5 (PBS).

Двузамещенный фосфорно-кислый натрий Na_2HPO_4 (безводный) -12,0 г.

Однозамещенный фосфорно-кислый натрий $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 2,2 г.

Натрия хлорид - 85,0 г.

Дистиллированная вода - 1,0 л.

Способ приготовления. Растворить ингредиенты в малом объеме дистиллированной воды в

колбе. После растворения довести объем дистиллированной водой до 1,0 литра. Перед использованием развести бидистиллированной водой 1:10. В случае необходимости довести рН до 7,4-7,5 с помощью 0,1 н HCl или 0,1 н NaOH. Стерилизовать 15 мин при 121 °С.

7.2.1.2. Раствор 0,1%-й пептонной воды с 3% натрия хлорида (для подготовки проб к исследованию).

Пептон ферментативный - 1,0 г.

Натрия хлорид - 30,0 г.

Вода дистиллированная - 1 л.

Ингредиенты перемешивают, подщелачивают 20%-м раствором гидроокиси натрия до рН $8,5 \pm 0,1$. Варят в автоклаве текучим паром в течение 40 мин. Фильтруют через ватный фильтр. Устанавливают рН $8,0 \pm 0,2$ с помощью 18%-го раствора соляной кислоты. Среду разливают в емкости и стерилизуют при температуре 112 °С в течение 20 мин.

7.2.1.3. Пептонная вода 1%-я с 3, 6, 8, 10% натрия хлорида (для определения солевой толерантности).

Пептон ферментативный - 10,0 г.

Натрия хлорид - 30,0 (80,0; 100,0) г.

Калия нитрат - 0,1 г.

Вода дистиллированная - 1,0 л.

рН $8,2 \pm 0,2$.

В воду очищенную вносят пептон ферментативный и требуемую навеску натрия хлорида. Подщелачивают 20%-м раствором гидроокиси натрия до рН $8,6 \pm 0,1$. Варят текучим паром в автоклаве 40 мин или кипятят до растворения ингредиентов. Добавляют навеску калия нитрата, перемешивают, фильтруют через ватный фильтр и устанавливают рН с помощью 18%-го раствора соляной кислоты.

Среду для определения галофильности - 1%-ю пептонную воду без натрия хлорида готовят по этой прописи, но без добавления натрия хлорида. Эту среду не допускается готовить из основного раствора пептона, так как в нем уже содержится натрия хлорид.

7.2.1.4. Пептонная вода с ингибиторами (теллуридом калия или препаратом "Прогресс").

В 1%-ю пептонную воду с 3% натрия хлорида после автоклавирования добавляют теллурид калия в конечном разведении 1:100000 или 1:200000, или же к 1%-й пептонной воде добавляют 0,1-0,2% моющего средства "Прогресс". Конечная концентрация ингибиторов в средах может быть изменена с учетом результатов контроля. Водный раствор натриевых солей вторичных алкилсульфатов в виде моющего вещества "Прогресс-30" или "Прогресс-40" по ТУ 38.10719-77.

7.2.1.5. Мясопептонный агар МПА с 3% натрия хлорида.

Мясная вода - 1,0 л.

Пептон ферментативный - 10,0 г.

Натрия хлорид - 30,0 г.

Агар микробиологический (ГОСТ 17206-96) - $(13,0 \pm 1,0)$ г.

pH 8,0±0,2.

В мясную воду вносят пептон ферментативный и натрия хлорид, перемешивают и подщелачивают 20%-м раствором гидроксида натрия до pH 8,5±0,1. Затем добавляют агар микробиологический. Варят в автоклаве текучим паром (50±10) мин. Фильтруют через ватный фильтр. Устанавливают pH 8,0±0,2 с помощью 18%-го раствора соляной кислоты. Среду разливают в посуду и стерилизуют в автоклаве при 112 °С в течение 20 мин. При необходимости в состав среды вводят 0,1-0,2% препарата "Прогресс" (перед автоклавированием или в стерильный агар с последующим 10-минутным кипячением). Теллурид калия добавляют к автоклавированной среде перед ее использованием в конечном разведении 1:100000 или 1:200000.

7.2.1.6. Дифференциально-диагностический агар с пенициллином ДЦА.

Среда рекомендована методическими документами: "Временные методические рекомендации по контролю за содержанием паразитического вибриона в рыбе и рыбопродуктах. Методы исследования и нормативы" N 3933-85, утв. Зам. Главного государственного санитарного врача СССР, "Методические указания по контролю в рыбных продуктах паразитических вибрионов - возбудителей пищевых токсикоинфекций" N 5780-91, утв. Зам. Главного государственного санитарного врача СССР и Зам. Министра рыбного хозяйства СССР, "Временная инструкция по борьбе с вибриозом рыб" 1998 г., Министерство сельского хозяйства и продовольствия РФ, Департамент ветеринарии.

Рыбо- или мясопептонный агар 2%-й щелочной - 1 л.

Натрия хлорид - 25,0 г.

Сахароза - 15,0 г.

Пенициллин - 5000 ЕД.

Бромтимоловый синий (1,6%-й спиртовой раствор) - 10,0 мл.

Жидкость "Прогресс-30" или "Прогресс-40" - 1-2 мл.

Калия теллурид (1:1000) - 7,5 мл.

К стерильному расплавленному рыбо- или мясопептонному агару (pH 8,0), охлажденному до 50 °С, добавляют указанные ингредиенты и, не стерилизуя, разливают в чашки Петри. Среда имеет сине-зеленый цвет, хранят в холодильнике до 14 суток.

Паразитические вибрионы, не ферментирующие сахарозу, растут в виде голубоватых колоний, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* и *V. cholerae* - колоний желтого цвета. Некоторые штаммы аэромонад и псевдомонад формируют колонии желтого цвета.

7.2.1.7. Среда Расселя.

К расплавленному и охлажденному до 50-60 °С 1,5%-му мясопептонному агару или агару Мартена pH 7,3±0,1 добавляют лактозу - 10,0 г/л, глюкозу - 1,0 г/л, индикатор Андрее - 20-40 мг/л (количество которого устанавливают экспериментальным путем в зависимости от качества используемого для приготовления фуксина кислого). Среду разливают в стерильные пробирки по 7-8 мл и стерилизуют в автоклаве при 104 °С 20 мин. После стерилизации среду скашивают так, чтобы в каждой пробирке были столбик и скошенная часть.

7.2.1.8. Среда Хью-Лейфсона.

Пептон ферментативный - 2,0 г.

Натрия хлорид - 15,0 г.

Калий фосфорно-кислый двузамещенный - 0,3 г.

Глюкоза - 10,0 г.

Бромтимоловый синий (1%-й водный раствор) - 3,0 мл.

Агар микробиологический (ГОСТ 17206-96) - 3,0 г.

Вода дистиллированная - 1,0 л.

pH после стерилизации $7,2 \pm 0,1$.

К воде дистиллированной добавляют пептон ферментативный, натрия хлорид, калий фосфорно-кислый двузамещенный, агар микробиологический. Подщелачивают 20%-м раствором гидроокиси натрия до pH $8,5 \pm 0,1$. Доводят до кипения и кипятят до расплавления агара и растворения ингредиентов. Фильтруют через ватный фильтр. Устанавливают pH $7,4 \pm 0,1$ с помощью 18%-го раствора соляной кислоты. Добавляют глюкозу и 1%-й водный раствор бромтимолового синего. Среду разливают в пробирки по 5,0 мл и стерилизуют при $112\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 мин. Цвет среды после стерилизации травянисто-зеленый. При кислой реакции среда желтеет.

7.2.1.9. Среды для определения декарбоксилаз и дигидролазы аминокислот (Среды Меллера.)

Пептон ферментативный - 5,0 г.

Дрожжевой экстракт - 3,0 г.

Натрия хлорид - 15,0 г.

Глюкоза - 1,0 г.

Вода дистиллированная - 1,0 л.

Бромкрезоловый пурпурный (1,6%-й спиртовой раствор) - 0,6 мл.

Крезоловый красный (0,1%-й спиртовой раствор) - 5,0 мл.

L-аминокислота - 10,0 г

или DL-аминокислота - 20,0 г.

В воду очищенную вносят пептон ферментативный, дрожжевой экстракт, натрия хлорид и глюкозу. Подщелачивают 20%-м раствором гидроокиси натрия до pH $8,0 \pm 0,2$. Варят текучим паром 40 мин или кипятят до растворения ингредиентов. Фильтруют через ватный фильтр. Устанавливают pH $6,4 \pm 0,1$ с помощью 18%-го раствора соляной кислоты. Добавляют навеску соответствующей аминокислоты (в контрольный вариант аминокислоту не добавляют). Затем вносят необходимые количества индикаторов. Среду разливают в стерильные, химически чистые пробирки по 1-2 мл и стерилизуют при $104\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 мин. Цвет готовой среды темно-сиреневый.

7.2.1.10. Среда Вагатиума для изучения гемолитической активности параземолитических вибрионов.

Пептон ферментативный - 1,0 г.

Дрожжевой экстракт сухой - 0,3 г.

Натрия хлорид - 7,0 г.

Калий двузамещенный фосфорно-кислый - 0,5 г.

Агар микробиологический (ГОСТ 17206-96) - 13,0±1,0.

Дистиллированная вода - 100,0 мл.

Все компоненты растворяют при нагревании, но не стерилизуют, добавляют 1 г маннита, 0,1 мл 0,1%-го спиртового раствора кристалл-виолета, 5 мл дефибринированной крови человека и разливают по чашкам.

7.3. Контроль питательных сред для выделения парагемолитических вибрионов

Контроль питательных сред и ингибиторов роста посторонней микрофлоры проводят в соответствии с "Инструкцией по бактериологическому контролю диагностических питательных сред для холерного вибриона" 1983 г., утв. Начальником Главного управления карантинных инфекций МЗ СССР, используя вместо тест-штаммов холерного вибриона тест-штамм *V. parahaemolyticus*, а для оценки показателя ингибиции - *E. coli* и *P. vulgaris*.

В качестве ингибиторов роста используют теллурид калия, контроль которого описан в упомянутой выше инструкции, и препарат "Прогресс", обеспечивающий торможение роста протей и алгинолитических вибрионов.

Каждая серия ингибиторов подлежит предварительному контролю на отсутствие бактерицидного эффекта по отношению к тест-штамму *V. parahaemolyticus* при обеспечении ингибирующего действия по отношению к тест-штаммам *P. vulgaris* и *E. coli*.

Препарат "Прогресс" контролируют до и после его стерилизации при 0,5 атм. или кипячения на водяной бане в течение 20 мин.

Концентрацию препарата, необходимую для добавления в среды, определяют посевом 18-24-часовой культуры вульгарного протей в центр пластины агара с 0,05; 0,1; 0,2% "Прогресса". В качестве контроля используют среду без добавления ингибитора. Посевы инкубируют при 37 °С в течение суток и определяют минимальную концентрацию препарата, подавляющую рост протей. На следующем этапе определяют чувствительность вибрионов тест-штамма *V. parahaemolyticus* к установленной ингибирующей дозе "Прогресса".

В три флакона со 100 мл 1%-й пептонной воды с "Прогрессом" добавляют по 0,1 мл взвеси, содержащей 100 клеток *V. parahaemolyticus*. Через 18 ч из каждого флакона высевают по 0,1 мл на пластины агара. Также поступают с контрольной средой без "Прогресса". Препарат считают пригодным, если через 18 ч выращивания в 1%-й пептонной воде с ингибитором и последующим посевом на плотную среду вырастает не менее 70% от количества в контроле.

7.4. Тест-штаммы

С целью контроля ростовых свойств питательных сред используют тест-штаммы *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *E. coli* 18 и *P. vulgaris* HX19 N222, а для контроля гемолитической и уреазной активностей - штаммы *V. parahaemolyticus* KM-187, KM-186 соответственно и другие с аналогичными свойствами, разрешенные в установленном порядке к применению для этих целей в Российской Федерации.

8. Библиографические данные

1. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.2.731-99 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами".
2. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.3.2.1078-01 "Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов".
3. ГОСТ 26668-85 "Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов".
4. ГОСТ 26669-85 "Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов".
5. ГОСТ 7631-85 "Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний".
6. ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218-96) "Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований".
7. Методические указания МУК 4.2.671-97 "Методы санитарно-микробиологического анализа питьевой воды".
8. Методические указания МУ 4.2.1097-02 "Лабораторная диагностика холеры".
9. Методические указания МУК 4.2.1793-03 "Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых паразитическими и другими патогенными для человека вибрионами".
10. "Временные методические рекомендации по контролю за содержанием паразитического вибриона в рыбе и рыбопродуктах. Методы исследования и нормативы" N 3933-85, утв. Зам. Главного государственного санитарного врача СССР.
11. "Методические рекомендации по лабораторной диагностике, эпидемиологии, клинике, лечению и профилактике заболеваний, вызываемых паразитическими и другими условно патогенными морскими вибрионами" 1985, утв. Зам. начальника Главного управления карантинных инфекций МЗ СССР.
12. "Инструкция по бактериологическому контролю диагностических питательных сред для холерного вибриона" 1983, утв. начальником Главного управления карантинных инфекций МЗ СССР.
13. "Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных" N 5319-91 от 22.02.91, утв. Зам. Главного государственного санитарного врача СССР, Зам. министра рыбного хозяйства СССР.
14. "Временная инструкция по борьбе с вибриозом рыб" /Министерство сельского хозяйства и продовольствия РФ, Департамент ветеринарии, 1998.
15. Санитарная микробиология: Справочник. Санкт-Петербург, 1998.
16. C.L.Sears and J.B.Kaper. Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of Action and Linkage to Intestinae Secretion. //Microbiological Reviews, Mar. 1996, vol 60, N 1, p.167-215.